MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA EL TRATAMIENTO DE UN TRASTORNO ASOCIADO A SERPINC1

Solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad para la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos No.: 62/264,013, presentada el 7 de diciembre de 2015, para la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos No.: 62/315,228, presentada el 30 de marzo de 2016, para la Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos No.: 62/366,304, presentada el 25 de julio de 2016, y para la Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos No: 62/429,241, presentada el 2 de diciembre de 2016. Los contenidos completos de cada una de las solicitudes de patente anteriores se incorporan aquí como referencia.

Esta solicitud está relacionada con la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos No.: 61/992,057, presentada el 12 de mayo de 2014, Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos No.: 62/089,018, presentada el 8 de diciembre de 2014, Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos No.: 62/102,281, presentada el 12 de enero de 2015, y la solicitud de Patente PCT Nº. PCT/US2015/030337, presentada el 12 de mayo de 2015. Los contenidos completos de cada una de las solicitudes de patente anteriores se incorporan aquí como referencia.

Además, esta solicitud está relacionada con la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos No.: 61/638,952, presentada el 26 de abril de 2012, Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos No.: 61/669,249, presentada el 9 de julio de 2012, Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos No.: 61/734,573, presentada el 7 de diciembre de 2012, Solicitud de Patente de Estados Unidos No.: 13/837,129, presentada el 15 de marzo de 2013, ahora Patente de Estados Unidos No.: 9,127,274, Solicitud de Patente de Estados Unidos No.: 14/806,084, presentada en julio 22, 2015, ahora Solicitud de Patente de Estados Unidos No.: 9,376,680, Solicitud de Patente de Estados Unidos No.: 15/070,358, presentada el 15 de marzo de 2016, y Solicitud de Patente PCT No. PCT/US2013/038218, presentada el 25 de abril de 2013. Esta solicitud también está relacionada con la solicitud de patente PCT No. PCT/US2012/065601, presentada el 16 de noviembre de 2012. Los contenidos completos de cada una de las solicitudes de patente anteriores se incorporan aquí como referencia.

Listado de Secuencias

La solicitud del corriente contiene un Listado de Secuencias que se ha enviado electrónicamente en formato ASCII y se incorpora aquí como referencia en su totalidad. Dicha copia ASCII, creada el 6 de diciembre de 2016, se llama 121301-05220_SL.TXT y tiene un tamaño de 21,140 bytes.

Antecedentes de la invención

Serpinc1 es un miembro de la superfamilia (serpina) de inhibidores de la serina proteinasa. Serpinc1 es un inhibidor de la proteasa del plasma que inhibe la trombina y otras serina proteasas activadas del sistema de coagulación, como los factores X, IX, XI, XII y VII y, por lo tanto, regula la cascada de la coagulación sanguínea. La actividad anticoagulante de Serpinc1 se potencia por la presencia de heparina y otros glucosaminoglicanos relacionados que catalizan la formación de complejos de trombina: antitrombina (TAT).

Los trastornos hemorrágicos, ya sean hereditarios o adquiridos, son afecciones en las que la coagulación de la sangre es inadecuada. Por ejemplo, la hemofilia es un grupo de trastornos genéticos hereditarios de la coagulación que afectan la capacidad del cuerpo para controlar la coagulación o coagulación sanguínea. La hemofilia A es un trastorno genético recesivo ligado a X que implica una falta de Factor VIII de coagulación funcional y representa el 80% de los casos de hemofilia. La hemofilia B es un trastorno genético recesivo ligado a X que implica una falta de factor IX de coagulación funcional. Comprende aproximadamente el 20% de los casos de hemofilia. La hemofilia C es un trastorno genético autosómico que implica una falta de Factor XI de coagulación funcional. La hemofilia C no es completamente recesiva, ya que los individuos heterocigotos también muestran un aumento en el sangrado.

Aunque actualmente no hay cura para la hemofilia, se puede controlar con infusiones regulares del factor de coagulación deficiente, *e.g.* factor VIII en la

hemofilia A. Sin embargo, algunos hemofílicos desarrollan anticuerpos (inhibidores) contra los factores de reemplazo que se les administran y, por lo tanto, se vuelve refractario al factor de coagulación de reemplazo. En consecuencia, las hemorragias en tales sujetos no se pueden controlar adecuadamente.

El desarrollo de inhibidores de alto título para, por ejemplo, el factor VIII y otros factores de coagulación es la complicación más grave de la terapia de hemofilia y hace que el tratamiento de las hemorragias sea muy complicado. Actualmente, las únicas estrategias para detener las hemorragias en tales sujetos son el uso de "agentes de derivación" como la actividad de derivación inhibidora del factor ocho (FEIBA) y factor VII recombinante activado (rFVIIa), plasmaféresis, reemplazo continuo del factor y terapia de tolerancia inmune, ninguno de los cuales son completamente efectivos. En consecuencia, existe una necesidad en el arte de tratamientos alternantes para sujetos que tengan un trastorno hemorrágico, tal como hemofilia.

Resumen De La Invención

La presente invención proporciona métodos para tratar un sujeto, que tiene un trastorno, que se beneficiaría de inhibir o reducir la expresión de un gen Serpinc1, *e.g.* un trastorno hemorrágico, tal como hemofilia, usando composiciones iRNA que producen el complejo de silenciamiento inducido por

RNA (RISC)-mediada por escisión de transcriptos RNA de un gen Serpinc1 para inhibir la expresión de un gen Serpinc1.

La presente invención se basa, al menos en parte, en el sorprendente descubrimiento de que dosis muy bajas (*e.g.* dosis al menos aproximadamente 30 veces menores que las dosis enseñadas en el arte) de un agente iRNA bicatenario enlazado con GalNAc que comprende modificaciones químicas particulares que muestra una potencia excepcional para inhibir la expresión de Serpinc1, así como una duración excepcional de la inhibición de la expresión de Serpinc1. Específicamente, se muestran aquí, bajas dosis de agentes iRNA que incluyen un ligando GalNAc y una cadena sentido y una cadena antisentido en la que sustancialmente todos los nucleótidos están modificados, tales como agentes iRNA que incluyen uno o más motivos de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos, incluyendo uno de tales motivos en o cerca del sitio de escisión de los agentes, seis enlaces de fosforotioato y un ligando de GalNAc como excepcionalmente efectivos y duraderos para silenciar la actividad del gen Serpinc1.

En consecuencia, en un aspecto, la presente invención proporciona métodos para prevenir al menos un síntoma en un sujeto, que tiene un trastorno, que se beneficiaría de la reducción en la expresión de Serpinc1. Los métodos incluyen administrar al sujeto una dosis de aproximadamente 0,200 mg/kg a aproximadamente 1,825 mg/kg de un agente iRNA bicatenario comprende una

cadena sentido y una cadena antisentido que forman una región bicatenaria, en donde la cadena sentido comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 y la cadena antisentido comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 5, donde sustancialmente todos de los nucleótidos de la cadena sentido y sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena antisentido son nucleótidos modificados, y en donde el agente iRNA bicatenario comprende un ligando, *e.g.* la cadena sentido del agente iRNA bicatenario está conjugada con un ligando, *e.g.* un ligando se une al extremo 3' de la cadena sentido.

En otro aspecto, la presente invención proporciona métodos para tratar un sujeto, que tiene un trastorno, que se beneficiaría de la reducción en la expresión de Serpinc1. Los métodos incluyen administrar al sujeto una dosis de aproximadamente 0,200 mg/kg a aproximadamente 1,825 mg/kg de un agente iRNA bicatenario, donde el agente iRNA bicatenario comprende una cadena sentido y una cadena antisentido que forman una región bicatenaria, en donde la cadena sentido comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de SEC ID NO: 1 y la cadena antisentido comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de SEC ID NO: 5, donde sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena sentido y sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena antisentido son nucleótidos modificados, y en

donde el agente iRNA bicatenario comprende un ligando, *e.g.* la cadena sentido del agente iRNA bicatenario está conjugada con un ligando unido en el extremo 3´ de la cadena sentido.

En una implementación, todos los nucleótidos de la cadena sentido y todos los nucleótidos de la cadena antisentido son nucleótidos modificados.

En otra implementación, la cadena sentido y la cadena antisentido comprenden una región de complementariedad que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de cualquiera de las secuencias enumeradas en cualquiera de las Tablas 2 y 3.

En algunas implementaciones, los nucleótidos modificados se seleccionan independientemente del grupo que consiste en un nucleótido 2'-O-metilo-modificado, un nucleótido 2'-flúor-modificado, un nucleótido que comprende un grupo 5'-fosforotioato y un nucleótido terminal unido a un derivado de colesterilo o un grupo bisdecilamida de ácido dodecanoico. En implementaciones adicionales, el nucleótido modificado se selecciona del grupo que consiste en un nucleótido 2'-desoxi-2'-flúor-modificado, un nucleótido 2'-desoxi-modificado, un nucleótido bloqueado, un nucleótido desbloqueado y un nucleótido restringido conformacionalmente, un nucleótido etilo restringido, un nucleótido abásico, un nucleótido 2'-amino-modificado, un nucleótido 2'-alquilo-modificado, un nucleótido 2'-O-alilo-modificado, un nucleótido 2'-C-alilo-modificado, un nucleótido 2'-

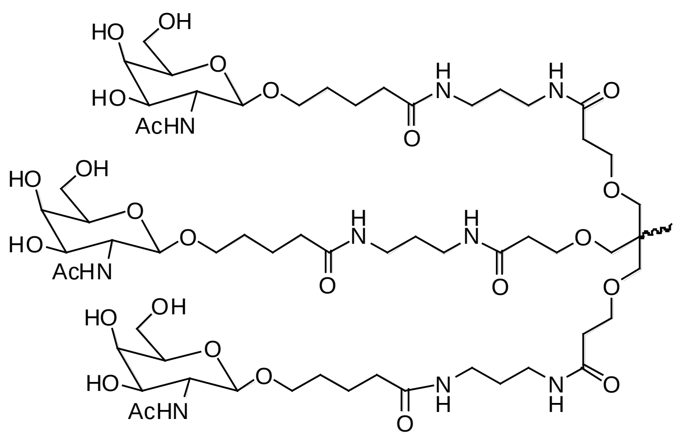
hidroxilo-modificado, un nucleótido morfolino, un fosforamidato y un nucleótido que comprende una base no natural.

En otra implementación del agente iRNA bicatenario, al menos una cadena comprende un saliente 3´ de al menos 1 nucleótido. En otra implementación, al menos una cadena comprende un saliente 3´ de al menos 2 nucleótidos, *e.g.*, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 nucleótidos. En otras implementaciones, al menos una cadena del agente iRNA comprende un saliente 5' de al menos 1 nucleótido. En ciertas implementaciones, al menos una cadena comprende un saliente 5' de al menos 2 nucleótidos, *e.g.*, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 nucleótidos. En aún otras implementaciones, tanto el extremo 3' como el extremo 5' de una cadena del agente iRNA comprenden un saliente de al menos 1 nucleótido.

En ciertas implementaciones, el ligando es una N-acetilgalactosamina (GalNAc). El Ligando puede ser uno o más GalNAc unidos al agente iRNA a través de un enlazador ramificado monovalente, bivalente o trivalente. El ligando se puede conjugar con el extremo 3´ de la cadena sentido del agente iRNA bicatenario, el extremo 5' de la cadena sentido del agente iRNA bicatenario, el extremo 3´ de la cadena antisentido del agente iRNA bicatenario, o el extremo 5’ de la cadena antisentido del agente iRNA bicatenario.

En algunas implementaciones, los agentes iRNA de doble cadena de la invención comprenden una pluralidad, *e.g.* 2, 3, 4, 5 o 6 de GalNAc, cada uno unido independientemente a una pluralidad de nucleótidos del agente iRNA bicatenario a través de una pluralidad de enlazadores monovalentes.

En ciertas implementaciones, el ligando es



.

En otro aspecto, la presente invención proporciona métodos para prevenir al menos un síntoma en un sujeto, que tiene un trastorno, que se beneficiaría de la reducción en la expresión de Serpinc1. Los métodos incluyen administrar al sujeto una dosis de aproximadamente 0,200 mg/kg a aproximadamente 1,825 mg/kg de un agente iRNA bicatenario, donde el agente iRNA bicatenario comprende una cadena sentido complementaria a una cadena antisentido, en donde la cadena antisentido comprende una región de complementariedad a Parte de un mRNA que codifica Serpinc1, en el que cada cadena tiene una longitud de

aproximadamente 14 a aproximadamente 30 nucleótidos, en la que el agente iRNA bicatenario está representado por la fórmula (IIIe):

sentido: 5'-N_a-Y Y Y-N_a-3'

antisentido: 3' n_p'-N_a'-Y'Y'Y'-N_a'-5' (IIIe)

donde:

n_p' es un saliente de 2 nucleótidos y cada nucleótido dentro de n_p' está conectado a un nucleótido vecino a través de un enlace fosforotioato;

cada N_a y N_a' representan independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 0-25 nucleótidos que están, ya sea, modificados o no modificados o combinaciones de los mismos, cada secuencia comprende al menos dos nucleótidos modificados de forma diferente;

YYY y Y'Y'Y' representan cada una independientemente un motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos, y en el que las modificaciones son modificaciones 2'-O-metilo o 2'-flúor;

en el que la cadena sentido y la cadena antisentido comprenden cada una independientemente dos enlaces fosforotioato en el extremo 5'; y

en el que la cadena sentido está conjugada con al menos un ligando, donde el ligando es uno o más derivados GalNAc unidos a través de un enlazador ramificado monovalente, bivalente o trivalente, evitando así al menos un síntoma en el sujeto, que tiene un trastorno, que se beneficiaría de la reducción en la expresión de Serpinc1.

En otro aspecto, la presente invención proporciona métodos para tratar un sujeto, que tiene un trastorno, que se beneficiaría de la reducción en la expresión de Serpinc1. Los métodos incluyen administrar al sujeto una dosis de aproximadamente 0,200 mg/kg a aproximadamente 1,825 mg/kg de un agente iRNA bicatenario, donde el agente iRNA bicatenario comprende una cadena sentido complementaria a una cadena antisentido, en donde la cadena antisentido comprende una región de complementariedad a Parte de un mRNA que codifica Serpinc1, en el que cada cadena tiene una longitud de aproximadamente 14 a aproximadamente 30 nucleótidos, en la que el agente iRNA bicatenario está representado por la fórmula (IIIe):

sentido: 5'-N_a-Y Y Y-N_a-3'

antisentido: 3' n_p'-N_a'-Y'Y'Y'-N_a'-5' (IIIe)

donde:

n_p' es un saliente de 2 nucleótidos y cada nucleótido dentro de n_p' está conectado a un nucleótido vecino a través de un enlace fosforotioato;

cada N_a y N_a' representan independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 0-25 nucleótidos que están modificados o no modificados o combinaciones de los mismos, cada secuencia comprende al menos dos nucleótidos modificados de forma diferente;

YYY y Y'Y'Y' representan cada uno independientemente un motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos, y en el que las modificaciones son modificaciones 2'-O-metilo o 2'-flúor;

en el que la cadena sentido y la cadena antisentido comprenden cada una independientemente dos enlaces fosforotioato en el extremo 5'; y

en el que la cadena sentido está conjugada con al menos un ligando, donde el ligando es uno o más derivados GalNAc unidos a través de un enlazador ramificado monovalente, bivalente o trivalente, evitando así al menos un síntoma en el sujeto, que tiene un trastorno, que se beneficiaría de la reducción en la expresión de Serpinc1.

En una implementación, el agente iRNA bicatenario se administra al sujeto en una dosis única o en dos o más dosis, *e.g.* en 3, 4, 5 o 6 dosis.

En una implementación, el agente iRNA bicatenario se administra al sujeto una vez al mes, una vez cada seis semanas, una vez cada 2 meses, una vez por trimestre o según sea necesario.

El agente iRNA bicatenario se puede administrar al sujeto como, *e.g.* una dosis mensual de aproximadamente 0,200 a aproximadamente 1,825 mg/kg, de 0,200 a aproximadamente 1,800 mg/kg, de aproximadamente 0,200 a aproximadamente 1,700 mg/kg, de aproximadamente 0,200 a aproximadamente 1,600 mg/kg, de aproximadamente 0,200 a aproximadamente 1,500 mg/kg, de aproximadamente 0,200 a aproximadamente 1,400 mg/kg, de aproximadamente 0,200 a aproximadamente 1,400 mg/kg, de aproximadamente 0,200 a aproximadamente 1,200 mg/kg, de aproximadamente 0,200 a aproximadamente

1,100 mg/kg, de aproximadamente 0,200 a aproximadamente 1,000 mg/kg, de aproximadamente 0,200 a aproximadamente 0,900 mg/kg, de aproximadamente 0,200 a aproximadamente 0,800 mg/kg, de aproximadamente 0,200 a aproximadamente 0,700 mg/kg, de aproximadamente 0,200 a aproximadamente 0,600 mg/kg, de aproximadamente 0,200 a aproximadamente 0,500 mg/kg, de aproximadamente 0,200 a aproximadamente 0,400 mg/kg, de aproximadamente 0,225 a aproximadamente 1,825 mg/kg, de aproximadamente 0,225 a aproximadamente 1,800 mg/kg, de aproximadamente 0,225 a aproximadamente 1,700 mg/kg, de aproximadamente 0,225 a aproximadamente 1,600 mg/kg, de aproximadamente 0,225 a aproximadamente 1,500 mg/kg, de aproximadamente 0,225 a aproximadamente 1,400 mg/kg, de aproximadamente 0,225 a aproximadamente 1,400 mg/kg, de aproximadamente 0,225 a aproximadamente 1,200 mg/kg, de aproximadamente 0,225 a aproximadamente 1,100 mg/kg, de aproximadamente 0,225. a aproximadamente 1,000 mg/kg, de aproximadamente 0,225 a aproximadamente 0,900 mg/kg, de aproximadamente 0,225 a aproximadamente 0,800 mg/kg, de aproximadamente 0,225 a aproximadamente 0,700 mg/kg, de aproximadamente 0,225 a aproximadamente 0,600 mg/kg, de aproximadamente 0,225 a aproximadamente 0,500 mg/kg, de aproximadamente 0,225 a aproximadamente 0,400 mg/kg, de aproximadamente 0,250 a aproximadamente 1,825 mg/kg, de aproximadamente 0,250 a aproximadamente 1,800 mg/kg, de aproximadamente 0,250 a aproximadamente 1,700 mg/kg, de aproximadamente 0,250 a aproximadamente 1,600 mg/kg, de aproximadamente 0,250 a aproximadamente 1,500 mg/kg, de aproximadamente 0,250 a

aproximadamente 1,400 mg/kg, de aproximadamente 0,250 a aproximadamente 1,400 mg/kg, de aproximadamente 0,250 a aproximadamente 1,200 mg/kg, de aproximadamente 0,250 a aproximadamente 1,100 mg/kg, de aproximadamente 0,250 a aproximadamente 1,000 mg/kg, de aproximadamente 0,250 a aproximadamente 0,900 mg/kg, de aproximadamente 0,250 a aproximadamente 0,800 mg/kg, de aproximadamente 0,250 a aproximadamente 0,700 mg/kg, de aproximadamente 0,250 a aproximadamente 0,600 mg/kg, de aproximadamente 0,250 a aproximadamente 0,500 mg/kg, de aproximadamente 0,250 a aproximadamente 0,400 mg/kg, de aproximadamente 0,425 a aproximadamente 1,825 mg/kg, de aproximadamente 0,425 a aproximadamente 1,800 mg/kg, de aproximadamente 0,425 a aproximadamente 1,700 mg/kg, de aproximadamente 0,425 a aproximadamente 1,600 mg/kg, de aproximadamente 0,425 a aproximadamente 1,500 mg/kg, de aproximadamente 0,425 a aproximadamente 1,400 mg/kg, de aproximadamente 0,425 a aproximadamente 1,400 mg/kg, de aproximadamente 0,425 a aproximadamente 1,200 mg/kg, de aproximadamente 0,425 a aproximadamente 1,100 mg/kg, de aproximadamente 0,425 a aproximadamente 1,000 mg/kg, de aproximadamente 0,425 a aproximadamente 0,900 mg/kg, de aproximadamente 0,425 a aproximadamente 0,800 mg/kg, de aproximadamente 0,425 a aproximadamente 0,700 mg/kg, de aproximadamente 0,425 a aproximadamente 0,600 m g/kg, aproximadamente 0,425 a aproximadamente 0,500 mg/kg, de aproximadamente 0,450 a aproximadamente 1,825 mg/kg, de aproximadamente 0,450 a aproximadamente 1,800 mg/kg, de aproximadamente 0,450 a aproximadamente 1,700 mg/kg, de aproximadamente

0,450 a aproximadamente 1,600 mg/kg, de aproximadamente 0,450 a aproximadamente 1,500 mg/kg, de aproximadamente 0,450 a aproximadamente 1,400 mg/kg, de aproximadamente 0,450 a aproximadamente 1,400 mg/kg, de aproximadamente 0,450 a aproximadamente 1,200 mg/kg, de aproximadamente 0,450 a aproximadamente 1,100 mg/kg, de aproximadamente 0,450 a aproximadamente 1,000 mg/kg, de aproximadamente 0,450 a aproximadamente 0,900 mg/kg, de aproximadamente 0,450 a aproximadamente 0,800 mg/kg, de aproximadamente 0,450 a aproximadamente 0,700 mg/kg, de aproximadamente 0,450 a aproximadamente 0,600 mg/kg, de aproximadamente 0,450 a aproximadamente 0,500 mg/kg, de aproximadamente 0,475 a aproximadamente 1,825 mg/kg, de aproximadamente 0,475 a aproximadamente 1,800 mg/kg, de aproximadamente 0,475 a aproximadamente 1,700 mg/kg, de aproximadamente 0,475 a aproximadamente 1,600 mg/kg, de aproximadamente 0,475 a aproximadamente 1,500 mg/kg, de aproximadamente 0,475 a aproximadamente 1,400 mg/kg, de aproximadamente 0,475 a aproximadamente 1,400 mg/kg, de aproximadamente 0,475 a aproximadamente 1,200 mg/kg, de aproximadamente 0,475 a aproximadamente 1,100 mg/kg, de aproximadamente 0,475 a aproximadamente 1,000 mg/kg, de aproximadamente 0,475 a aproximadamente 0,900 mg/kg, de aproximadamente 0,475 a aproximadamente 0,800 mg/kg, de aproximadamente 0,475 a aproximadamente 0,700 mg/kg, de aproximadamente 0. 475 a aproximadamente 0,600 mg/kg, de aproximadamente 0,475 a aproximadamente 0,500 mg/kg, de aproximadamente 0,875 a aproximadamente 1,825 mg/kg, de aproximadamente 0,875 a aproximadamente 1,800 mg/kg, de

aproximadamente 0,875 a aproximadamente 1,700 mg/kg, de aproximadamente 0,875 a aproximadamente 1,600 mg/kg, de aproximadamente 0,875 a aproximadamente 1,500 mg/kg, de aproximadamente 0,875 a aproximadamente 1,400 mg/kg, de aproximadamente 0,875 a aproximadamente 1,400 mg/kg, de aproximadamente 0,875 a aproximadamente 1,200 mg/kg, de aproximadamente 0,875 a aproximadamente 1,100 mg/kg, de aproximadamente 0,875 a aproximadamente 1,000 mg/kg, de aproximadamente 0,875 a aproximadamente 0,900 mg/kg, de aproximadamente 0,900 a aproximadamente 1,825 mg/kg, de aproximadamente 0,900 a aproximadamente 1,800 mg/kg, de aproximadamente 0,900 a aproximadamente 1,700 mg/kg, de aproximadamente 0,900 a aproximadamente 1,600 mg/kg, de aproximadamente 0,900 a aproximadamente 1,500 mg/kg, de aproximadamente 0,900 a aproximadamente 1,400 mg/kg, de aproximadamente 0,900 a aproximadamente 1,400 mg/kg, de aproximadamente 0,900 a aproximadamente 1,200 mg/kg, de aproximadamente 0,900 a aproximadamente 1,100 mg/kg, de aproximadamente 0,900 a aproximadamente 1,000 mg/kg, de aproximadamente 0,925 a aproximadamente 1,825 mg/kg, de aproximadamente 0,925 a aproximadamente 1,800 mg/kg, de aproximadamente 0,925 a aproximadamente 1,700 mg/kg, de aproximadamente 0,925 a aproximadamente 1,600 mg/kg, de aproximadamente 0,925 a aproximadamente 1,500 mg/kg, de aproximadamente 0,925 a aproximadamente 1,400 mg/kg, de aproximadamente 0,925 a aproximadamente 1,400 mg/kg, de aproximadamente 0,925 a aproximadamente 1,200 mg/kg, de aproximadamente 0,925 a aproximadamente 1,100 mg/kg, o aproximadamente 0,925 a aproximadamente

1,000 mg/kg, como *e.g.* una dosis mensual para uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho meses o más.

El sujeto puede ser un humano, tal como un ser humano que tiene un trastorno hemorrágico, tal como un trastorno hemorrágico adquirido o un trastorno hemorrágico hereditario, *e.g.* una hemofilia, *e.g.* hemofilia A, hemofilia B o hemofilia C.

En una implementación, el sujeto tiene una hemofilia A y es un sujeto inhibidor. En otra implementación, el sujeto tiene una hemofilia B y es un sujeto inhibidor. En otra implementación más, el sujeto tiene una hemofilia C y es un sujeto inhibidor.

En una implementación, la administración del agente iRNA bicatenario al sujeto provoca un aumento en la coagulación de la sangre y/o una disminución en la acumulación de proteína Serpinc1.

En una implementación, los métodos comprenden además medir los niveles de trombina en el sujeto.

El agente iRNA bicatenario se puede administrar por vía subcutánea o intravenosa.

En una implementación, sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena antisentido y sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena sentido del agente iRNA comprenden una modificación seleccionada del grupo que consiste en una modificación 2'-O-metilo y una modificación 2'-flúor. En una implementación, todos los nucleótidos de la cadena sentido y todos los nucleótidos de la cadena antisentido del agente iRNA son nucleótidos modificados.

En una implementación, el motivo YYY se produce en o cerca del sitio de escisión de la cadena sentido.

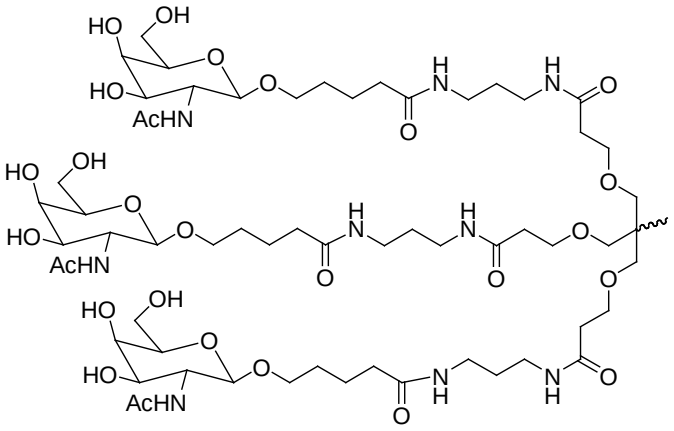
En una implementación, el motivo Y'Y'Y' aparece en las posiciones 11, 12 y 13 de la cadena antisentido desde el extremo 5'.

La región bicatenaria puede tener 15-30 pares de nucleótidos de longitud, 17-23 pares de nucleótidos de longitud, 17-25 pares de nucleótidos de longitud, 23-27 pares de nucleótidos de longitud, 19-21 pares de nucleótidos de longitud, o 21-23 pares de nucleótidos de longitud.

Cada cadena puede tener 15-30 nucleótidos o 19-30 nucleótidos.

En una implementación, la cadena sentido tiene un total de 21 nucleótidos y la cadena antisentido tiene un total de 23 nucleótidos.

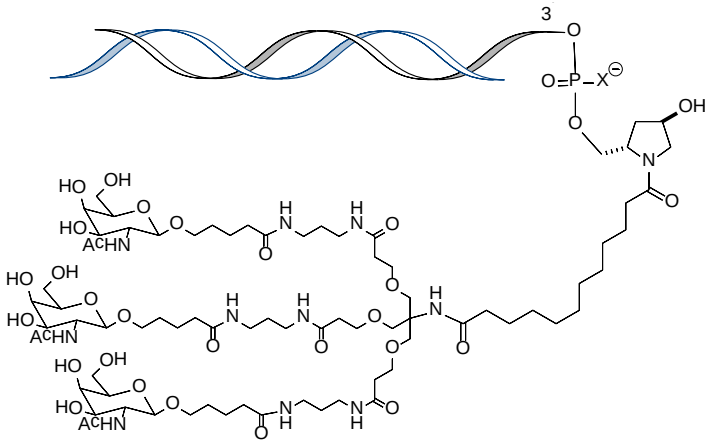
En una implementación, el ligando es



.

En una implementación, el ligando está unido al extremo 3' de la cadena sentido.

En una implementación, el agente iRNA se conjuga con el ligando como se muestra en el siguiente esquema



donde X es O o S.

En una implementación, el par de bases en la posición 1 del extremo 5' de la cadena antisentido del dúplex es un par de bases AU.

En una implementación, el agente iRNA es AD-57213 ((Sentido (5' a 3'): GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf (SEQ ID NO: 13); antisentido (5' a 3'): usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg (SEQ ID NO: 14), en donde A, C, G y U son ribosa A, C, G o U; a, c, g y u son 2'-O-metilo (2'-OMe) A, C, G o U; Af, Cf, Gf o Uf son 2'-flúor A, C, G o U; y s es un enlace fosforotioato)).

En una implementación, el agente se administra como una composición farmacéutica. En una implementación, el agente iRNA se administra en una solución no tamponada, tal como solución salina o agua.

En otra implementación, el siRNA se administra con una solución tampón, tal como una solución tampón que comprende acetato, citrato, prolamina, carbonato o fosfato o cualquier combinación de los mismos. En una implementación, la solución tampón es solución salina tamponada con fosfato (PBS).

En un aspecto, la presente invención proporciona métodos para prevenir al menos un síntoma en un sujeto, que tiene un trastorno, que se beneficiaría de la reducción en la expresión de Serpinc1. Los métodos incluyen administrar al sujeto una dosis de aproximadamente 0,200 mg/kg a aproximadamente 1,825 mg/kg de

un agente ácido ribonucleico bicatenario (iRNA), en donde el agente iRNA bicatenario comprende una cadena sentido y una cadena antisentido, la cadena antisentido comprende una región de complementariedad que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de 5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3' (SEQ ID NO: 15), en donde sustancialmente la totalidad de los nucleótidos de la cadena sentido y sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena antisentido son nucleótidos modificados, y en donde el agente iRNA bicatenario comprende un ligando, *e.g.* la cadena sentido del agente iRNA bicatenario está conjugada con un ligando unido en el extremo 3´ de la cadena sentido.

En otro aspecto, la presente invención proporciona métodos para tratar un sujeto, que tiene un trastorno, que se beneficiaría de la reducción en la expresión de Serpinc1. Los métodos incluyen administrar al sujeto una dosis de aproximadamente 0,200 mg/kg a aproximadamente 1,825 mg/kg de un agente ácido ribonucleico bicatenario (iRNA), en donde el agente iRNA bicatenario comprende una cadena sentido y una cadena antisentido, la cadena antisentido comprende una región de complementariedad que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de 5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3' (SEQ ID NO:15), en el que sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena sentido y sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena antisentido son nucleótidos modificados, y en donde el agente iRNA bicatenario comprende un ligando, *e.g.,* la cadena sentido

del agente iRNA bicatenario está conjugada con un ligando unido al extremo 3´ de la cadena sentido.

El agente iRNA bicatenario se puede administrar al sujeto en dos o más dosis.

En una implementación, el agente iRNA bicatenario se administra al sujeto una vez al mes. En otra implementación, el agente iRNA bicatenario se administra al sujeto una vez cada seis semanas. En una implementación, el agente iRNA bicatenario se administra al sujeto una vez cada 2 meses. En otra implementación más, el agente iRNA bicatenario se administra al sujeto una vez por trimestre.

El agente iRNA bicatenario se puede administrar al sujeto como, *e.g.* una dosis mensual de aproximadamente 0,200 a aproximadamente 1,825 mg/kg, de 0,200 a aproximadamente 1,800 mg/kg, de aproximadamente 0,200 a aproximadamente 1,700 mg/kg, de aproximadamente 0,200 a aproximadamente 1,600. mg/kg, de aproximadamente 0,200 a aproximadamente 1,500 mg/kg, de aproximadamente 0,200 a aproximadamente 1,400 mg/kg, de aproximadamente 0,200 a aproximadamente 1,400 mg/kg, de aproximadamente 0,200 a aproximadamente 1,200 mg/kg, de aproximadamente 0,200 a aproximadamente 1,100 mg/kg, de aproximadamente 0,200 a aproximadamente 1,000 mg/kg, de aproximadamente 0,200 a aproximadamente 0,900 mg/kg, de aproximadamente 0,200 a aproximadamente 0,800 mg/kg, de aproximadamente 0,200 a

aproximadamente 0,700 mg/kg, de aproximadamente 0,200 a aproximadamente 0,600 mg/kg, de aproximadamente 0,200 a aproximadamente 0,500 mg/kg, de aproximadamente 0,200 a aproximadamente 0,400 mg/kg, de aproximadamente 0,225 a aproximadamente 1,825 mg/kg, de aproximadamente 0,225 a aproximadamente 1,800 mg/kg, de aproximadamente 0,225 a aproximadamente 1,700 mg/kg, de aproximadamente 0,225 a aproximadamente 1,600 mg/kg, de aproximadamente 0,225 a aproximadamente 1,500 mg/kg, de aproximadamente 0,225 a aproximadamente 1,400 mg/kg, de aproximadamente 0,225 a aproximadamente 1,400 mg/kg, de aproximadamente 0,225 a aproximadamente 1,200 mg/kg, de aproximadamente 0,225 a aproximadamente 1,100 mg/kg, de aproximadamente 0,225 a aproximadamente 1,000 mg/kg, de aproximadamente 0,225 a aproximadamente 0,900 m g/kg, aproximadamente 0,225 a aproximadamente 0,800 mg/kg, de aproximadamente 0,225 a aproximadamente 0,700 mg/kg, de aproximadamente 0,225 a aproximadamente 0,600 mg/kg, de aproximadamente 0,225 a aproximadamente 0,500 mg/kg, de aproximadamente 0,225 a aproximadamente 0,400 mg/kg, de aproximadamente 0,250 a aproximadamente 1,825 mg/kg, de aproximadamente 0,250 a aproximadamente 1,800 mg/kg, de aproximadamente 0,250 a aproximadamente 1,700 mg/kg, de aproximadamente 0,250 a aproximadamente 1,600 mg/kg, de aproximadamente 0,250 a aproximadamente 1,500 mg/kg, de aproximadamente 0,250 a aproximadamente 1,400 mg/kg, de aproximadamente 0,250 a aproximadamente 1,400 mg/kg, de aproximadamente 0,250 a aproximadamente 1,200 mg/kg, de aproximadamente 0,250 a aproximadamente 1,100 mg/kg, de aproximadamente

0,250 a aproximadamente 1,000 mg/kg, de aproximadamente 0,250 a aproximadamente 0,900 mg/kg, de aproximadamente 0,250 a aproximadamente 0,800 mg/kg, de aproximadamente 0,250 a aproximadamente 0,700 mg/kg, de aproximadamente 0,250 a aproximadamente 0,600 mg/kg, de aproximadamente 0,250 a aproximadamente 0,500 mg/kg, de aproximadamente 0,250 a aproximadamente 0,400 mg/kg, de aproximadamente 0,425 a aproximadamente 1,825 mg/kg, de aproximadamente 0,425 a aproximadamente 1,800 mg/kg, de aproximadamente 0,425 a aproximadamente 1,700 mg/kg, de aproximadamente 0,425 a aproximadamente 1,600 mg/kg, de aproximadamente 0,425 a aproximadamente 1,500 mg/kg, de aproximadamente 0,425 a aproximadamente 1,400 mg/kg, de aproximadamente 0,425 a aproximadamente 1,400 mg/kg, de aproximadamente 0,425 a aproximadamente 1,200 mg/kg, de aproximadamente 0. 425 a aproximadamente 1,100 mg/kg, de aproximadamente 0,425 a aproximadamente 1,000 mg/kg, de aproximadamente 0,425 a aproximadamente 0,900 mg/kg, de aproximadamente 0,425 a aproximadamente 0,800 mg/kg, de aproximadamente 0,425 a aproximadamente 0,700 mg/kg, de aproximadamente 0,425 a aproximadamente 0,600 mg/kg, de aproximadamente 0,425 a aproximadamente 0,500 mg/kg, de aproximadamente 0,450 a aproximadamente 1,825 mg/kg, de aproximadamente 0,450 a aproximadamente 1,800 mg/kg, de aproximadamente 0,450 a aproximadamente 1,700 mg/kg, de aproximadamente 0,450 a aproximadamente 1,600 mg/kg, de aproximadamente 0,450 a aproximadamente 1,500 mg/kg, de aproximadamente 0,450 a aproximadamente 1,400 mg/kg, de aproximadamente 0,450 a aproximadamente 1,400 mg/kg, de

aproximadamente 0,450 a aproximadamente 1,200 mg/kg, de aproximadamente 0,450 a aproximadamente 1,100 mg/kg, de aproximadamente 0,450 a aproximadamente 1,000 mg/kg, de aproximadamente 0,450 a aproximadamente 0,900 mg/kg, de aproximadamente 0,450 a aproximadamente 0,800 mg/kg, de aproximadamente 0,450 a aproximadamente 0,700 mg/kg, de aproximadamente 0,450 a aproximadamente 0,600 mg/kg, de aproximadamente 0,450 a aproximadamente 0,500 mg/kg, de aproximadamente 0,475 a aproximadamente 1,825 mg/kg, de aproximadamente 0,475 a aproximadamente 1,800 mg/kg, de aproximadamente 0,475 a aproximadamente 1,700 mg/kg, de aproximadamente 0,475 a aproximadamente 1,600 mg/kg, de aproximadamente 0,475 a aproximadamente 1,500 mg/kg, de aproximadamente 0,475 a aproximadamente 1,400 mg/kg, de aproximadamente 0,475 a aproximadamente 1,400 mg/kg, de aproximadamente 0,475 a aproximadamente 1,200 mg/kg, de aproximadamente 0,475 a aproximadamente 1,100 mg/kg, de aproximadamente 0,475 a aproximadamente 1,000 mg/kg, de aproximadamente 0,475 a aproximadamente 0,900 mg/kg, de aproximadamente 0,475 a aproximadamente 0,800 mg/kg, de aproximadamente 0,475 a aproximadamente 0,700 mg/kg, de aproximadamente 0,475 a aproximadamente 0,600 mg/kg, de aproximadamente 0,475 a aproximadamente 0,500 mg/kg, de aproximadamente 0,875 a aproximadamente 1,825 mg/kg, de aproximadamente 0,875 a aproximadamente 1,800 mg/kg, de aproximadamente 0,875 a aproximadamente 1,700 mg/kg, de aproximadamente 0,875 a aproximadamente 1,600 mg/kg, de aproximadamente 0,875 a aproximadamente 1,500 mg/kg, de aproximadamente 0,875 a aproximadamente

1,400 mg/kg, de aproximadamente 0,875 a aproximadamente 1,400 mg/kg, de aproximadamente 0,875 a aproximadamente 1,200 mg/kg, de aproximadamente 0,875 a aproximadamente 1,100 mg/kg, de aproximadamente 0,875 a aproximadamente 1,000 mg/kg, de aproximadamente 0,875 a aproximadamente 0,900 mg/kg, de aproximadamente 0,900 a aproximadamente 1,825 mg/kg, de aproximadamente 0,900 a aproximadamente 1,800 mg/kg, de aproximadamente 0,900 a aproximadamente 1,700 mg/kg, de aproximadamente 0,900 a aproximadamente 1,600 mg/kg, de aproximadamente 0,900 a aproximadamente 1,500 mg/kg, de aproximadamente 0,900 a aproximadamente 1,400 mg/kg, de aproximadamente 0,900 a aproximadamente 1,400 mg/kg, de aproximadamente 0,900 a aproximadamente 1,200 mg/kg, de aproximadamente 0,900 a aproximadamente 1,100 mg/kg, una aproximadamente 0,900 a aproximadamente 1,000 mg/kg, de aproximadamente 0,925 a aproximadamente 1,825 mg/kg, de aproximadamente 0,925 a aproximadamente 1,800 mg/kg, de aproximadamente 0,925 a aproximadamente 1,700 mg/kg, de aproximadamente 0,925 a aproximadamente 1,600 mg/kg, de aproximadamente 0,925 a aproximadamente 1,500 mg/kg, de aproximadamente 0,925 a aproximadamente 1,400 mg/kg, de aproximadamente 0,925 a aproximadamente 1,400 mg/kg, de aproximadamente 0,925 a aproximadamente 1,200 mg/kg, de aproximadamente 0,925 a aproximadamente 1,100 mg/kg, o aproximadamente 0,925 a aproximadamente 1,000 mg/kg.

En algunas implementaciones, la dosis del agente iRNA bicatenario se administra al sujeto en una dosis mensual de aproximadamente 0,200 mg/kg a aproximadamente 0,250 mg/kg; o en una dosis mensual de aproximadamente 0,425 mg/kg a aproximadamente 0,475 mg/kg; o en una dosis mensual de aproximadamente 0,875 mg/kg a aproximadamente 0,925 mg/kg; o en una dosis mensual de aproximadamente 1,775 mg/kg a aproximadamente 1,825 mg/kg.

En una implementación, el agente iRNA bicatenario se administra al sujeto en una dosis mensual de 0,225 mg/kg.

En otra implementación, el agente iRNA bicatenario se administra al sujeto en una dosis mensual de 0,450 mg/kg.

En otra implementación más, el agente iRNA bicatenario se administra al sujeto en una dosis mensual de 0,900 mg/kg.

En una implementación, el agente iRNA bicatenario se administra al sujeto en una dosis mensual de 1,800 mg/kg.

En una implementación, el agente iRNA bicatenario se administra al sujeto por vía subcutánea.

En una implementación, la administración de la dosis del agente iRNA bicatenario al sujeto reduce la actividad de Serpinc1 en el sujeto en aproximadamente un 70% a aproximadamente un 95%.

En otra implementación, la administración de la dosis del agente iRNA bicatenario al sujeto aumenta los niveles pico de trombina en el sujeto dentro del intervalo de niveles pico de trombina en un sujeto, que no tiene un trastorno, que se beneficiaría de la reducción en la expresión de Serpinc1.

En una implementación, la administración de la dosis del agente iRNA bicatenario al sujeto es suficiente para alcanzar los niveles pico de generación de trombina en el sujeto hasta aproximadamente el mismo nivel alcanzado mediante la administración del Factor VIII al sujeto.

En otra implementación, la administración de la dosis del agente iRNA bicatenario al sujeto es suficiente para alcanzar niveles pico de generación de trombina mayores de aproximadamente 40% en el sujeto.

En otra implementación más, la administración de la dosis del agente iRNA bicatenario al sujeto disminuye la tasa de sangrado anual (ABR) del sujeto en aproximadamente 80 a aproximadamente 95% en comparación con la mediana histórica sobre la demanda ABR de sujetos, que tienen un trastorno, que se

beneficiarían de la reducción en la expresión de Serpinc1 a la que no se administró el agente iRNA bicatenario.

En una implementación, el agente iRNA bicatenario se administra con una solución tampón, tal como una solución tampón que comprende acetato, citrato, prolamina, carbonato o fosfato o cualquier combinación de los mismos. En una implementación, la solución tampón es solución salina tamponada con fosfato (PBS).

En una implementación, el sujeto es un ser humano.

El trastorno puede ser un trastorno hemorrágico, tal como un trastorno hemorrágico adquirido o un trastorno hemorrágico hereditario, *e.g.* una hemofilia, *e.g.* hemofilia A, hemofilia B o hemofilia C.

En una implementación, el sujeto tiene una hemofilia A y es un sujeto inhibidor. En otra implementación, el sujeto tiene una hemofilia B y es un sujeto inhibidor. En otra implementación más, el sujeto tiene una hemofilia C y es un sujeto inhibidor.

En una implementación, el agente iRNA bicatenario se administra al sujeto por vía subcutánea.

En una implementación, todos los nucleótidos de la cadena sentido y todos los nucleótidos de la cadena antisentido son nucleótidos modificados.

En una implementación, los nucleótidos modificados se seleccionan independientemente del grupo que consiste en un nucleótido 2'-desoxi-2'-flúor modificado, un nucleótido 2'-desoxi-modificado, un nucleótido bloqueado, un nucleótido abásico, un nucleótido 2'-amino-modificado, un nucleótido 2'-alquilo-modificado, un nucleótido morfolino, un fosforamidato y un nucleótido que comprende una base no natural.

La región de complementariedad puede tener al menos 17 nucleótidos de longitud o 19 nucleótidos de longitud.

En una implementación, la región de complementariedad tiene entre 19 y 21 nucleótidos de longitud. En otra implementación, la región de complementariedad tiene entre 21 y 23 nucleótidos de longitud.

En una implementación, cada cadena no tiene más de 30 nucleótidos de longitud.

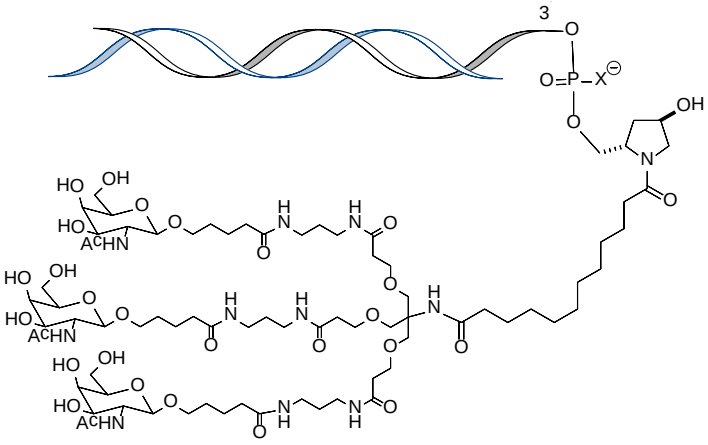
Al menos una cadena del agente iRNA bicatenario puede comprender un saliente 3´ de al menos 1 nucleótido o un saliente 3' de al menos 2 nucleótidos, *e.g.* 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 nucleótidos. En otras

implementaciones, al menos una cadena del agente iRNA comprende un saliente 5’ de al menos 1 nucleótido. En ciertas implementaciones, al menos una cadena comprende un saliente 5’ de al menos 2 nucleótidos, *e.g.* 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 nucleótidos. En aún otras implementaciones, tanto el extremo 3’ como el extremo 5' de una cadena del agente iRNA comprenden un saliente de al menos 1 nucleótido.

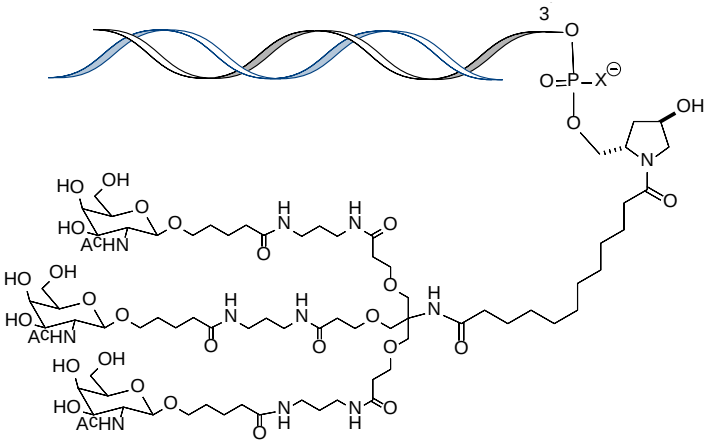
En ciertas implementaciones, el ligando es una N-acetilgalactosamina (GalNAc). El ligando puede ser uno o más GalNAc unidos al agente iRNA a través de un enlazador ramificado monovalente, bivalente o trivalente. El ligando se puede conjugar con el extremo 3´ de la cadena sentido del agente iRNA bicatenario, el extremo 5' de la cadena sentido del agente iRNA bicatenario, el extremo 3´ de la cadena antisentido del agente iRNA bicatenario, o el extremo 5’ de la cadena antisentido del agente iRNA bicatenario.

En algunas implementaciones, los agentes iRNA de doble cadena de la invención comprenden una pluralidad, *e.g.* 2, 3, 4, 5 o 6 de GalNAc, cada uno unido independientemente a una pluralidad de nucleótidos del agente iRNA bicatenario a través de una pluralidad de enlazadores monovalentes.

En ciertas implementaciones, el ligando es.



En una implementación, el agente iRNA se conjuga con el ligando como se muestra en el siguiente esquema



y, en donde X es O o S.

En una implementación, la X es O.

En una implementación, la región de complementariedad consiste en la secuencia de nucleótidos de 5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3’ (SEQ ID NO: 15).

En una implementación, el agente iRNA bicatenario comprende una cadena sentido que comprende la secuencia de nucleótidos de 5'-GGUUAACACCAUUUACUUCAA-3’ (SEQ ID NO: 16), y una cadena antisentido que comprende la secuencia de nucleótidos de 5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3' (SEQ ID NO: 15).

En una implementación, la cadena sentido comprende 5'-GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf-3’ (SEQ ID NO: 13) y la cadena antisentido comprende 5'-usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg-3' (SEQ ID NO: 14), en donde A, C, G y U son ribosa A, C, G o U; a, c, g y u son 2'-O-metil (2'-OMe) A, C, G o U; Af, Cf, Gf o Uf son 2'-flúor A, C, G o U; y s es un enlace fosforotioato.

En un aspecto, la presente invención proporciona métodos para prevenir al menos un síntoma en un sujeto, que tiene un trastorno, que se beneficiaría de la reducción en la expresión de Serpinc1. Los métodos incluyen administrar al sujeto una dosis fija aproximadamente 25 mg a aproximadamente 100 mg de un agente iRNA bicatenario comprende una cadena sentido y una cadena antisentido que forman una región bicatenaria, en donde la cadena sentido comprende al menos

15 nucleótidos contiguos diferentes en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 y la cadena antisentido comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 5, donde sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena sentido y sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena antisentido son nucleótidos modificados, y en donde el agente iRNA bicatenario comprende un ligando, *e.g., la cadena* sentido del agente iRNA bicatenario está conjugada con un ligando unido al extremo 3’ -terminal de la cadena sentido.

En otro aspecto, la presente invención proporciona métodos para tratar un sujeto, que tiene un trastorno, que se beneficiaría de la reducción en la expresión de Serpinc1. Los métodos incluyen administrar al sujeto una dosis fija aproximadamente 25 mg a aproximadamente 100 mg de un agente iRNA bicatenario, donde el agente iRNA bicatenario comprende una cadena sentido y una cadena antisentido que forman una región bicatenaria, en donde la cadena sentido comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 y la cadena antisentido comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 5, en el que sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena sentido y sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena antisentido son nucleótidos modificados, y en donde el agente iRNA bicatenario comprende un ligando, *e.g., la cadena* sentido

del agente iRNA bicatenario está conjugada con un ligando unido al extremo 3´ de la cadena sentido.

En una implementación, todos los nucleótidos de la cadena sentido y todos los nucleótidos de la cadena antisentido son nucleótidos modificados.

En otra implementación, la cadena sentido y la cadena antisentido comprenden una región de complementariedad que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de cualquiera de las secuencias enumeradas en cualquiera de las Tablas 2 y 3.

En algunas implementaciones, los nucleótidos modificados se seleccionan independientemente del grupo que consiste en un nucleótido 2'-O-metilo-modificado, un nucleótido 2'-flúor-modificado, un nucleótido que comprende un grupo 5'-fosforotioato y un nucleótido terminal unido a un derivado de colesterilo o un grupo bisdecilamida de ácido dodecanoico. En implementaciones adicionales, el nucleótido modificado se selecciona del grupo que consiste en un nucleótido 2'-desoxi-2'-flúor-modificado, un nucleótido 2'-desoxi-modificado, un nucleótido bloqueado, un nucleótido desbloqueado y un nucleótido restringido conformacionalmente, un nucleótido etilo restringido, un nucleótido abásico, un nucleótido 2'-amino-modificado, un nucleótido 2'-alquilo-modificado, un nucleótido 2'-O-alilo-modificado, un nucleótido 2'-C-alilo-modificado, un nucleótido 2'-

hidroxilo-modificado, un nucleótido morfolino, un fosforamidato y un nucleótido que comprende una base no natural.

En otra implementación del agente iRNA bicatenario, al menos una cadena comprende un saliente 3´ de al menos 1 nucleótido. En otra implementación, al menos una cadena comprende un saliente 3´ de al menos 2 nucleótidos, *e.g.* 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 nucleótidos. En otras implementaciones, al menos una cadena del agente iRNA comprende un saliente en 5’ de al menos 1 nucleótido. En ciertas implementaciones, al menos una cadena comprende un saliente 5’ de al menos 2 nucleótidos, *e.g.* 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 nucleótidos. En aún otras implementaciones, tanto el extremo 3’ como el extremo 5' de una cadena del agente iRNA comprenden un saliente de al menos 1 nucleótido.

En otro aspecto, la presente invención proporciona métodos para prevenir al menos un síntoma en un sujeto, que tiene un trastorno, que se beneficiaría de la reducción en la expresión de Serpinc1. Los métodos incluyen administrar al sujeto una dosis fija aproximadamente 25 mg a aproximadamente 100 mg de un agente iRNA bicatenario, donde el agente iRNA bicatenario comprende una cadena sentido complementaria a una cadena antisentido, en donde la cadena antisentido comprende una región de complementariedad a Parte de un mRNA que codifica Serpinc1, en el que cada cadena tiene una longitud de aproximadamente 14 a

aproximadamente 30 nucleótidos, en la que el agente iRNA bicatenario está representado por la fórmula (IIIe):

sentido: 5'-N_a-Y Y Y-N_a-3'

antisentido: 3' n_p'-N_a'-Y'Y'Y'-N_a'-5' (IIIe)

donde:

n_p' es un saliente de 2 nucleótidos y cada nucleótido dentro de n_p' está conectado a un nucleótido vecino a través de un enlace fosforotioato;

cada N_a y N_a' representan independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 0-25 nucleótidos que están modificados o no modificados o combinaciones de los mismos, cada secuencia comprende al menos dos nucleótidos modificados de forma diferente;

YYY y Y'Y'Y' representan cada uno independientemente un motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos, y en el que las modificaciones son modificaciones 2'-O-metilo o 2'-flúor;

en el que la cadena sentido y la cadena antisentido comprenden cada una independientemente dos enlaces fosforotioato en el extremo 5'; y

en el que la cadena sentido está conjugada con al menos un ligando, donde el ligando es uno o más derivados GalNAc unidos a través de un enlazador ramificado monovalente, bivalente o trivalente, evitando así al menos un síntoma en el sujeto, que tiene un trastorno, que se beneficiaría de la reducción en la expresión de Serpinc1.

En otro aspecto, la presente invención proporciona métodos para tratar un sujeto, que tiene un trastorno, que se beneficiaría de la reducción en la expresión de Serpinc1. Los métodos incluyen administrar al sujeto una dosis fija aproximadamente 25 mg a aproximadamente 100 mg de un agente iRNA bicatenario, donde el agente iRNA bicatenario comprende una cadena sentido complementaria a una cadena antisentido, en donde la cadena antisentido comprende una región de complementariedad a Parte de un mRNA que codifica Serpinc1, en el que cada cadena tiene una longitud de aproximadamente 14 a aproximadamente 30 nucleótidos, en la que el agente iRNA bicatenario está representado por la fórmula (IIIe):

sentido: 5'-N_a-Y Y Y-N_a-3'

antisentido: 3' n_p'-N_a'-Y'Y'Y'-N_a'-5' (IIIe)

donde:

n_p' es un saliente de 2 nucleótidos y cada nucleótido dentro de n_p' está conectado a un nucleótido vecino a través de un enlace fosforotioato;

cada N_a y N_a' representan independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 0-25 nucleótidos que están modificados o no modificados o combinaciones de los mismos, cada secuencia comprende al menos dos nucleótidos modificados de forma diferente;

YYY y Y'Y'Y' representan cada uno independientemente un motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos, y en el que las modificaciones son modificaciones 2'-O-metilo o 2'-flúor;

en el que la cadena sentido y la cadena antisentido comprenden cada una independientemente dos enlaces fosforotioato en el extremo 5'; y

en el que la cadena sentido está conjugada con al menos un ligando, donde el ligando es uno o más derivados GalNAc unidos a través de un enlazador ramificado monovalente, bivalente o trivalente, evitando así al menos un síntoma en el sujeto, que tiene un trastorno, que se beneficiaría de la reducción en la expresión de Serpinc1.

En una implementación, el agente iRNA bicatenario se administra al sujeto en una dosis única o en dos o más dosis, *e.g.* en 3, 4, 5 o 6 dosis.

En una implementación, el agente iRNA bicatenario se administra al sujeto una vez al mes, una vez cada cinco semanas, una vez cada seis semanas, una vez cada siete semanas, una vez cada 2 meses, una vez por trimestre o según sea necesario.

El agente iRNA bicatenario se puede administrar al sujeto como, *e.g.* una dosis fija de entre aproximadamente 25 mg a aproximadamente 100 mg, *e.g.* entre aproximadamente 25 mg a aproximadamente 95 mg, entre aproximadamente 25 mg a aproximadamente 90 mg, entre aproximadamente 25 mg a aproximadamente 85 mg, entre aproximadamente 25 mg a aproximadamente 80 mg, entre aproximadamente 25 mg a aproximadamente 75 mg, entre aproximadamente 25 mg a aproximadamente 70 mg, entre aproximadamente 25

mg a aproximadamente 65 mg, entre aproximadamente 25 mg a aproximadamente 60 mg, entre aproximadamente 25 mg a aproximadamente 50 mg, entre aproximadamente 50 mg a aproximadamente 100 mg, entre aproximadamente 50 mg a aproximadamente 95 mg, entre aproximadamente 50 mg a aproximadamente 90 mg, entre aproximadamente 50 mg a aproximadamente 85 mg, entre aproximadamente 50 mg y aproximadamente 80 mg, entre aproximadamente 30 mg y aproximadamente 100 mg, entre aproximadamente 30 mg y aproximadamente 90 mg, entre aproximadamente 30 mg y aproximadamente 80 mg, entre aproximadamente 40 mg y aproximadamente 100 mg, entre aproximadamente 40 mg a aproximadamente 90 mg, entre aproximadamente 40 mg a aproximadamente 80 mg, entre aproximadamente 60 mg a aproximadamente 100 mg, entre aproximadamente 60 mg a aproximadamente 90 mg, entre aproximadamente 25 mg a aproximadamente 55 mg, entre aproximadamente 25 mg a aproximadamente 65 mg, entre aproximadamente 30 mg a aproximadamente 95 mg, entre aproximadamente 30 mg a aproximadamente 85 mg, entre aproximadamente 30 mg a aproximadamente 75 mg, entre aproximadamente 30 mg a aproximadamente 65 mg, entre aproximadamente 30 mg a aproximadamente 55 mg, entre aproximadamente 40 mg a aproximadamente 95 mg, entre aproximadamente 40 mg a aproximadamente 85 mg, entre aproximadamente 40 mg a aproximadamente 75 mg, entre aproximadamente 40 mg a aproximadamente 65 mg, entre aproximadamente 40 mg a aproximadamente 55 mg, o entre

aproximadamente 45 mg a aproximadamente 95 mg como, *e.g.* una dosis fija para uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho meses o más.

En algunas implementaciones, el agente iRNA bicatenario se puede administrar al sujeto en una dosis fija aproximadamente 25 mg, aproximadamente 30 mg, aproximadamente 35 mg, aproximadamente 40 mg, aproximadamente 45 mg, aproximadamente 50 mg, aproximadamente 55 mg, aproximadamente 60 mg, aproximadamente 65 mg, aproximadamente 70 mg, aproximadamente 75 mg, aproximadamente 80 mg, aproximadamente 85 mg, aproximadamente 90 mg, aproximadamente 95 mg, o aproximadamente 100 mg.

El sujeto puede ser un humano, tal como un ser humano que tiene un trastorno hemorrágico, tal como un trastorno hemorrágico adquirido o un trastorno hemorrágico hereditario, *e.g.* una hemofilia, *e.g.* hemofilia A, hemofilia B o hemofilia C.

En una implementación, el sujeto tiene una hemofilia A y es un sujeto inhibidor. En otra implementación, el sujeto tiene una hemofilia B y es un sujeto inhibidor. En otra implementación más, el sujeto tiene una hemofilia C y es un sujeto inhibidor.

En una implementación, la administración del agente iRNA bicatenario al sujeto provoca un aumento en la coagulación de la sangre y/o una disminución en la acumulación de proteína Serpinc1.

En una implementación, los métodos comprenden además medir los niveles de trombina en el sujeto.

El agente iRNA bicatenario se puede administrar por vía subcutánea o intravenosa.

En una implementación, sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena antisentido y sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena sentido del agente iRNA comprenden una modificación seleccionada del grupo que consiste en una modificación 2'-O-metilo y una modificación 2'-flúor. En una implementación, todos los nucleótidos de la cadena sentido y todos los nucleótidos de la cadena antisentido del agente iRNA son nucleótidos modificados.

En una implementación, el motivo YYY se produce en o cerca del sitio de escisión de la cadena sentido.

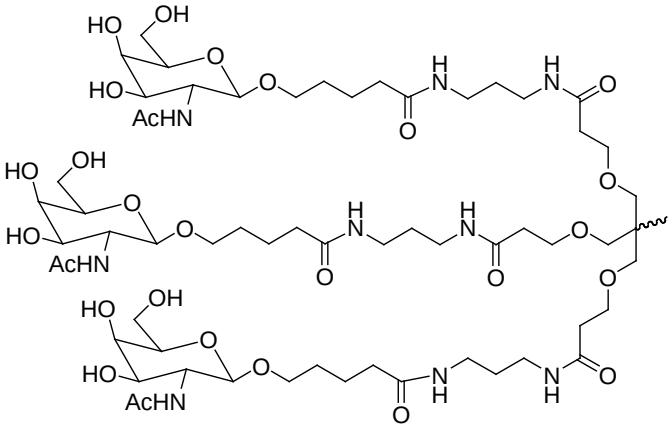
En una implementación, el motivo Y'Y'Y' aparece en las posiciones 11, 12 y 13 de la cadena antisentido desde el extremo 5'.

La región bicatenaria puede tener 15-30 pares de nucleótidos de longitud, 17-23 pares de nucleótidos de longitud, 17-25 pares de nucleótidos de longitud, 23-27 pares de nucleótidos de longitud, 19-21 pares de nucleótidos de longitud, o 21-23 pares de nucleótidos de longitud.

Cada cadena puede tener 15-30 nucleótidos o 19-30 nucleótidos.

En una implementación, la cadena sentido tiene un total de 21 nucleótidos y la cadena antisentido tiene un total de 23 nucleótidos.

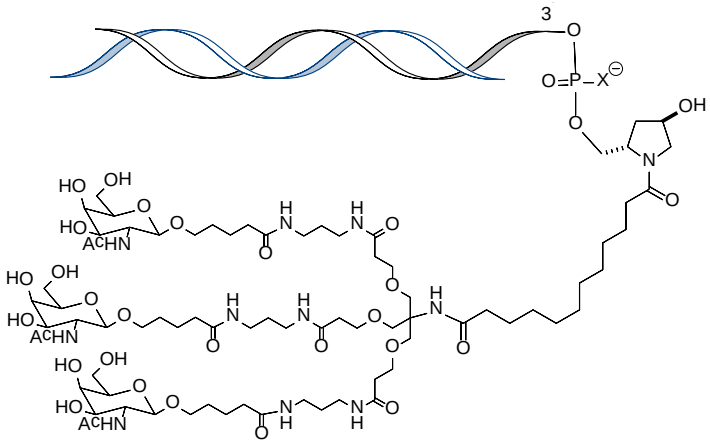
En una implementación, el ligando es



.

En una implementación, el ligando está unido al extremo 3´ de la cadena sentido.

En una implementación, el agente iRNA se conjuga con el ligando como se muestra en el siguiente esquema



donde X es O o S.

En una implementación, el par de bases en la posición 1 del extremo 5´ de la cadena antisentido del dúplex es un par de bases AU.

En una implementación, el agente iRNA es AD-57213 ((Sentido (5' a 3'): GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf (SEQ ID NO: 13); antisentido (5' a 3'): usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg (SEQ ID NO: 14), en donde A, C, G y U son ribosa A, C, G o U; a, c, g y u son 2'-O-metilo (2'-OMe) A, C, G o U; Af, Cf, Gf o Uf son 2'-flúor A, C, G o U; y s es un enlace fosforotioato)).

En una implementación, el agente se administra como una composición farmacéutica. En una implementación, el agente iRNA se administra en una solución no tamponada, tal como solución salina o agua.

En otra implementación, el siRNA se administra con una solución tampón, tal como una solución tampón que comprende acetato, citrato, prolamina, carbonato o fosfato o cualquier combinación de los mismos. En una implementación, la solución tampón es solución salina tamponada con fosfato (PBS).

En un aspecto, la presente invención proporciona métodos para prevenir al menos un síntoma en un sujeto, que tiene un trastorno, que se beneficiaría de la reducción en la expresión de Serpinc1. Los métodos incluyen administrar al sujeto una dosis fija aproximadamente 25 mg a aproximadamente 100 mg de un agente de ácido ribonucleico de doble cadena (iRNA), donde el agente iRNA bicatenario comprende una cadena sentido y una cadena antisentido, la cadena antisentido comprende una región de complementariedad que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de 5’-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3' (SEQ ID NO: 15), donde sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena sentido y sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena antisentido son nucleótidos modificados, y en donde el agente iRNA bicatenario comprende un ligando, *e.g., la cadena* sentido

del agente iRNA bicatenario está conjugada con un ligando unido en el extremo 3´ de la cadena sentido.

En otro aspecto, la presente invención proporciona métodos para tratar un sujeto, que tiene un trastorno, que se beneficiaría de la reducción en la expresión de Serpinc1. Los métodos incluyen administrar al sujeto una dosis fija aproximadamente 25 mg a aproximadamente 100 mg de un agente de ácido ribonucleico de doble cadena (iRNA), donde el agente iRNA bicatenario comprende una cadena sentido y una cadena antisentido, la cadena antisentido comprende una región de complementariedad que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de 5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3' (SEQ ID NO: 15), donde sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena sentido y sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena antisentido son nucleótidos modificados, y en donde el agente iRNA bicatenario comprende un ligando, *e.g., la cadena* sentido del agente iRNA bicatenario está conjugada con un ligando unido en el extremo 3´ de la cadena sentido.

El agente iRNA bicatenario se puede administrar al sujeto en dos o más dosis.

En algunas implementaciones, el agente iRNA bicatenario se administra al sujeto una vez al mes, una vez cada cinco semanas, una vez cada seis semanas,

una vez cada siete semanas, una vez cada 2 meses, una vez al trimestre o según sea necesario.

En una implementación, el agente iRNA bicatenario se administra al sujeto una vez al mes. En otra implementación, el agente iRNA bicatenario se administra al sujeto una vez cada seis semanas. En una implementación, el agente iRNA bicatenario se administra al sujeto una vez cada 2 meses. En otra implementación más, el agente iRNA bicatenario se administra al sujeto una vez por trimestre.

El agente iRNA bicatenario se puede administrar al sujeto como, *e.g.* una dosis fija de entre aproximadamente 25 mg a aproximadamente 100 mg, *e.g.* entre aproximadamente 25 mg a aproximadamente 95 mg, entre aproximadamente 25 mg a aproximadamente 90 mg, entre aproximadamente 25 mg a aproximadamente 85 mg, de aproximadamente 25 mg a aproximadamente 80 mg, de aproximadamente 25 mg a aproximadamente 75 mg, de aproximadamente 25 mg a aproximadamente 70 mg, de aproximadamente 25 mg a aproximadamente 65 mg, de aproximadamente 25 mg a aproximadamente 60 mg, entre aproximadamente 25 mg a aproximadamente 50 mg, entre aproximadamente 50 mg a aproximadamente 100 mg, entre aproximadamente 50 mg a aproximadamente 95 mg, entre aproximadamente 50 mg a aproximadamente 90 mg, entre aproximadamente 50 mg a aproximadamente 85 mg, entre aproximadamente 50 mg a aproximadamente 80 mg, entre aproximadamente 30 mg a aproximadamente 100 mg, entre aproximadamente 30 mg a

aproximadamente 90 mg, entre aproximadamente 30 mg a aproximadamente 80 mg, entre aproximadamente 40 mg a aproximadamente 100 mg, entre aproximadamente 40 mg a aproximadamente 90 mg, entre aproximadamente 40 mg a aproximadamente 80 mg, entre aproximadamente 60 mg a aproximadamente 100 mg, entre aproximadamente 60 mg a aproximadamente 90 mg, entre aproximadamente 25 mg a aproximadamente 55 mg, entre aproximadamente 25 mg a aproximadamente 65 mg, entre aproximadamente 30 mg a aproximadamente 95 mg, entre aproximadamente 30 mg a aproximadamente 85 mg, entre aproximadamente 30 mg a aproximadamente 75 mg, entre aproximadamente 30 mg a aproximadamente 65 mg, entre aproximadamente 30 mg a aproximadamente 55 mg, entre aproximadamente 40 mg a aproximadamente 95 mg, entre aproximadamente 40 mg a aproximadamente 85 mg, entre aproximadamente 40 mg a aproximadamente 75 mg, entre aproximadamente 40 mg a aproximadamente 65 mg, entre aproximadamente 40 mg a aproximadamente 55 mg, o entre aproximadamente 45 mg a aproximadamente 95 mg.

En algunas implementaciones, el agente iRNA bicatenario se puede administrar en una dosis fija aproximadamente 25 mg, aproximadamente 30 mg, aproximadamente 35 mg, aproximadamente 40 mg, aproximadamente 45 mg, aproximadamente 50 mg, aproximadamente 55 mg, aproximadamente 60 mg, aproximadamente. 65 mg, aproximadamente 70 mg, aproximadamente 75 mg,

aproximadamente 80 mg, aproximadamente 85 mg, aproximadamente 90 mg, aproximadamente 95 mg, o aproximadamente 100 mg.

En algunas implementaciones, el agente iRNA bicatenario se administra al sujeto en una dosis fija aproximadamente 25 mg; o en una dosis fija aproximadamente 50 mg; o en una dosis fija aproximadamente 80 mg; o en una dosis fija aproximadamente 100 mg.

En una implementación, el agente iRNA bicatenario se administra al sujeto por vía subcutánea.

En una implementación, la administración de la dosis del agente iRNA bicatenario al sujeto reduce la actividad de Serpinc1 en el sujeto en aproximadamente 70% a aproximadamente 95%, aproximadamente 70% a aproximadamente 80%, aproximadamente 80% a aproximadamente 90%, aproximadamente 90 % a aproximadamente 95%, o en más de 95%.

En otra implementación, la administración de la dosis del agente iRNA bicatenario al sujeto aumenta los niveles pico de trombina en el sujeto dentro del intervalo de niveles pico de trombina en un sujeto, que no tiene un trastorno, que se beneficiaría de la reducción en la expresión de Serpinc1.

En una implementación, la administración de la dosis del agente iRNA bicatenario al sujeto es suficiente para alcanzar los niveles pico de generación de trombina en el sujeto hasta aproximadamente el mismo nivel alcanzado mediante la administración del Factor VIII al sujeto.

En otra implementación, la administración de la dosis del agente iRNA bicatenario al sujeto es suficiente para alcanzar niveles pico de generación de trombina de más de aproximadamente 40%, 45%, 50%, 55% o más de aproximadamente 60% en el sujeto .

En otra implementación más, la administración de la dosis del agente iRNA bicatenario al sujeto disminuye la tasa de sangrado anual (ABR) del sujeto en aproximadamente 80% a aproximadamente 95%, aproximadamente 80% a aproximadamente 85%, aproximadamente 85% a aproximadamente 90%, o aproximadamente 90% a aproximadamente 95%, en comparación con la mediana histórica sobre la demanda ABR de sujetos, que tienen un trastorno, que se beneficiarían de la reducción en la expresión de Serpinc1 a los que no se les administra el agente iRNA bicatenario.

En una implementación, el agente iRNA bicatenario se administra con una solución tampón, tal como una solución tampón que comprende acetato, citrato, prolamina, carbonato o fosfato o cualquier combinación de los mismos. En una

implementación, la solución tampón es solución salina tamponada con fosfato (PBS).

En una implementación, el sujeto es un ser humano.

El trastorno puede ser un trastorno hemorrágico, tal como un trastorno hemorrágico adquirido o un trastorno hemorrágico hereditario, *e.g.* una hemofilia, *e.g.* hemofilia A, hemofilia B o hemofilia C.

En una implementación, el sujeto tiene una hemofilia A y es un sujeto inhibidor. En otra implementación, el sujeto tiene una hemofilia B y es un sujeto inhibidor. En otra implementación más, el sujeto tiene una hemofilia C y es un sujeto inhibidor.

En una implementación, el agente iRNA bicatenario se administra al sujeto por vía subcutánea.

En una implementación, todos los nucleótidos de la cadena sentido y todos los nucleótidos de la cadena antisentido son nucleótidos modificados.

En una implementación, los nucleótidos modificados se seleccionan independientemente del grupo que consiste en un nucleótido 2’-desoxi-2’-flúor modificado, un nucleótido 2'-desoxi-modificado, un nucleótido bloqueado, un

nucleótido abásico, un nucleótido 2-amino-modificado, un nucleótido 2-alquilo-modificado, un nucleótido morfolino, un fosforamidato y un nucleótido que comprende una base no natural.

La región de complementariedad puede tener al menos 17 nucleótidos de longitud o 19 nucleótidos de longitud.

En una implementación, la región de complementariedad tiene entre 19 y 21 nucleótidos de longitud. En otra implementación, la región de complementariedad tiene entre 21 y 23 nucleótidos de longitud.

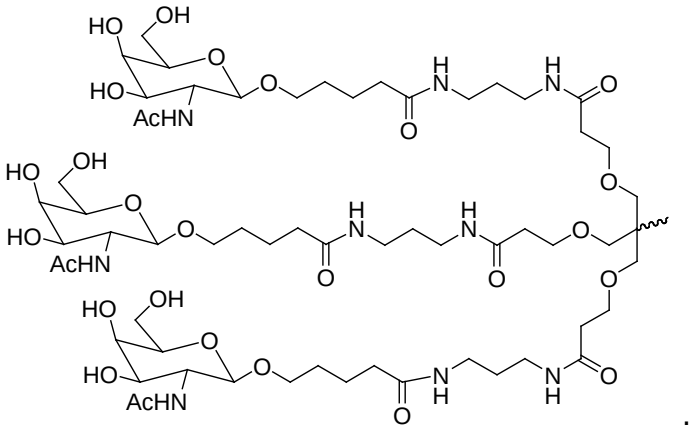
En una implementación, cada cadena no tiene más de 30 nucleótidos de longitud.

Al menos una cadena del agente iRNA bicatenario puede comprender un saliente 3´ de al menos 1 nucleótido o un saliente 3' de al menos 2 nucleótidos, *e.g.* 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 nucleótidos. En otras implementaciones, al menos una cadena del agente iRNA comprende un saliente en 5’ de al menos 1 nucleótido. En ciertas implementaciones, al menos una cadena comprende un saliente 5’ de al menos 2 nucleótidos, *e.g.* 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 nucleótidos. En aún otras implementaciones, tanto el extremo 3’ como el extremo 5' de una cadena del agente iRNA comprenden un saliente de al menos 1 nucleótido.

En ciertas implementaciones, el ligando es una N-acetilgalactosamina (GalNAc). El ligando puede ser uno o más GalNAc unidos al agente iRNA a través de un enlazador ramificado monovalente, bivalente o trivalente. El ligando se puede conjugar con el extremo 3´ de la cadena sentido del agente iRNA bicatenario, el extremo 5' de la cadena sentido del agente iRNA bicatenario, el extremo 3´ de la cadena antisentido del agente iRNA bicatenario, o el extremo 5’ de la cadena antisentido del agente iRNA bicatenario.

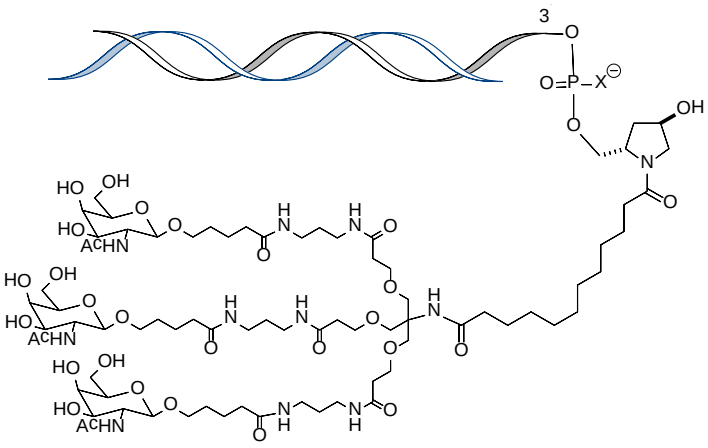
En algunas implementaciones, los agentes iRNA de doble cadena de la invención comprenden una pluralidad, *e.g.* 2, 3, 4, 5 o 6 de GalNAc, cada uno unido independientemente a una pluralidad de nucleótidos del agente iRNA bicatenario a través de una pluralidad de enlazadores monovalentes.

En ciertas implementaciones, el ligando es



.

En una implementación, el agente iRNA se conjuga con el ligando como se muestra en el siguiente esquema.



y, en donde X es O o S.

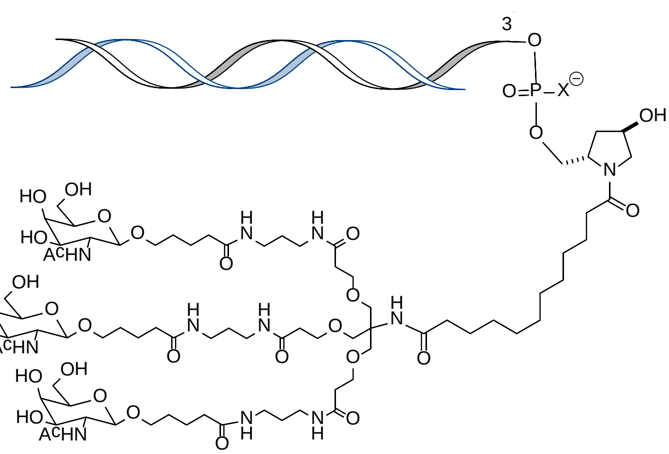
En una implementación, la X es O.

En una implementación, la región de complementariedad consiste en la secuencia de nucleótidos de 5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3’ (SEQ ID NO: 15).

En una implementación, el agente iRNA bicatenario comprende una cadena sentido que comprende la secuencia de nucleótidos de 5'-GGUUAACACCAUUUACUUCAA-3’ (SEQ ID NO: 16), y una cadena antisentido que comprende la secuencia de nucleótidos de 5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3' (SEQ ID NO: 15).

En una implementación, la cadena sentido comprende 5'-GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf-3’ (SEQ ID NO: 13) y la cadena antisentido comprende 5'-usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg-3' (SEQ ID NO: 14), en donde A, C, G y U son ribosa A, C, G o U; a, c, g y u son 2'-O-metil (2'-OMe) A, C, G o U; Af, Cf, Gf o Uf son 2'-flúor A, C, G o U; y s es un enlace fosforotioato.

En una implementación, la cadena sentido comprende 5'-GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf-3’ (SEQ ID NO: 13) y la cadena antisentido comprende 5'-usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg-3' (SEQ ID NO: 14), en donde A, C, G y U son ribosa A, C, G o U; a, c, g y u son 2'-O-metil (2'-OMe) A, C, G o U; Af, Cf, Gf o Uf son 2'-flúor A, C, G o U; y s es un enlace fosforotioato; y en el que la cadena sentido está conjugada con el ligando como se muestra en el siguiente esquema



, en donde X es O o S.

En una implementación, el agente se administra como una composición farmacéutica. En una implementación, el agente iRNA se administra en una solución no tamponada, tal como solución salina o agua.

En otra implementación, el siRNA se administra con una solución tampón, tal como una solución tampón que comprende acetato, citrato, prolamina, carbonato o fosfato o cualquier combinación de los mismos. En una implementación, la solución tampón es solución salina tamponada con fosfato (PBS).

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona kits para realizar los métodos de la invención. Los kits pueden incluir un agente iRNA de la invención, y las instrucciones de uso, y opcionalmente, medios para administrar el agente iRNA al sujeto.

En un aspecto, la presente invención proporciona métodos para prevenir al menos un síntoma en un sujeto, que tiene un trastorno, que se beneficiaría de la reducción en la expresión de Serpinc1. Los métodos incluyen administrar al sujeto una dosis fija aproximadamente 50 mg de un agente de ácido ribonucleico de doble cadena (iRNA), en el que la dosis fija del agente iRNA bicatenario se administra al sujeto aproximadamente una vez al mes, en el que el agente iRNA bicatenario comprende una cadena sentido y una cadena antisentido, la cadena antisentido comprende una región de complementariedad que comprende al

menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de 5’-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3' (SEC ID NO.: 15), donde sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena sentido y sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena antisentido son nucleótidos modificados, y en donde la cadena sentido está conjugada con un ligando unido en el extremo 3’ , evitando así al menos un síntoma en el sujeto, que tiene un trastorno, que se beneficiaría de la reducción en la expresión de Serpinc1.

En otro aspecto, la presente invención proporciona métodos para tratar un sujeto, que tiene un trastorno, que se beneficiaría de la reducción en la expresión de Serpinc1. Los métodos incluyen administrar al sujeto una dosis fija aproximadamente 50 mg de un agente de ácido ribonucleico de doble cadena (iRNA), en el que la dosis fija del agente iRNA bicatenario se administra al sujeto aproximadamente una vez al mes, en el que el agente iRNA bicatenario comprende una cadena sentido y una cadena antisentido, la cadena antisentido comprende una región de complementariedad que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de 5’-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3' (SEC ID NO.: 15), donde sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena sentido y sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena antisentido son nucleótidos modificados, y en el que la cadena sentido está conjugada con un ligando unido en el extremo 3’ , tratando de este modo al sujeto que tiene una trastorno que se beneficiaría de la reducción en la expresión de Serpinc1.

En un aspecto, la presente invención proporciona métodos para prevenir al menos un síntoma en un sujeto, que tiene un trastorno, que se beneficiaría de la reducción en la expresión de Serpinc1. Los métodos incluyen administrar al sujeto una dosis fija aproximadamente 80 mg de un agente de ácido ribonucleico de cadena doble (iRNA), en el que la dosis fija del agente iRNA bicatenario se administra al sujeto aproximadamente una vez al mes, en el que el agente iRNA bicatenario comprende una cadena sentido y una cadena antisentido, la cadena antisentido comprende una región de complementariedad que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de 5’ -UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG – 3’ (SEQ ID NO: 15), en el que sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena sentido y sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena antisentido son nucleótidos modificados, y en el que la cadena sentido está conjugada con un ligando unido en el extremo 3’ , evitando así al menos un síntoma en el sujeto, que tiene un trastorno, que se beneficiaría de la reducción en la expresión de Serpinc1.

En otro aspecto, la presente invención proporciona métodos para tratar un sujeto, que tiene un trastorno, que se beneficiaría de la reducción en la expresión de Serpinc1. Los métodos incluyen administrar al sujeto una dosis fija aproximadamente 80 mg de un agente de ácido ribonucleico de cadena doble (iRNA), en el que la dosis fija del agente iRNA bicatenario se administra al sujeto aproximadamente una vez al mes, en el que el agente iRNA bicatenario comprende una cadena sentido y una cadena antisentido, la cadena antisentido

comprende una región de complementariedad que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de 5’-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3' (SEC ID NO.: 15), donde sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena sentido y sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena antisentido son nucleótidos modificados, y en el que la cadena sentido está conjugada con un ligando unido en el extremo 3’ , tratando de este modo al sujeto que tiene una trastorno que se beneficiaría de la reducción en la expresión de Serpinc1.

En una implementación, la administración de la dosis del agente iRNA bicatenario al sujeto reduce la actividad de Serpinc1 en el sujeto en aproximadamente 70% a aproximadamente 95%, aproximadamente 70% a aproximadamente 80%, aproximadamente 80% a aproximadamente 90%, aproximadamente 90 % a aproximadamente 95%, o en más de 95%.

En otra implementación, la administración de la dosis del agente iRNA bicatenario al sujeto aumenta los niveles pico de trombina en el sujeto dentro del intervalo de niveles pico de trombina en un sujeto, que no tiene un trastorno, que se beneficiaría de la reducción en la expresión de Serpinc1.

En una implementación, la administración de la dosis del agente iRNA bicatenario al sujeto es suficiente para alcanzar los niveles pico de generación de

trombina en el sujeto hasta aproximadamente el mismo nivel alcanzado mediante la administración del Factor VIII al sujeto.

En otra implementación, la administración de la dosis del agente iRNA bicatenario al sujeto es suficiente para alcanzar niveles pico de generación de trombina de más de aproximadamente 40%, 45%, 50%, 55% o más de aproximadamente 60% en el sujeto .

En otra implementación más, la administración de la dosis del agente iRNA bicatenario al sujeto disminuye la tasa de sangrado anual (ABR) del sujeto en aproximadamente 80% a aproximadamente 95%, aproximadamente 80% a aproximadamente 85%, aproximadamente 85% a aproximadamente 90%, o aproximadamente 90% a aproximadamente 95%, en comparación con la mediana histórica sobre la demanda ABR de sujetos, que tienen un trastorno, que se beneficiarían de la reducción en la expresión de Serpinc1 a la que no se administró el agente iRNA bicatenario.

En una implementación, el agente iRNA bicatenario se administra con una solución tampón, tal como una solución tampón que comprende acetato, citrato, prolamina, carbonato o fosfato o cualquier combinación de los mismos. En una implementación, la solución tampón es solución salina tamponada con fosfato (PBS).

En una implementación, el sujeto es un ser humano.

El trastorno puede ser un trastorno hemorrágico, tal como un trastorno hemorrágico adquirido o un trastorno hemorrágico hereditario, *e.g.* una hemofilia, *e.g.* hemofilia A, hemofilia B o hemofilia C.

En una implementación, el sujeto tiene una hemofilia A y es un sujeto inhibidor. En otra implementación, el sujeto tiene una hemofilia B y es un sujeto inhibidor. En otra implementación más, el sujeto tiene una hemofilia C y es un sujeto inhibidor.

En una implementación, el agente iRNA bicatenario se administra al sujeto por vía subcutánea.

En una implementación, todos los nucleótidos de la cadena sentido y todos los nucleótidos de la cadena antisentido son nucleótidos modificados.

En una implementación, los nucleótidos modificados se seleccionan independientemente del grupo que consiste en un nucleótido 2'-desoxi-2'-flúor modificado, un nucleótido 2'-desoxi-modificado, un nucleótido bloqueado, un nucleótido abásico, un nucleótido 2'-amino-modificado, un nucleótido 2’-alquilo-modificado, un nucleótido morfolino, un fosforamidato y un nucleótido que comprende una base no natural.

La región de complementariedad puede tener al menos 17 nucleótidos de longitud o 19 nucleótidos de longitud.

En una implementación, la región de complementariedad tiene entre 19 y 21 nucleótidos de longitud. En otra implementación, la región de complementariedad tiene entre 21 y 23 nucleótidos de longitud.

En una implementación, cada cadena no tiene más de 30 nucleótidos de longitud.

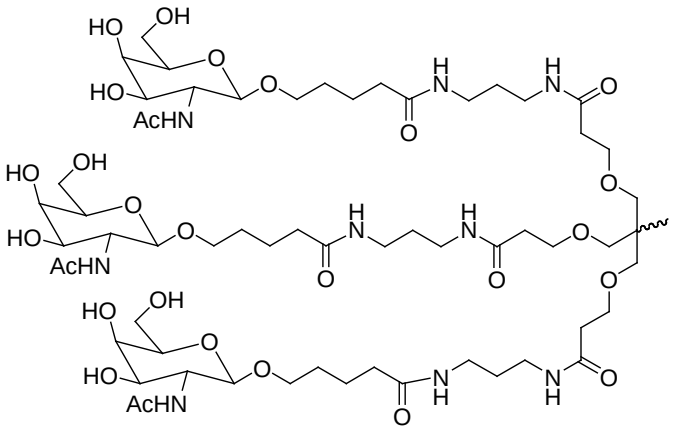
Al menos una cadena del agente iRNA bicatenario puede comprender un saliente 3´ de al menos 1 nucleótido o un saliente 3' de al menos 2 nucleótidos, *e.g.* 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 nucleótidos. En otras implementaciones, al menos una cadena del agente iRNA comprende un saliente en 5’ de al menos 1 nucleótido. En ciertas implementaciones, al menos una cadena comprende un saliente 5’ de al menos 2 nucleótidos, *e.g.* 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 nucleótidos. En aún otras implementaciones, tanto el extremo 3’ como el extremo 5' de una cadena del agente iRNA comprenden un saliente de al menos 1 nucleótido.

En ciertas implementaciones, el ligando es una N-acetilgalactosamina (GalNAc). El ligando puede ser uno o más GalNAc unidos al agente iRNA a través de un enlazador ramificado monovalente, bivalente o trivalente. El ligando se

puede conjugar con el extremo 3´ de la cadena sentido del agente iRNA bicatenario, el extremo 5' de la cadena sentido del agente iRNA bicatenario, el extremo 3´ de la cadena antisentido del agente iRNA bicatenario, o el extremo 5’ de la cadena antisentido del agente iRNA bicatenario.

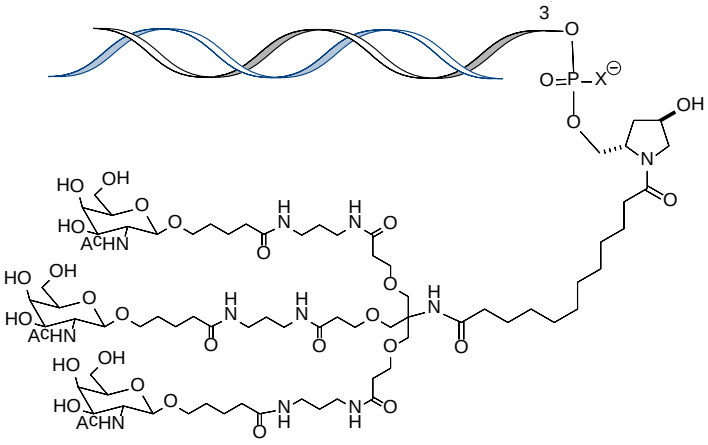
En algunas implementaciones, los agentes iRNA de doble cadena de la invención comprenden una pluralidad, *e.g.* 2, 3, 4, 5 o 6 de GalNAc, cada uno unido independientemente a una pluralidad de nucleótidos del agente iRNA bicatenario a través de una pluralidad de enlazadores monovalentes.

En ciertas implementaciones, el ligando es



.

En una implementación, el agente iRNA se conjuga con el ligando como se muestra en el siguiente esquema



y, en donde X es O o S.

En una implementación, la X es O.

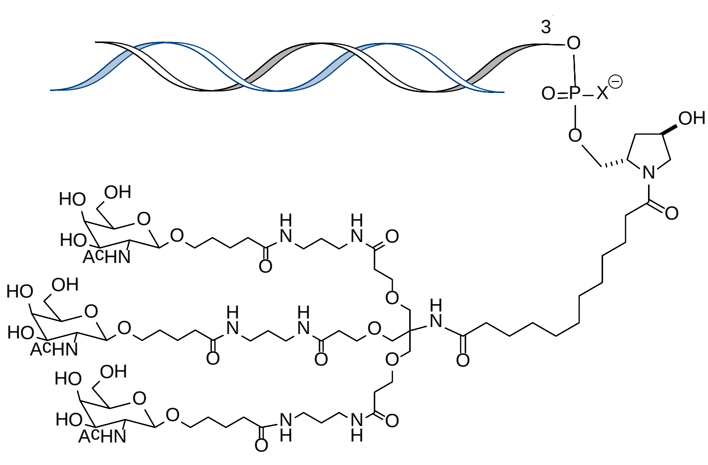
En una implementación, la región de complementariedad consiste en la secuencia de nucleótidos de 5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3’ (SEQ ID NO: 15).

En una implementación, el agente iRNA bicatenario comprende una cadena sentido que comprende la secuencia de nucleótidos de 5'-GGUUAACACCAUUUACUUCAA-3’ (SEQ ID NO: 16), y una cadena antisentido que comprende la secuencia de nucleótidos de 5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3' (SEQ ID NO: 15).

En una implementación, la cadena sentido comprende 5'-GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf-3’ (SEQ ID NO: 13) y la cadena

antisentido comprende 5'-usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg-3' (SEQ ID NO: 14), en donde A, C, G y U son ribosa A, C, G o U; a, c, g y u son 2'-O-metil (2'-OMe) A, C, G o U; Af, Cf, Gf o Uf son 2'-flúor A, C, G o U; y s es un enlace fosforotioato.

En una implementación, la cadena sentido comprende 5'-GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf-3’ (SEQ ID NO: 13) y la cadena antisentido comprende 5'-usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg-3' (SEQ ID NO: 14), en donde A, C, G y U son ribosa A, C, G o U; a, c, g y u son 2'-O-metil (2'-OMe) A, C, G o U; Af, Cf, Gf o Uf son 2'-flúor A, C, G o U; y s es un enlace fosforotioato; y en el que la cadena sentido está conjugada con el ligando como se muestra en el siguiente esquema



y, en donde X es O o S.

En una implementación, el agente se administra como una composición farmacéutica. En una implementación, el agente iRNA se administra en una solución no tamponada, tal como solución salina o agua.

En otra implementación, el siRNA se administra con una solución tampón, tal como una solución tampón que comprende acetato, citrato, prolamina, carbonato o fosfato o cualquier combinación de los mismos. En una implementación, la solución tampón es solución salina tamponada con fosfato (PBS).

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona kits para realizar los métodos de la invención. Los kits pueden incluir un agente iRNA de la invención, y las instrucciones de uso, y opcionalmente, medios para administrar el agente iRNA al sujeto.

En un aspecto, la presente invención proporciona métodos para prevenir al menos un síntoma en un sujeto, que tiene un trastorno, que se beneficiaría de la reducción en la expresión de Serpinc1. Los métodos incluyen administrar al sujeto una dosis fija aproximadamente 50 mg de un agente de ácido ribonucleico de doble cadena (iRNA), en el que la dosis fija del agente iRNA bicatenario se administra al sujeto aproximadamente una vez al mes, en el que el agente iRNA bicatenario comprende una cadena sentido y una cadena antisentido, la cadena antisentido comprende una región de complementariedad que comprende al

menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de 5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3' (SEQ ID NO: 15), en donde sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena sentido y sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena antisentido son nucleótidos modificados, y en el que la cadena sentido está conjugada con un ligando unido en el extremo 3' , evitando así al menos un síntoma en el sujeto, que tiene un trastorno, que se beneficiaría de la reducción en la expresión de Serpinc1.

En otro aspecto, la presente invención proporciona métodos para tratar un sujeto, que tiene un trastorno, que se beneficiaría de la reducción en la expresión de Serpinc1. Los métodos incluyen administrar al sujeto una dosis fija aproximadamente 50 mg de un agente de ácido ribonucleico de doble cadena (iRNA), en el que la dosis fija del agente iRNA bicatenario se administra al sujeto aproximadamente una vez al mes, en el que el agente iRNA bicatenario comprende una cadena sentido y una cadena antisentido, la cadena antisentido comprende una región de complementariedad que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de 5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3' (SEQ ID NO: 15), en donde sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena sentido y sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena antisentido son nucleótidos modificados, y en donde la cadena sentido está conjugada a un ligando unido en el extremo 3', tratando así al sujeto, que tiene un trastorno, que se beneficiaría de la reducción en la expresión de Serpinc1

En un aspecto, la presente invención proporciona métodos para prevenir al menos un síntoma en un sujeto, que tiene un trastorno, que se beneficiaría de la reducción en la expresión de Serpinc1. Los métodos incluyen administrar al sujeto una dosis fija aproximadamente 80 mg de un agente de ácido ribonucleico de cadena doble (iRNA), en el que la dosis fija del agente iRNA bicatenario se administra al sujeto aproximadamente una vez al mes, en el que el agente iRNA bicatenario comprende una cadena sentido y una cadena antisentido, la cadena antisentido comprende una región de complementariedad que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de 5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3' (SEQ ID NO: 15), en donde sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena sentido y sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena antisentido son nucleótidos modificados, y en donde la cadena sentido está conjugada a un ligando unido en el extremo 3', tratando así al menos un síntoma en el sujeto, que tiene un trastorno, que se beneficiaría de la reducción en la expresión de Serpinc1.

En otro aspecto, la presente invención proporciona métodos para tratar un sujeto, que tiene un trastorno, que se beneficiaría de la reducción en la expresión de Serpinc1. Los métodos incluyen administrar al sujeto una dosis fija aproximadamente 80 mg de un agente de ácido ribonucleico de cadena doble (iRNA), en el que la dosis fija del agente iRNA bicatenario se administra al sujeto aproximadamente una vez al mes, en el que el agente iRNA bicatenario comprende una cadena sentido y una cadena antisentido, la cadena antisentido

comprende una región de complementariedad que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de 5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3' (SEQ ID NO: 15), en donde sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena sentido y sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena antisentido son nucleótidos modificados, y en donde la cadena sentido está conjugada a un ligando unido en el extremo 3', tratando así al sujeto, que tiene un trastorno, que se beneficiaría de la reducción en la expresión de Serpinc1.

En una implementación, la administración de la dosis del agente iRNA bicatenario al sujeto reduce la actividad de Serpinc1 en el sujeto en aproximadamente 70% a aproximadamente 95%, aproximadamente 70% a aproximadamente 80%, aproximadamente 80% a aproximadamente 90%, aproximadamente 90 % a aproximadamente 95%, o en más de 95%.

En otra implementación, la administración de la dosis del agente iRNA bicatenario al sujeto aumenta los niveles pico de trombina en el sujeto dentro del intervalo de niveles pico de trombina en un sujeto, que no tiene un trastorno, que se beneficiaría de la reducción en la expresión de Serpinc1.

En una implementación, la administración de la dosis del agente iRNA bicatenario al sujeto es suficiente para alcanzar los niveles pico de generación de

trombina en el sujeto hasta aproximadamente el mismo nivel alcanzado mediante la administración del Factor VIII al sujeto.

En otra implementación, la administración de la dosis del agente iRNA bicatenario al sujeto es suficiente para alcanzar niveles pico de generación de trombina de más de aproximadamente 40%, 45%, 50%, 55% o más de aproximadamente 60% en el sujeto.

En otra implementación más, la administración de la dosis del agente iRNA bicatenario al sujeto disminuye la tasa de sangrado anual (ABR) del sujeto en aproximadamente 80% a aproximadamente 95%, aproximadamente 80% a aproximadamente 85%, aproximadamente 85% a aproximadamente 90%, o aproximadamente 90% a aproximadamente 95%, en comparación con la mediana histórica sobre la demanda ABR de sujetos, que tienen un trastorno, que se beneficiarían de la reducción en la expresión de Serpinc1 a la que no se administró el agente iRNA bicatenario.

En una implementación, el agente iRNA bicatenario se administra con una solución tampón, tal como una solución tampón que comprende acetato, citrato, prolamina, carbonato o fosfato o cualquier combinación de los mismos. En una implementación, la solución tampón es solución salina tamponada con fosfato (PBS).

En una implementación, el sujeto es un ser humano.

El trastorno puede ser un trastorno hemorrágico, tal como un trastorno hemorrágico adquirido o un trastorno hemorrágico hereditario, *e.g.* una hemofilia, *e.g.* hemofilia A, hemofilia B o hemofilia C.

En una implementación, el sujeto tiene una hemofilia A y es un sujeto inhibidor. En otra implementación, el sujeto tiene una hemofilia B y es un sujeto inhibidor. En otra implementación más, el sujeto tiene una hemofilia C y es un sujeto inhibidor.

En una implementación, el agente iRNA bicatenario se administra al sujeto por vía subcutánea.

En una implementación, el agente iRNA bicatenario se administra al sujeto de forma crónica.

En una implementación, todos los nucleótidos de la cadena sentido y todos los nucleótidos de la cadena antisentido son nucleótidos modificados.

En una implementación, los nucleótidos modificados se seleccionan independientemente del grupo que consiste en un nucleótido 2'-desoxi-2'-flúor modificado, un nucleótido 2'-desoxi-modificado, un nucleótido bloqueado, un

nucleótido abásico, un nucleótido 2'-amino-modificado, un nucleótido 2’-alquilo-modificado, un nucleótido morfolino, un fosforamidato y un nucleótido que comprende una base no natural.

La región de complementariedad puede tener al menos 17 nucleótidos de longitud o 19 nucleótidos de longitud.

En una implementación, la región de complementariedad tiene entre 19 y 21 nucleótidos de longitud. En otra implementación, la región de complementariedad tiene entre 21 y 23 nucleótidos de longitud.

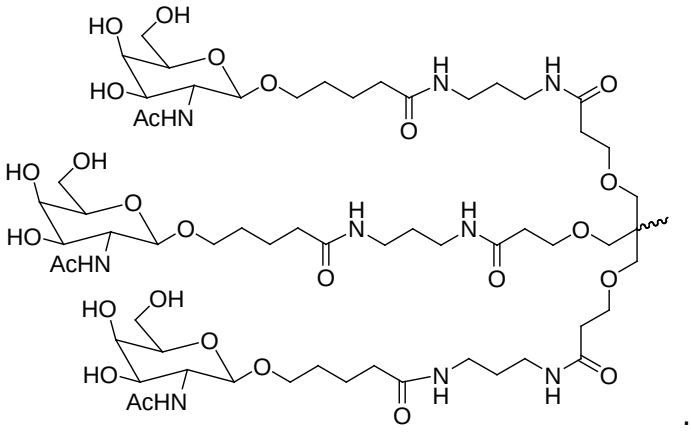
En una implementación, cada cadena no tiene más de 30 nucleótidos de longitud.

Al menos una cadena del agente iRNA bicatenario puede comprender un saliente 3´ de al menos 1 nucleótido o un saliente 3' de al menos 2 nucleótidos, *e.g.* 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 nucleótidos. En otras implementaciones, al menos una cadena del agente iRNA comprende un saliente en 5’ de al menos 1 nucleótido. En ciertas implementaciones, al menos una cadena comprende un saliente 5’ de al menos 2 nucleótidos, *e.g.* 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 nucleótidos. En aún otras implementaciones, tanto el extremo 3’ como el extremo 5' de una cadena del agente iRNA comprenden un saliente de al menos 1 nucleótido.

En ciertas implementaciones, el ligando es una N-acetilgalactosamina (GalNAc). El ligando puede ser uno o más GalNAc unidos al agente iRNA a través de un enlazador ramificado monovalente, bivalente o trivalente. El ligando se puede conjugar con el extremo 3´ de la cadena sentido del agente iRNA bicatenario, el extremo 5' de la cadena sentido del agente iRNA bicatenario, el extremo 3´ de la cadena antisentido del agente iRNA bicatenario, o el extremo 5’ de la cadena antisentido del agente iRNA bicatenario.

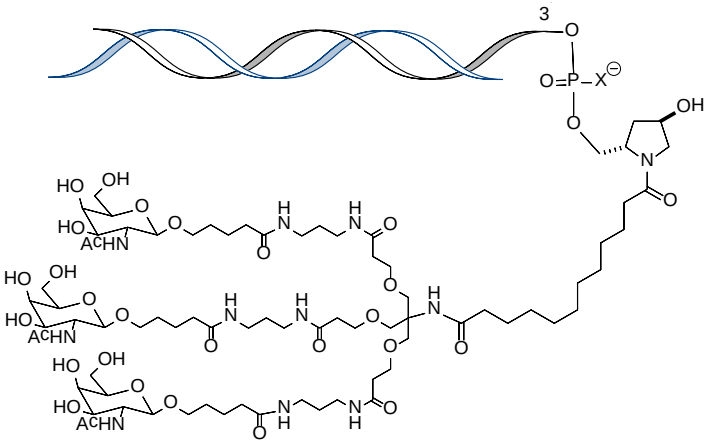
En algunas implementaciones, los agentes iRNA de doble cadena de la invención comprenden una pluralidad, *e.g.* 2, 3, 4, 5 o 6 de GalNAc, cada uno unido independientemente a una pluralidad de nucleótidos del agente iRNA bicatenario a través de una pluralidad de enlazadores monovalentes.

En ciertas implementaciones, el ligando es



.

En una implementación, el agente iRNA se conjuga con el ligando como se muestra en el siguiente esquema



y, en donde X es O o S.

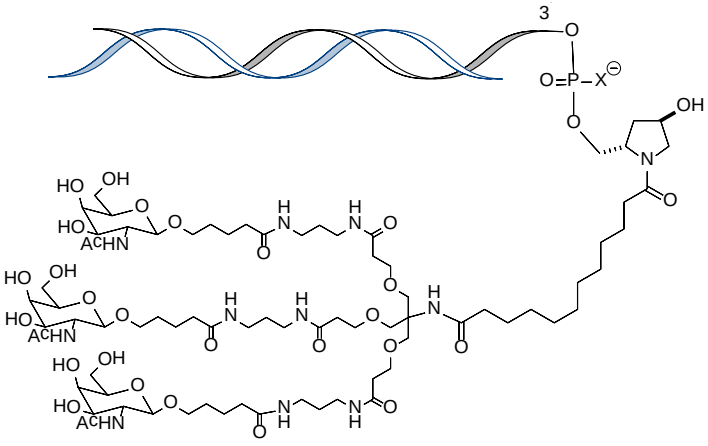
En una implementación, la X es O.

En una implementación, la región de complementariedad consiste de 5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3' (SEQ ID NO: 15).

En una implementación, el agente iRNA bicatenario comprende una cadena sentido que comprende la secuencia de nucleótido 5'-GGUUAACACCAUUUACUUCAA -3’ (SEQ ID NO: 16) y una cadena antisentido que comprende la secuencia de nucleótido 5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3' (SEQ ID NO: 15).

En una implementación, la cadena sentido comprende 5'-GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf-3' (SEQ ID NO: 13) y la cadena antisentido comprende 5'-usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg-3' (SEQ ID NO: 14), en donde A, C, G y U son ribosa A, C, G o U; a, c, g y u son 2'-O-metil (2'-OMe) A, C, G o U; Af, Cf, Gf o Uf son 2'-flúor A, C, G o U; y s es un enlace fosforotioato.

En una implementación, la cadena sentido comprende 5'-GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf-3' (SEQ ID NO: 13) y la cadena antisentido comprende 5'-usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg-3' (SEQ ID NO: 14), en donde A, C, G y U son ribosa A, C, G o U; a, c, g y u son 2'-O-metil (2'-OMe) A, C, G o U; Af, Cf, Gf o Uf son 2'-flúor A, C, G o U; y s es un enlace fosforotioato; y en donde la cadena sentido está conjugada con el ligando como se muestra en el siguiente esquema



y, en donde X es O o S.

En otra implementación, el siRNA se administra con una solución tampón, tal como una solución tampón que comprende acetato, citrato, prolamina, carbonato o fosfato o cualquier combinación de los mismos. En una implementación, la solución tampón es solución salina tamponada con fosfato (PBS).

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona kits para realizar los métodos de la invención. Los kits pueden incluir un agente iRNA de la invención, y las instrucciones de uso, y opcionalmente, medios para administrar el agente iRNA al sujeto.

En un aspecto, la presente invención proporciona métodos para prevenir al menos un síntoma en un sujeto, que tiene un trastorno, que se beneficiaría de la reducción en la expresión del Serpinc1. Los métodos incluyen administrar al sujeto una dosis fija aproximadamente 50 mg de un agente de ácido ribonucleico de doble cadena (iRNA), en el que la dosis fija del agente iRNA bicatenario se administra al sujeto aproximadamente una vez al mes, en el que el agente iRNA bicatenario comprende una cadena sentido que comprende la secuencia de nucleótidos de 5'-GGUUAACACCAUUUACUUCAA -3’ (SEQ ID NO: 16), y una cadena antisentido que comprende la secuencia de nucleótidos de 5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3' (SEQ ID NO: 15), en donde

sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena sentido y sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena antisentido son nucleótidos modificados, y en el que la cadena sentido está conjugada con un ligando unido en el extremo 3', evitando así al menos un síntoma en el sujeto, que tiene un trastorno, que se beneficiaría de la reducción en la expresión de Serpinc1.

En otro aspecto, la presente invención proporciona métodos para tratar un sujeto, que tiene un trastorno, que se beneficiaría de la reducción en la expresión del Serpinc1. Los métodos incluyen administrar al sujeto una dosis fija aproximadamente 50 mg de un agente de ácido ribonucleico de doble cadena (iRNA), en el que la dosis fija del agente iRNA bicatenario se administra al sujeto aproximadamente una vez al mes, en el que el agente iRNA bicatenario comprende una cadena sentido que comprende la secuencia de nucleótidos de 5'-GGUUAACACCAUUUACUUCAA -3' (SEQ ID NO: 16), y una cadena antisentido que comprende la secuencia de nucleótidos de 5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3' (SEQ ID NO: 15), en donde sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena sentido y sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena antisentido son nucleótidos modificados, y en donde la cadena sentido está conjugada a un ligando unido en el extremo 3', tratando así al sujeto, que tiene un trastorno, que se beneficiaria de la reducción en la expresión del Serpinc1.

En un aspecto, la presente invención proporciona métodos para prevenir al menos un síntoma en un sujeto, que tiene un trastorno, que se beneficiaría de la reducción en la expresión del Serpinc1. Los métodos incluyen administrar al sujeto una dosis fija aproximadamente 80 mg de un agente de ácido ribonucleico de doble cadena (iRNA), en el que la dosis fija del agente iRNA bicatenario se administra al sujeto aproximadamente una vez al mes, en el que el agente iRNA bicatenario comprende una cadena sentido que comprende la secuencia de nucleótidos de 5'-GGUUAACACCAUUUACUUCAA -3' (SEQ ID NO: 16), y una cadena antisentido que comprende la secuencia de nucleótidos de 5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3' (SEQ ID NO: 15), en donde sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena sentido y sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena antisentido son nucleótidos modificados, y en el que la cadena sentido está conjugada con un ligando unido en el extremo 3', evitando así al menos un síntoma en el sujeto, que tiene un trastorno, que se beneficiaría de la reducción en la expresión de Serpinc1.

En otro aspecto, la presente invención proporciona métodos para tratar un sujeto, que tiene un trastorno, que se beneficiaría de la reducción en la expresión del Serpinc1. Los métodos incluyen administrar al sujeto una dosis fija aproximadamente 80 mg de un agente de ácido ribonucleico de doble cadena (iRNA), en el que la dosis fija del agente iRNA bicatenario se administra al sujeto aproximadamente una vez al mes, en el que el agente iRNA bicatenario comprende una cadena sentido que comprende la secuencia de nucleótidos de 5'-

GGUUAACACCAUUUACUUCAA -3’ (SEQ ID NO: 16), y una cadena antisentido que comprende la secuencia de nucleótidos de 5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3' (SEQ ID NO: 15), en donde sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena sentido y sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena antisentido son nucleótidos modificados, y en donde la cadena sentido está conjugada a un ligando unido en el extremo 3’, tratando así al sujeto, que tiene un trastorno, que se beneficiaria de la reducción en la expresión del Serpinc1.

En una implementación, la administración de la dosis del agente iRNA bicatenario al sujeto reduce la actividad de Serpinc1 en el sujeto en aproximadamente 70% a aproximadamente 95%, aproximadamente 70% a aproximadamente 80%, aproximadamente 80% a aproximadamente 90%, aproximadamente 90 % a aproximadamente 95%, o en más de 95%.

En otra implementación, la administración de la dosis del agente iRNA bicatenario al sujeto aumenta los niveles pico de trombina en el sujeto dentro del intervalo de niveles pico de trombina en un sujeto, que no tiene un trastorno, que se beneficiaría de la reducción en la expresión de Serpinc1.

En una implementación, la administración de la dosis del agente iRNA bicatenario al sujeto es suficiente para alcanzar los niveles pico de generación de

trombina en el sujeto hasta aproximadamente el mismo nivel alcanzado mediante la administración del Factor VIII al sujeto.

En otra implementación, la administración de la dosis del agente iRNA bicatenario al sujeto es suficiente para alcanzar niveles pico de generación de trombina de más de aproximadamente 40%, 45%, 50%, 55% o más de aproximadamente 60% en el sujeto.

En otra implementación más, la administración de la dosis del agente iRNA bicatenario al sujeto disminuye la tasa de sangrado anual (ABR) del sujeto en aproximadamente 80% a aproximadamente 95%, aproximadamente 80% a aproximadamente 85%, aproximadamente 85% a aproximadamente 90%, o aproximadamente 90% a aproximadamente 95%, en comparación con la mediana histórica sobre la demanda ABR de sujetos, que tienen un trastorno, que se beneficiarían de la reducción en la expresión de Serpinc1 a la que no se administró el agente iRNA bicatenario.

En una implementación, el agente iRNA bicatenario se administra con una solución tampón, tal como una solución tampón que comprende acetato, citrato, prolamina, carbonato o fosfato o cualquier combinación de los mismos. En una implementación, la solución tampón es solución salina tamponada con fosfato (PBS).

En una implementación, el sujeto es un ser humano.

El trastorno puede ser un trastorno hemorrágico, tal como un trastorno hemorrágico adquirido o un trastorno hemorrágico hereditario, *e.g.* una hemofilia, *e.g.* hemofilia A, hemofilia B o hemofilia C.

En una implementación, el sujeto tiene una hemofilia A y es un sujeto inhibidor. En otra implementación, el sujeto tiene una hemofilia B y es un sujeto inhibidor. En otra implementación más, el sujeto tiene una hemofilia C y es un sujeto inhibidor.

En una implementación, el agente iRNA bicatenario se administra al sujeto por vía subcutánea.

En una implementación, el agente iRNA bicatenario se administra al sujeto de forma crónica.

En una implementación, todos los nucleótidos de la cadena sentido y todos los nucleótidos de la cadena antisentido son nucleótidos modificados.

En una implementación, los nucleótidos modificados se seleccionan independientemente del grupo que consiste en un nucleótido 2'-desoxi-2'-flúor modificado, un nucleótido 2'-desoxi-modificado, un nucleótido bloqueado, un nucleótido abásico, un nucleótido 2'-amino-modificado, un nucleótido 2’-alquilo-

modificado, un nucleótido morfolino, un fosforamidato y un nucleótido que comprende una base no natural.

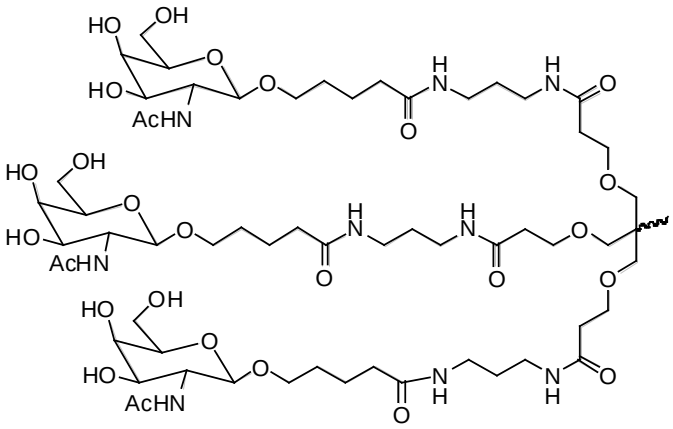
En una implementación, cada cadena no tiene más de 30 nucleótidos de longitud.

Al menos una cadena del agente iRNA bicatenario puede comprender un saliente 3' de al menos 1 nucleótido o un saliente 3' de al menos 2 nucleótidos, *e.g.* 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 nucleótidos. En otras implementaciones, al menos una cadena del agente iRNA comprende un saliente 5' de al menos 1 nucleótido. En ciertas implementaciones, al menos una cadena comprende un saliente 5' de al menos 2 nucleótidos, *e.g.* 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 nucleótidos. En aún otras implementaciones, tanto el extremo 3' como el extremo 5' de una cadena del agente iRNA comprenden un saliente de al menos 1 nucleótido.

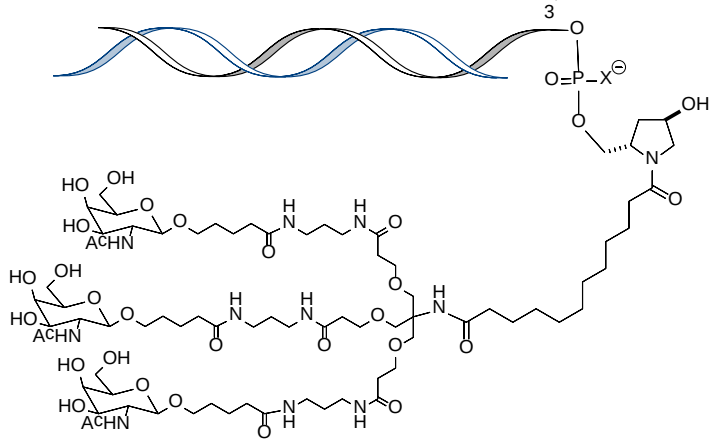
En ciertas implementaciones, el ligando es una N-acetilgalactosamina (GalNAc). El ligando puede ser uno o más GalNAc unidos al agente iRNA a través de un enlazador ramificado monovalente, bivalente o trivalente. El ligando se puede conjugar con el extremo 3' de la cadena sentido del agente iRNA bicatenario, el extremo 5' de la cadena sentido del agente iRNA bicatenario, el extremo 3' de la cadena antisentido del agente iRNA bicatenario, o el extremo 5' de la cadena antisentido del agente iRNA bicatenario.

En algunas implementaciones, los agentes iRNA bicatenario de la invención comprenden una pluralidad, *e.g.* 2, 3, 4, 5 o 6 de GalNAc, cada uno unido independientemente a una pluralidad de nucleótidos del agente iRNA bicatenario a través de una pluralidad de enlazadores monovalentes.

En ciertas implementaciones, el ligando es



En una implementación, el agente iRNA está conjugado con el ligando como se muestra en el siguiente esquema

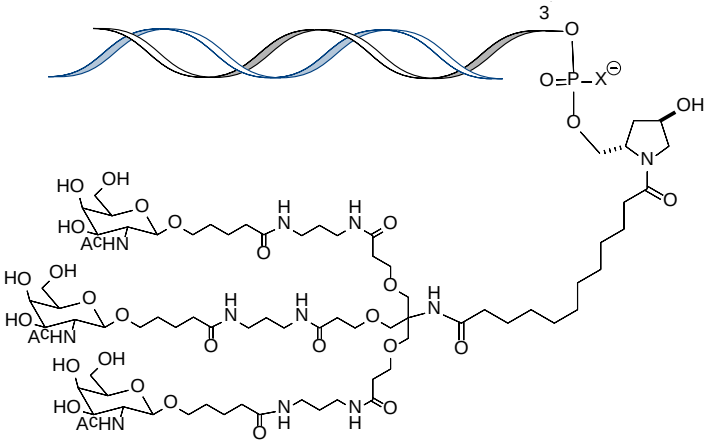


y, en donde X es O o S.

En una implementación, la X es O.

En una implementación, la cadena sentido comprende 5'-GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf-3' (SEQ ID NO: 13) y la cadena antisentido comprende 5'-usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg-3' (SEQ ID NO: 14), en donde A, C, G y U son ribosa A, C, G o U; a, c, g y u son 2'-O-metil (2'-OMe) A, C, G o U; Af, Cf, Gf o Uf son 2'-flúor A, C, G o U; y s es un enlace fosforotioato.

En una implementación, la cadena sentido comprende 5'-GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf-3’(SEQ ID NO: 13) y la cadena antisentido comprende 5'-usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg-3' (SEQ ID NO: 14), en donde A, C, G y U son ribosa A, C, G o U; a, c, g y u son 2'-O-metil (2'-OMe) A, C, G o U; Af, Cf, Gf o Uf son 2'-flúor A, C, G o U; y s es un enlace fosforotioato; y en el que la cadena sentido está conjugada con el ligando como se muestra en el siguiente esquema



y, en donde X es O o S.

En otra implementación, el siRNA se administra con una solución tampón, tal como una solución tampón que comprende acetato, citrato, prolamina, carbonato o fosfato o cualquier combinación de los mismos. En una implementación, la solución tampón es solución salina tamponada con fosfato (PBS).

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona kits para realizar los métodos de la invención. Los kits pueden incluir un agente iRNA de la invención, y las instrucciones de uso, y opcionalmente, medios para administrar el agente iRNA al sujeto.

En un aspecto, la presente invención proporciona métodos para prevenir al menos un síntoma en un sujeto que tiene una hemofilia, *e.g.* hemofilia A (con o sin inhibidores), hemofilia B (con o sin inhibidores) o hemofilia C (con o sin

inhibidores). Los métodos incluyen administrar al sujeto una dosis fija aproximadamente 50 mg de un agente de ácido ribonucleico de doble cadena (iRNA), en el que la dosis fija del agente iRNA bicatenario se administra al sujeto aproximadamente una vez al mes, en el que el agente iRNA bicatenario comprende una cadena sentido que comprende la secuencia de nucleótidos de 5'-GGUUAACACCAUUUACUUCAA -3'(SEQ ID NO: 16), y una cadena antisentido que comprende la secuencia de nucleótidos de 5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3' (SEQ ID NO: 15), en donde sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena sentido y sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena antisentido son nucleótidos modificados, y en el que la cadena sentido está conjugada con un ligando unido en el extremo 3', evitando así al menos un síntoma en el sujeto, que tiene un trastorno, que se beneficiaría de la reducción en la expresión de Serpinc1.

En otro aspecto, la presente invención proporciona métodos para tratar un sujeto que tiene una hemofilia, *e.g.* hemofilia A (con o sin inhibidores), hemofilia B (con o sin inhibidores) o hemofilia C (con o sin inhibidores). Los métodos incluyen administrar al sujeto una dosis fija aproximadamente 50 mg de un agente de ácido ribonucleico de doble cadena (iRNA), en el que la dosis fija del agente iRNA bicatenario se administra al sujeto aproximadamente una vez al mes, en el que el agente iRNA bicatenario comprende una cadena sentido que comprende la secuencia de nucleótidos de 5'-GGUUAACACCAUUUACUUCAA -3'(SEQ ID NO: 16), y una cadena antisentido que comprende la secuencia de nucleótidos de 5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3' (SEQ ID NO: 15), en donde

sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena sentido y sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena antisentido son nucleótidos modificados, y en donde la cadena sentido está conjugada a un ligando unido en el extremo 3', tratando así al sujeto, que tiene un trastorno, que se beneficiaría de la reducción en la expresión de Serpinc1.

En un aspecto, la presente invención proporciona métodos para prevenir al menos un síntoma en un sujeto que tiene una hemofilia, *e.g.* hemofilia A (con o sin inhibidores), hemofilia B (con o sin inhibidores) o hemofilia C (con o sin inhibidores). Los métodos incluyen administrar al sujeto una dosis fija aproximadamente 80 mg de un agente de ácido ribonucleico de cadena doble (iRNA), en el que la dosis fija del agente iRNA bicatenario se administra al sujeto aproximadamente una vez al mes, en el que el agente iRNA bicatenario comprende una cadena sentido que comprende la secuencia de nucleótidos de 5'-GGUUAACACCAUUUACUUCAA -3’(SEQ ID NO: 16), y una cadena antisentido que comprende la secuencia de nucleótidos de 5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3' (SEQ ID NO: 15), en donde sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena sentido y sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena antisentido son nucleótidos modificados, y en el que la cadena sentido está conjugada con un ligando unido en el extremo 3', evitando así al menos un síntoma en el sujeto, que tiene un trastorno, que se beneficiaría de la reducción en la expresión de Serpinc1.

En otro aspecto, la presente invención proporciona métodos para tratar un sujeto que tiene una hemofilia, *e.g.* hemofilia A (con o sin inhibidores), hemofilia B (con o sin inhibidores) o hemofilia C (con o sin inhibidores). Los métodos incluyen administrar al sujeto una dosis fija aproximadamente 80 mg de un agente de ácido ribonucleico de cadena doble (iRNA), en el que la dosis fija del agente iRNA bicatenario se administra al sujeto aproximadamente una vez al mes, en el que el agente iRNA bicatenario comprende una cadena sentido que comprende la secuencia de nucleótidos de 5'-GGUUAACACCAUUUACUUCAA -3'(SEQ ID NO: 16), y una cadena antisentido que comprende la secuencia de nucleótidos de 5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3' (SEQ ID NO: 15), en donde sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena sentido y sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena antisentido son nucleótidos modificados, y en donde la cadena sentido está conjugada a un ligando unido en el extremo 3', tratando así al sujeto, que tiene un trastorno, que se beneficiaría de la reducción en la expresión de Serpinc1.

En un aspecto, la presente invención proporciona métodos para prevenir al menos un síntoma en un sujeto que tiene una hemofilia, *e.g.* hemofilia A (con o sin inhibidores), hemofilia B (con o sin inhibidores) o hemofilia C (con o sin inhibidores). Los métodos incluyen administrar al sujeto una dosis fija aproximadamente 50 mg de un agente de ácido ribonucleico de doble cadena (iRNA), en el que la dosis fija del agente iRNA bicatenario se administra al sujeto aproximadamente una vez al mes, en el que el agente iRNA bicatenario

comprende una cadena sentido que comprende la secuencia de nucleótidos de 5'-GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf-3’(SEC ID NO: 13) y una cadena antisentido que comprende la secuencia de nucleótidos de 5'-usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg-3' (SEQ ID NO: 14), en donde A , C, G y U son ribosa A, C, G o U; a, c, g y u son 2'-O-metil (2'-OMe) A, C, G o U; Af, Cf, Gf o Uf son 2'-flúor A, C, G o U; y s es un enlace fosforotioato, y en el que la cadena sentido está conjugada con un ligando unido en el extremo 3', evitando así al menos un síntoma en el sujeto, que tiene un trastorno, que se beneficiaría de la reducción en la expresión de Serpinc1.

En otro aspecto, la presente invención proporciona métodos para tratar un sujeto que tiene una hemofilia, *e.g.* hemofilia A (con o sin inhibidores), hemofilia B (con o sin inhibidores) o hemofilia C (con o sin inhibidores). Los métodos incluyen administrar al sujeto una dosis fija aproximadamente 50 mg de un agente de ácido ribonucleico de doble cadena (iRNA), en el que la dosis fija del agente iRNA bicatenario se administra al sujeto aproximadamente una vez al mes, en el que el agente iRNA bicatenario comprende una cadena sentido que comprende la secuencia de nucleótidos de 5'-GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf-3’(SEC ID NO: 13) y una cadena antisentido que comprende la secuencia de nucleótidos de 5'-usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg-3' (SEQ ID NO: 14), en donde A , C, G y U son ribosa A, C, G o U; a, c, g y u son 2'-O-metil (2'-OMe) A, C, G o U; Af, Cf, Gf o Uf son 2'-flúor A, C, G o U; y s es un enlace fosforotioato, y en el que la cadena sentido está conjugada con un ligando unido en el extremo 3', tratando así

al sujeto, que tiene un trastorno, que se beneficiaría de la reducción en la expresión de Serpinc1.

En otro aspecto, la presente invención proporciona métodos para tratar un sujeto que tiene una hemofilia, *e.g.* hemofilia A (con o sin inhibidores), hemofilia B (con o sin inhibidores) o hemofilia C (con o sin inhibidores). Los métodos incluyen administrar al sujeto una dosis fija aproximadamente 80 mg de un agente de ácido ribonucleico de cadena doble (iRNA), en el que la dosis fija del agente iRNA bicatenario se administra al sujeto aproximadamente una vez al mes, en el que el agente iRNA bicatenario comprende una cadena sentido que comprende la secuencia de nucleótidos de 5'-GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf-3’(SEQ ID NO: 13) y una cadena antisentido que comprende la secuencia de nucleótidos de 5'-usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg-3 (SEC ID Nº: 14), en donde A, C, G y U son ribosa A, C, G o U; a, c, g y u son 2'-O-metil (2'-OMe) A, C, G o U; Af, Cf, Gf o Uf son 2'-flúor A, C, G o U; y s es un enlace fosforotioato, y en el que la cadena sentido está conjugada con un ligando unido en el extremo 3', tratando así al sujeto, que tiene un trastorno, que se beneficiaría de la reducción en la expresión de Serpinc1.

En una implementación, la administración de la dosis del agente iRNA bicatenario al sujeto reduce la actividad de Serpinc1 en el sujeto en aproximadamente 70% a aproximadamente 95%, aproximadamente 70% a

aproximadamente 80%, aproximadamente 80% a aproximadamente 90%, aproximadamente 90 % a aproximadamente 95%, o en más de 95%.

En otra implementación, la administración de la dosis del agente iRNA bicatenario al sujeto aumenta los niveles pico de trombina en el sujeto dentro del intervalo de niveles pico de trombina en un sujeto, que no tiene un trastorno, que se beneficiaría de la reducción en la expresión de Serpinc1.

En una implementación, la administración de la dosis del agente iRNA bicatenario al sujeto es suficiente para alcanzar los niveles pico de generación de trombina en el sujeto hasta aproximadamente el mismo nivel alcanzado mediante la administración del Factor VIII al sujeto.

En otra implementación, la administración de la dosis del agente iRNA bicatenario al sujeto es suficiente para alcanzar niveles pico de generación de trombina de más de aproximadamente 40%, 45%, 50%, 55% o más de aproximadamente 60% en el sujeto.

En otra implementación más, la administración de la dosis del agente iRNA bicatenario al sujeto disminuye la tasa de sangrado anual (ABR) del sujeto en aproximadamente 80% a aproximadamente 95%, aproximadamente 80% a aproximadamente 85%, aproximadamente 85% a aproximadamente 90%, o aproximadamente 90% a aproximadamente 95%, en comparación con la mediana

histórica sobre la demanda de ABR de sujetos, que tienen un trastorno, que se beneficiarían de la reducción en la expresión de Serpinc1 a los que no se les administra el agente iRNA bicatenario.

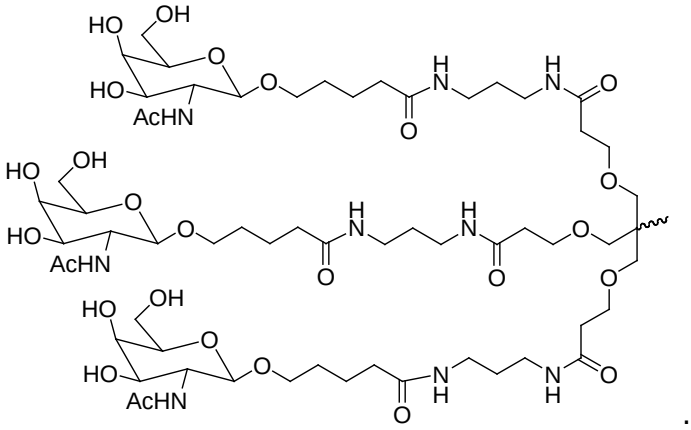
En una implementación, el agente iRNA bicatenario se administra con una solución tampón, tal como una solución tampón que comprende acetato, citrato, prolamina, carbonato o fosfato o cualquier combinación de los mismos. En una implementación, la solución tampón es solución salina tamponada con fosfato (PBS).

En una implementación, el sujeto es un humano.

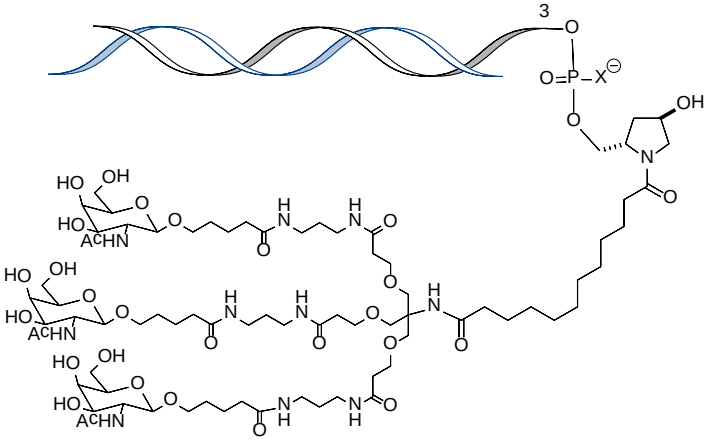
En una implementación, el agente iRNA bicatenario se administra al sujeto por vía subcutánea.

En una implementación, el agente iRNA bicatenario se administra al sujeto de forma crónica.

En ciertas implementaciones, el ligando es



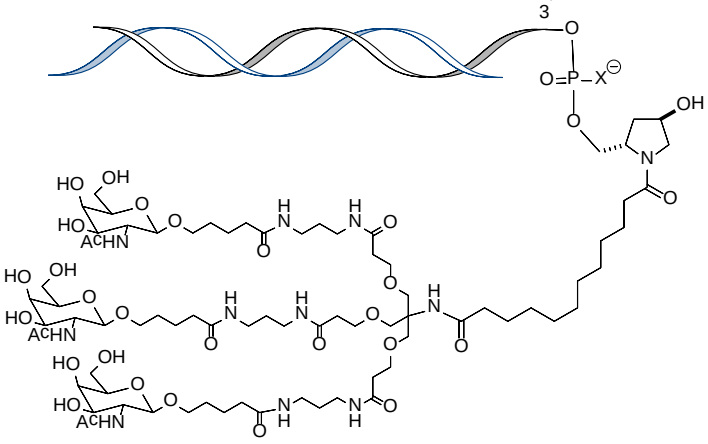
En una implementación, el agente iRNA se conjuga con el ligando como se muestra en el siguiente esquema



y, en donde X es O o S.

En una implementación, la X es O.

En una implementación, la cadena sentido comprende 5'-GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf-3' (SEQ ID NO: 13) y la cadena antisentido comprende 5'-usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg-3' (SEQ ID NO: 14), en donde A, C, G y U son ribosa A, C, G o U; a, c, g y u son 2'-O-metil (2'-OMe) A, C, G o U; Af, Cf, Gf o Uf son 2'-flúor A, C, G o U; y s es un enlace fosforotioato; y en el que la cadena sentido está conjugada con el ligando como se muestra en el siguiente esquema



y, en donde X es O o S.

En otra implementación, el siRNA se administra con una solución tampón, tal como una solución tampón que comprende acetato, citrato, prolamina, carbonato o fosfato o cualquier combinación de los mismos. En una implementación, la solución tampón es solución salina tamponada con fosfato (PBS).

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona kits para realizar los métodos de la invención. Los kits pueden incluir un agente iRNA de la invención, y las instrucciones de uso, y opcionalmente, medios para administrar el agente iRNA al sujeto.

En un aspecto, la presente invención proporciona métodos para prevenir al menos un síntoma en un sujeto, que tiene un trastorno, que se beneficiaría de la reducción en la expresión de Serpinc1. Los métodos incluyen administrar al sujeto una dosis fija aproximadamente 40 mg a aproximadamente 90 mg de un agente de ácido ribonucleico de doble cadena (iRNA), donde el agente iRNA bicatenario comprende una cadena sentido y una cadena antisentido, la cadena antisentido comprende una región de complementariedad que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de 5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3' (SEQ ID NO: 15), en donde sustancialmente la totalidad de los nucleótidos de la cadena sentido y sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena antisentido son nucleótidos modificados, y en donde el agente iRNA bicatenario comprende un ligando, *e.g., la cadena* sentido del agente iRNA bicatenario está conjugada con un ligando unido en el extremo 3´ de la cadena sentido.

En otro aspecto, la presente invención proporciona métodos para tratar un sujeto, que tiene un trastorno, que se beneficiaría de la reducción en la expresión de Serpinc1. Los métodos incluyen administrar al sujeto una dosis fija

aproximadamente 40 mg a aproximadamente 90 mg de un agente de ácido ribonucleico de doble cadena (iRNA), donde el agente iRNA bicatenario comprende una cadena sentido y una cadena antisentido, la cadena antisentido comprende una región de complementariedad que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de 5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3' (SEQ ID NO: 15), en donde sustancialmente la totalidad de los nucleótidos de la cadena sentido y sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena antisentido son nucleótidos modificados, y en donde el agente iRNA bicatenario comprende un ligando, *e.g., la cadena* sentido del agente iRNA bicatenario está conjugada con un ligando unido en el extremo 3´ de la cadena sentido.

El agente iRNA bicatenario se puede administrar al sujeto en dos o más dosis.

En algunas implementaciones, el agente iRNA bicatenario se administra al sujeto una vez al mes, una vez cada cinco semanas, una vez cada seis semanas, una vez cada siete semanas, una vez cada 2 meses, una vez al trimestre o según sea necesario.

En una implementación, el agente iRNA bicatenario se administra al sujeto una vez al mes. En otra implementación, el agente iRNA bicatenario se administra al sujeto una vez cada seis semanas. En una implementación, el agente iRNA

bicatenario se administra al sujeto una vez cada 2 meses. En otra implementación más, el agente iRNA bicatenario se administra al sujeto una vez por trimestre.

El agente iRNA bicatenario se puede administrar al sujeto como, *e.g.* una dosis fija de entre aproximadamente 50 mg a aproximadamente 90 mg, entre aproximadamente 50 mg a aproximadamente 85 mg, entre aproximadamente 50 mg a aproximadamente 80 mg, entre aproximadamente 40 mg a aproximadamente 80 mg, entre aproximadamente 60 mg a aproximadamente 90 mg, entre aproximadamente 25 mg a aproximadamente 55 mg, entre aproximadamente 25 mg a aproximadamente 65 mg, entre aproximadamente 40 mg a aproximadamente 85 mg, entre aproximadamente 40 mg a aproximadamente 75 mg, entre aproximadamente 40 mg a aproximadamente 65 mg, o entre aproximadamente 40 mg a aproximadamente 55 mg.

En algunas implementaciones, el agente iRNA bicatenario se puede administrar en una dosis fija aproximadamente 40 mg, aproximadamente 45 mg, aproximadamente 50 mg, aproximadamente 55 mg, aproximadamente 60 mg, aproximadamente 65 mg, aproximadamente 70 mg, aproximadamente 75 mg, aproximadamente. 80 mg, aproximadamente 85 mg, o aproximadamente 90 mg.

En algunas implementaciones, el agente iRNA bicatenario se administra al sujeto en una dosis fija aproximadamente 40 mg; o en una dosis fija

aproximadamente 50 mg; o en una dosis fija aproximadamente 80 mg; o en una dosis fija de aproximadamente 90 mg.

En una implementación, el agente iRNA bicatenario se administra al sujeto por vía subcutánea.

En una implementación, la administración de la dosis del agente iRNA bicatenario al sujeto reduce la actividad de Serpinc1 en el sujeto en aproximadamente un 70% a aproximadamente un 95%.

En otra implementación, la administración de la dosis del agente iRNA bicatenario al sujeto aumenta los niveles pico de trombina en el sujeto dentro del intervalo de niveles pico de trombina en un sujeto, que no tiene un trastorno, que se beneficiaría de la reducción en la expresión de Serpinc1.

En una implementación, la administración de la dosis del agente iRNA bicatenario al sujeto es suficiente para alcanzar los niveles pico de generación de trombina en el sujeto hasta aproximadamente el mismo nivel alcanzado mediante la administración del Factor VIII al sujeto.

En otra implementación, la administración de la dosis del agente iRNA bicatenario al sujeto es suficiente para alcanzar niveles pico de generación de trombina mayores de aproximadamente 40% en el sujeto.

En otra implementación más, la administración de la dosis del agente iRNA bicatenario al sujeto disminuye la tasa de sangrado anual (ABR) del sujeto en aproximadamente 80 a aproximadamente 95% en comparación con la mediana histórica sobre la demanda de ABR de sujetos, que tienen un trastorno, que se beneficiarían de la reducción en la expresión de Serpinc1 a la que no se les administra el agente iRNA bicatenario.

En una implementación, el agente iRNA bicatenario se administra con una solución tampón, tal como una solución tampón que comprende acetato, citrato, prolamina, carbonato o fosfato o cualquier combinación de los mismos. En una implementación, la solución tampón es solución salina tamponada con fosfato (PBS).

En una implementación, el sujeto es un ser humano.

El trastorno puede ser un trastorno hemorrágico, tal como un trastorno hemorrágico adquirido o un trastorno hemorrágico hereditario, *e.g.* una hemofilia, *e.g.* hemofilia A, hemofilia B o hemofilia C.

En una implementación, el sujeto tiene una hemofilia A y es un sujeto inhibidor. En otra implementación, el sujeto tiene una hemofilia B y es un sujeto inhibidor. En otra implementación más, el sujeto tiene una hemofilia C y es un sujeto inhibidor.

En una implementación, el agente iRNA bicatenario se administra al sujeto por vía subcutánea.

En una implementación, todos los nucleótidos de la cadena sentido y todos los nucleótidos de la cadena antisentido son nucleótidos modificados.

En una implementación, los nucleótidos modificados se seleccionan independientemente del grupo que consiste en un nucleótido 2’-desoxi-2’-flúor modificado, un nucleótido 2'-desoxi-modificado, un nucleótido bloqueado, un nucleótido abásico, un nucleótido 2-amino-modificado, un nucleótido 2-alquilo-modificado, un nucleótido morfolino, un fosforamidato y un nucleótido que comprende una base no natural.

La región de complementariedad puede tener al menos 17 nucleótidos de longitud o 19 nucleótidos de longitud.

En una implementación, la región de complementariedad tiene entre 19 y 21 nucleótidos de longitud. En otra implementación, la región de complementariedad tiene entre 21 y 23 nucleótidos de longitud.

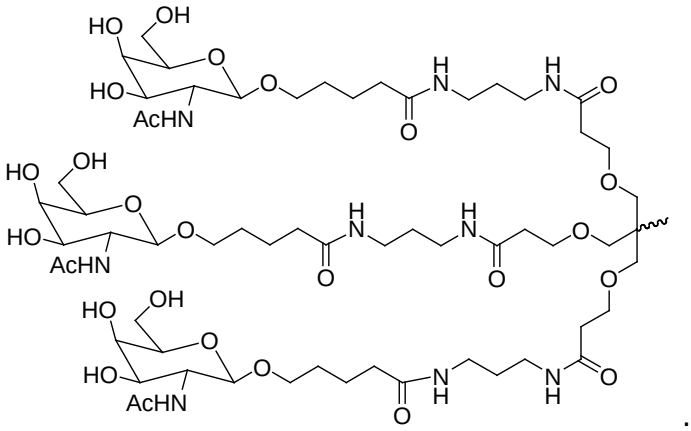
En una implementación, cada cadena no tiene más de 30 nucleótidos de longitud.

Al menos una cadena del agente iRNA bicatenario puede comprender un saliente 3´ de al menos 1 nucleótido o un saliente 3' de al menos 2 nucleótidos, *e.g.* 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 nucleótidos. En otras implementaciones, al menos una cadena del agente iRNA comprende un saliente en 5’ de al menos 1 nucleótido. En ciertas implementaciones, al menos una cadena comprende un saliente 5’ de al menos 2 nucleótidos, *e.g.* 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 nucleótidos. En aún otras implementaciones, tanto el extremo 3’ como el extremo 5' de una cadena del agente iRNA comprenden un saliente de al menos 1 nucleótido

En ciertas implementaciones, el ligando es una N-acetilgalactosamina (GalNAc). El ligando puede ser uno o más GalNAc unidos al agente iRNA a través de un enlazador ramificado monovalente, bivalente o trivalente. El ligando se puede conjugar con el extremo 3´ de la cadena sentido del agente iRNA bicatenario, el extremo 5' de la cadena sentido del agente iRNA bicatenario, el extremo 3´ de la cadena antisentido del agente iRNA bicatenario, o el extremo 5’ de la cadena antisentido del agente iRNA bicatenario.

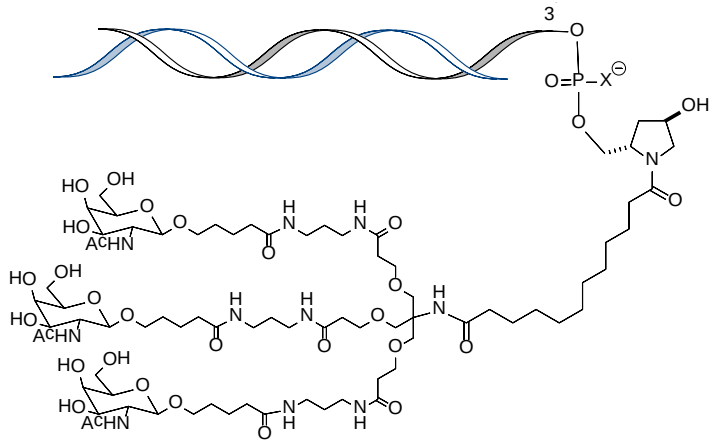
En algunas implementaciones, los agentes iRNA de doble cadena de la invención comprenden una pluralidad, *e.g.* 2, 3, 4, 5 o 6 de GalNAc, cada uno unido independientemente a una pluralidad de nucleótidos del agente iRNA bicatenario a través de una pluralidad de enlazadores monovalentes.

En ciertas implementaciones, el ligando es



.

En una implementación, el agente iRNA se conjuga con el ligando como se muestra en el siguiente esquema



y, en donde X es O o S.

En una implementación, la X es O.

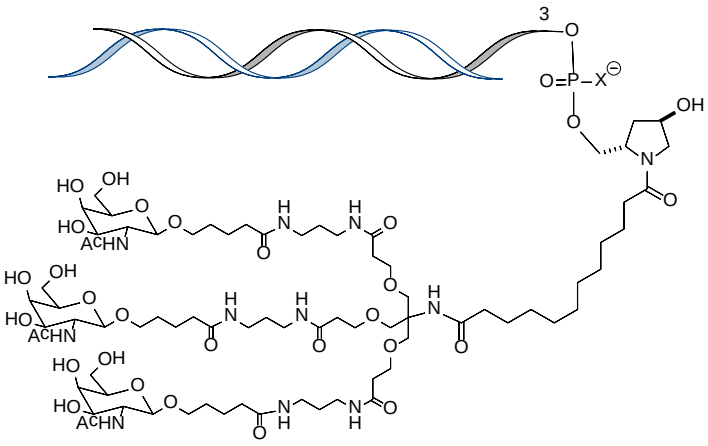
En una implementación, la región de complementariedad consiste en la secuencia de nucleótidos de 5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3’ (SEQ ID NO: 15).

En una implementación, el agente iRNA bicatenario comprende una cadena sentido que comprende la secuencia de nucleótidos de 5'-GGUUAACACCAUUUACUUCAA-3’ (SEQ ID NO: 16), y una cadena antisentido que comprende la secuencia de nucleótidos de 5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3' (SEQ ID NO: 15).

En una implementación, la cadena sentido comprende 5'-GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf-3’ (SEQ ID NO: 13) y la cadena antisentido comprende 5'-usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg-3' (SEQ ID NO: 14), en donde A, C, G y U son ribosa A, C, G o U; a, c, g y u son 2'-O-metil (2'-OMe) A, C, G o U; Af, Cf, Gf o Uf son 2'-flúor A, C, G o U; y s es un enlace fosforotioato.

En una implementación, la cadena sentido comprende 5'-GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf-3’ (SEQ ID NO: 13) y la cadena antisentido comprende 5'-usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg-3' (SEQ ID NO: 14), en donde A, C, G y U son ribosa A, C, G o U; a, c, g y u son 2'-O-metil

(2'-OMe) A, C, G o U; Af, Cf, Gf o Uf son 2'-flúor A, C, G o U; y s es un enlace fosforotioato; y en el que la cadena sentido está conjugada con el ligando como se muestra en el siguiente esquema



y, en donde X es O o S.

En una implementación, el agente se administra como una composición farmacéutica. En una implementación, el agente iRNA se administra en una solución no tamponada, tal como solución salina o agua.

En otra implementación, el siRNA se administra con una solución tampón, tal como una solución tampón que comprende acetato, citrato, prolamina, carbonato o fosfato o cualquier combinación de los mismos. En una implementación, la solución tampón es solución salina tamponada con fosfato (PBS).

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona kits para realizar los métodos de la invención. Los kits pueden incluir un agente iRNA de la invención, y las instrucciones de uso, y opcionalmente, medios para administrar el agente iRNA al sujeto.

En un aspecto, la presente invención proporciona métodos para inhibir la expresión de Serpinc1 en un sujeto. Los métodos incluyen administrar al sujeto una dosis fija aproximadamente 40 mg a aproximadamente 90 mg de un agente de ácido ribonucleico de doble cadena (iRNA), donde el agente iRNA bicatenario comprende una cadena sentido y una cadena antisentido, la cadena antisentido comprende una región de complementariedad que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de 5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3' (SEQ ID NO: 15), en donde sustancialmente la totalidad de los nucleótidos de la cadena sentido y sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena antisentido son nucleótidos modificados, y en donde el agente iRNA bicatenario comprende un ligando, *e.g., la cadena* sentido del agente iRNA bicatenario está conjugada con un ligando unido en el extremo 3´ de la cadena sentido.

En otro aspecto, la presente invención proporciona métodos para inhibir la expresión de Serpinc1 en un sujeto. Los métodos incluyen administrar al sujeto una dosis fija aproximadamente 40 mg a aproximadamente 90 mg de un agente de ácido ribonucleico de doble cadena (iRNA), donde el agente iRNA bicatenario

comprende una cadena sentido y una cadena antisentido, la cadena antisentido comprende una región de complementariedad que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de 5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3' (SEQ ID NO: 15), en donde sustancialmente la totalidad de los nucleótidos de la cadena sentido y sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena antisentido son nucleótidos modificados, y en donde el agente iRNA bicatenario comprende un ligando, *e.g., la cadena* sentido del agente iRNA bicatenario está conjugada con un ligando unido en el extremo 3´ de la cadena sentido.

El agente iRNA bicatenario se puede administrar al sujeto en dos o más dosis.

En algunas implementaciones, el agente iRNA bicatenario se administra al sujeto una vez al mes, una vez cada cinco semanas, una vez cada seis semanas, una vez cada siete semanas, una vez cada 2 meses, una vez al trimestre o según sea necesario.

En una implementación, el agente iRNA bicatenario se administra al sujeto una vez al mes. En otra implementación, el agente iRNA bicatenario se administra al sujeto una vez cada seis semanas. En una implementación, el agente iRNA bicatenario se administra al sujeto una vez cada 2 meses. En otra implementación más, el agente iRNA bicatenario se administra al sujeto una vez por trimestre.

El agente iRNA bicatenario se puede administrar al sujeto como, *e.g.* una dosis fija de entre aproximadamente 50 mg a aproximadamente 90 mg, entre aproximadamente 50 mg a aproximadamente 85 mg, entre aproximadamente 50 mg a aproximadamente 80 mg, entre aproximadamente 40 mg a aproximadamente 80 mg, entre aproximadamente 60 mg a aproximadamente 90 mg, entre aproximadamente 25 mg a aproximadamente 55 mg, entre aproximadamente 25 mg a aproximadamente 65 mg, entre aproximadamente 40 mg a aproximadamente 85 mg, entre aproximadamente 40 mg a aproximadamente 75 mg, entre aproximadamente 40 mg a aproximadamente 65 mg, o entre aproximadamente 40 mg a aproximadamente 55 mg.

En algunas implementaciones, el agente iRNA bicatenario se puede administrar en una dosis fija aproximadamente 40 mg, aproximadamente 45 mg, aproximadamente 50 mg, aproximadamente 55 mg, aproximadamente 60 mg, aproximadamente 65 mg, aproximadamente 70 mg, aproximadamente 75 mg, aproximadamente. 80 mg, aproximadamente 85 mg, o aproximadamente 90 mg.

En algunas implementaciones, el agente iRNA bicatenario se administra al sujeto en una dosis fija aproximadamente 40 mg; o en una dosis fija aproximadamente 50 mg; o en una dosis fija aproximadamente 80 mg; o en una dosis fija de aproximadamente 90 mg.

En una implementación, el agente iRNA bicatenario se administra al sujeto por vía subcutánea.

En una implementación, la administración de la dosis del agente iRNA bicatenario al sujeto reduce la actividad de Serpinc1 en el sujeto en aproximadamente un 70% a aproximadamente un 95%.

En una implementación, el sujeto es un ser humano.

En una implementación, el sujeto, tiene un trastorno, que se beneficiaría de la reducción en la expresión de Serpinc1. El trastorno puede ser un trastorno hemorrágico, tal como un trastorno hemorrágico adquirido o un trastorno hemorrágico hereditario, *e.g.* una hemofilia, *e.g.* hemofilia A, hemofilia B o hemofilia C.

En una implementación, el sujeto tiene una hemofilia A y es un sujeto inhibidor. En otra implementación, el sujeto tiene una hemofilia B y es un sujeto inhibidor. En otra implementación más, el sujeto tiene una hemofilia C y es un sujeto inhibidor.

En otra implementación, la administración de la dosis del agente iRNA bicatenario al sujeto aumenta los niveles pico de trombina en el sujeto dentro del

intervalo de niveles pico de trombina en un sujeto, que no tiene un trastorno, que se beneficiaría de la reducción en la expresión de Serpinc1.

En una implementación, la administración de la dosis del agente iRNA bicatenario al sujeto es suficiente para alcanzar los niveles pico de generación de trombina en el sujeto hasta aproximadamente el mismo nivel alcanzado mediante la administración del Factor VIII al sujeto.

En otra implementación, la administración de la dosis del agente iRNA bicatenario al sujeto es suficiente para alcanzar niveles pico de generación de trombina mayores de aproximadamente 40% en el sujeto.

En otra implementación más, la administración de la dosis del agente iRNA bicatenario al sujeto disminuye la tasa de sangrado anual (ABR) del sujeto en aproximadamente 80 a aproximadamente 95% en comparación con la mediana histórica sobre la demanda de ABR de sujetos, que tienen un trastorno, que se beneficiarían de la reducción en la expresión de Serpinc1 a la que no se les administra el agente iRNA bicatenario

En una implementación, el agente iRNA bicatenario se administra con una solución tampón, tal como una solución tampón que comprende acetato, citrato, prolamina, carbonato o fosfato o cualquier combinación de los mismos. En una

implementación, la solución tampón es solución salina tamponada con fosfato (PBS).

En una implementación, el agente iRNA bicatenario se administra al sujeto por vía subcutánea.

En una implementación, todos los nucleótidos de la cadena sentido y todos los nucleótidos de la cadena antisentido son nucleótidos modificados.

En una implementación, los nucleótidos modificados se seleccionan independientemente del grupo consiste en un nucleótido 2'-desoxi-2'-flúor modificado, un nucleótido 2'-desoxi-modificado, un nucleótido bloqueado, un nucleótido abásico, un nucleótido 2'-amino-modificado, un nucleótido 2’-alquilo-modificado, un nucleótido morfolino, un fosforamidato y un nucleótido que comprende una base no natural.

La región de complementariedad puede tener al menos 17 nucleótidos de longitud o 19 nucleótidos de longitud.

En una implementación, la región de complementariedad tiene entre 19 y 21 nucleótidos de longitud. En otra implementación, la región de complementariedad tiene entre 21 y 23 nucleótidos de longitud.

En una implementación, cada cadena no tiene más de 30 nucleótidos de longitud.

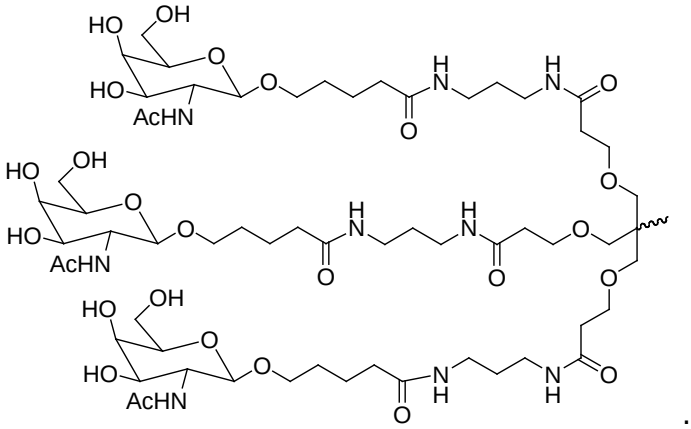
Al menos una cadena del agente iRNA bicatenario puede comprender un saliente 3´ de al menos 1 nucleótido o un saliente 3' de al menos 2 nucleótidos, *e.g.* 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 nucleótidos. En otras implementaciones, al menos una cadena del agente iRNA comprende un saliente en 5’ de al menos 1 nucleótido. En ciertas implementaciones, al menos una cadena comprende un saliente 5’ de al menos 2 nucleótidos, *e.g.* 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 nucleótidos. En aún otras implementaciones, tanto el extremo 3’ como el extremo 5' de una cadena del agente iRNA comprenden un saliente de al menos 1 nucleótido.

En ciertas implementaciones, el ligando es una N-acetilgalactosamina (GalNAc). El ligando puede ser uno o más GalNAc unidos al agente iRNA a través de un enlazador ramificado monovalente, bivalente o trivalente. El ligando se puede conjugar con el extremo 3´ de la cadena sentido del agente iRNA bicatenario, el extremo 5' de la cadena sentido del agente iRNA bicatenario, el extremo 3´ de la cadena antisentido del agente iRNA bicatenario, o el extremo 5’ de la cadena antisentido del agente iRNA bicatenario.

En algunas implementaciones, los agentes iRNA de doble cadena de la invención comprenden una pluralidad, *e.g.* 2, 3, 4, 5 o 6 de GalNAc, cada uno

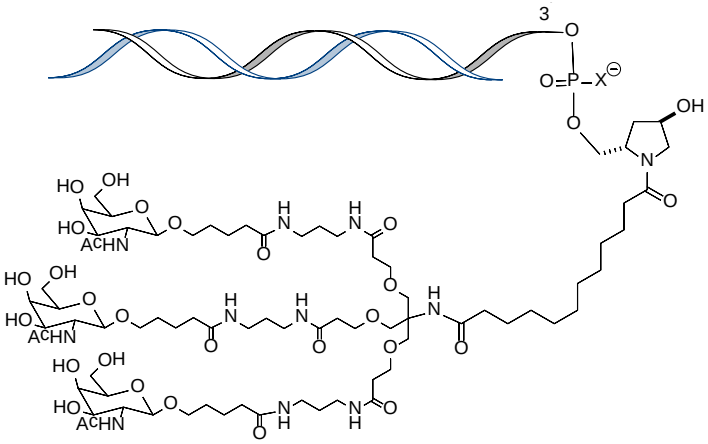
unido independientemente a una pluralidad de nucleótidos del agente iRNA bicatenario a través de una pluralidad de enlazadores monovalentes.

En ciertas implementaciones, el ligando es



.

En una implementación, el agente iRNA se conjuga con el ligando como se muestra en el siguiente esquema



y, en donde X es O o S.

En una implementación, la X es O.

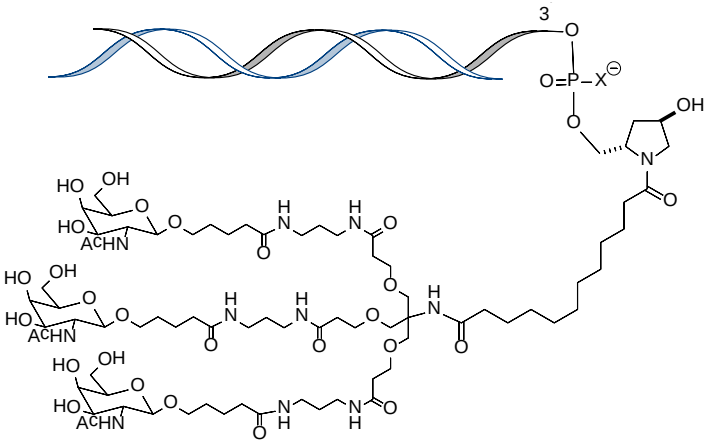
En una implementación, la región de complementariedad consiste en la secuencia de nucleótidos de 5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3’ (SEQ ID NO: 15).

En una implementación, el agente iRNA bicatenario comprende una cadena sentido que comprende la secuencia de nucleótidos de 5'-GGUUAACACCAUUUACUUCAA-3’ (SEQ ID NO: 16), y una cadena antisentido que comprende la secuencia de nucleótidos de 5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3' (SEQ ID NO: 15).

En una implementación, la cadena sentido comprende 5'-GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf-3’ (SEQ ID NO: 13) y la cadena antisentido comprende 5'-usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg-3' (SEQ ID NO: 14), en donde A, C, G y U son ribosa A, C, G o U; a, c, g y u son 2'-O-metil (2'-OMe) A, C, G o U; Af, Cf, Gf o Uf son 2'-flúor A, C, G o U; y s es un enlace fosforotioato.

En una implementación, la cadena sentido comprende 5'-GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf-3’ (SEQ ID NO: 13) y la cadena antisentido comprende 5'-usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg-3' (SEQ ID NO: 14), en donde A, C, G y U son ribosa A, C, G o U; a, c, g y u son 2'-O-metil

(2'-OMe) A, C, G o U; Af, Cf, Gf o Uf son 2'-flúor A, C, G o U; y s es un enlace fosforotioato; y en el que la cadena sentido está conjugada con el ligando como se muestra en el siguiente esquema



y, en donde X es O o S.

En una implementación, el agente se administra como una composición farmacéutica. En una implementación, el agente iRNA se administra en una solución no tamponada, tal como solución salina o agua.

En otra implementación, el siRNA se administra con una solución tampón, tal como una solución tampón que comprende acetato, citrato, prolamina, carbonato o fosfato o cualquier combinación de los mismos. En una implementación, la solución tampón es solución salina tamponada con fosfato (PBS).

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona kits para realizar los métodos de la invención. Los kits pueden incluir un agente iRNA de la invención, y las instrucciones de uso, y opcionalmente, medios para administrar el agente iRNA al sujeto.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1A es un gráfico que representa los efectos de una sola dosis subcutánea de 0,03 mg/kg de AD-57213 en los niveles de generación de trombina en plasma en un sujeto humano sano.

La Figura 1B es un gráfico que representa los efectos de una sola dosis subcutánea de 0,03 mg/kg de AD-57213 en los niveles de generación de trombina en plasma en un sujeto humano sano.

La Figura 1C es un gráfico que representa los efectos de una única dosis subcutánea de 0,03 mg/kg de AD-57213 en los niveles de generación de trombina en plasma en un sujeto humano sano.

La Figura 1D es un gráfico que representa los efectos de una única dosis subcutánea de 0,03 mg/kg de AD-57213 en los niveles de generación de trombina en plasma en un sujeto humano sano.

La Figura 2A es un gráfico que representa los efectos de una única dosis subcutánea de 0,03 mg/kg de AD-57213 sobre los niveles de proteína AT (Serpinc1) en plasma en un sujeto humano sano.

La Figura 2B es un gráfico que representa los efectos de una única dosis subcutánea de 0,03 mg/kg de AD-57213 en los niveles de proteína AT (Serpinc1) en plasma en un sujeto humano sano.

La Figura 3 es un gráfico que representa la asociación entre el porcentaje de disminución de AT (Serpinc1) y el porcentaje de aumento en la generación pico de trombina en sujetos sanos a los que se administró una única dosis subcutánea de 0,03 mg/kg de AD-57213.

La Figura 4 es un gráfico que representa el efecto de dosis múltiples de 0,015 mg/kg, 0,045 mg/kg o 0,075 mg/kg de AD-57213 en niveles de proteína AT (Serpinc1) en plasma en sujetos humanos que tienen Hemofilia A o B.

La Figura 5A es un gráfico que representa el efecto de dosis múltiples de 0,225 mg/kg, 0,450 mg/kg, 0,900 mg/kg, 1,800 mg/kg u 80 mg de AD-57213 en niveles de proteína AT (Serpinc1) en plasma en sujetos humanos que tienen Hemofilia A o B.

La Figura 5B es un gráfico que representa el efecto dependiente de la dosis de AD-57213 en los niveles de proteína de AT (Serpinc1) en plasma en sujetos humanos.

La Figura 6A es un gráfico que representa el efecto de múltiples dosis de 0,015 mg/kg o 0,045 mg/kg de AD-57213 sobre los niveles pico de trombina en sujetos humanos que tienen Hemofilia A o B.

La Figura 6B es un gráfico que representa el efecto de dosis múltiples de 0,015 mg/kg o 0,045 mg/kg de AD-57213 sobre la generación de trombina como un cambio porcentual con respecto a la línea base del grupo en sujetos humanos que tienen Hemofilia A o B.

La Figura 7 es un gráfico que representa el efecto de múltiples dosis de 0,045 mg/kg de AD-57213 sobre el tiempo de formación de coágulos y el tiempo de coagulación en un sujeto que tiene una hemofilia A (sujeto 101-009).

La Figura 8 es un gráfico que representa la reducción media máxima de AT por dosis equivalente mensual.

La Figura 9 es un gráfico que representa el efecto de múltiples dosis de AD-57213 sobre la generación de trombina por cuartiles reductores de AT.

La Figura 10A es un gráfico que representa la actividad relativa de AT en relación con el porcentaje de generación pico de trombina alcanzada con el Factor VIII según se determina en un sujeto al que se administró 225 mcg/kg qM de AD-57213.

La Figura 10B es un gráfico que representa la actividad de AT relativa en relación con el porcentaje de generación pico de trombina alcanzada con el Factor VIII según se determina en un sujeto al que se administró 1800 mcg/kg qM de AD-57213.

La Figura 10C es un gráfico que representa la actividad de AT relativa en relación con el porcentaje de generación pico de trombina alcanzada con el Factor VIII según se determina en un sujeto al que se administró 80 mg qM de AD-57213.

La Figura 11 es un gráfico que representa el efecto de múltiples dosis de AD-57213 en eventos de sangrado por AT reduciendo cuartiles.

La Figura 12 es una tabla que muestra los datos de eventos de sangrado para los sujetos inscritos en la Parte C de la Fase I de ensayo clínico de AD-57213.

La Figura 13A es un gráfico que muestra la meobjetivo de la tasa de sangrado anual (ABR) antes del inicio del estudio, en la Parte de inicio del estudio

y durante la Parte de observación del estudio para todas las cohortes de dosificación en la Parte C de la Fase I ensayo clínico de AD-57213.

La Figura 13B es un gráfico que muestra la meobjetivo de la tasa de sangrado anual (ABR) antes del inicio del estudio, en la Parte de inicio del estudio y durante la Parte de observación del estudio para la cohorte mensual de 80 mg (80 mg qM x 3) en la Parte C de la Fase I ensayo clínico de AD-57213.

La Figura 14A es un gráfico que representa la actividad de AT relativa en relación con el porcentaje de generación pico de trombina alcanzada con el Factor VIII según se determina en un sujeto inhibidor al que se le administró una dosis mensual fija de 50 mg de AD-57213.

La Figura 14B es un gráfico que representa la actividad de AT relativa en relación con el porcentaje de generación pico de trombina alcanzada con el Factor VIII según se determina en un sujeto inhibidor al que se le administró una dosis mensual fija de 50 mg de AD-57213.

La Figura 14C es un gráfico que representa la actividad de AT relativa en relación con el porcentaje de generación pico de trombina alcanzada con el Factor VIII según se determina en un sujeto inhibidor al que se le administró una dosis mensual fija de 50 mg de AD-57213.

La Figura 14D es un gráfico que representa la actividad de AT relativa en relación con el porcentaje de generación pico de trombina alcanzada con el Factor VIII según se determina en un sujeto inhibidor al que se administró una dosis mensual fija de 50 mg de AD-57213.

La Figura 14E es un gráfico que representa la actividad de AT relativa en relación con el porcentaje de generación pico de trombina alcanzada con el Factor VIII según se determina en un sujeto inhibidor al que se administró una dosis mensual fija de 50 mg de AD-57213.

La Figura 14F es un gráfico que representa la actividad de AT relativa en relación con el porcentaje de generación pico de trombina alcanzada con el Factor VIII según se determina en un sujeto inhibidor al que se administró una dosis mensual fija de 50 mg de AD-57213.

La Figura 15 es un gráfico que representa el efecto de múltiples dosis de 50 mg u 80 mg de AD-57213 sobre la actividad media de AT (Serpinc1) con relación a la línea base en sujetos humanos que tienen Hemofilia A o B con inhibidores.

La Figura 16 es un gráfico que representa que el efecto reductor de AT de múltiples dosis de 50 mg de AD-57213 se correlaciona con una mayor generación de trombina en un sujeto que tiene una hemofilia A.

La Figura 17A es una tabla que muestra los datos de eventos de sangrado para los sujetos inscritos en la Parte D de la Fase I del ensayo clínico de AD-57213.

La Figura 17B es un gráfico que muestra la meobjetivo del índice de sangrado anual (ABR) antes del inicio del estudio, en la Parte de inicio del estudio y durante la Parte de observación del estudio para todos los sujetos en la Parte D de la Fase I del ensayo clínico de AD-57213.

La Figura 18 es un gráfico que representa el efecto de múltiples dosis de 80 mg de AD-57213 sobre la actividad media AT (Serpinc1) relativa a la línea de base en un sujeto humano que tiene una hemofilia sin inhibidores en el estudio de extensión de etiqueta abierta (OLE) de Fase II de AD-57213.

La Figura 19A es un gráfico que representa el efecto de múltiples dosis de 50 mg u 80 mg de AD-57213 sobre la actividad media de AT (Serpinc1) con respecto a la línea de base en sujetos humanos que tienen Hemofilia A o B sin inhibidores en el estudio de extensión de etiqueta abierta (OLE) de Fase II de AD-57213.

La Figura 19B es un gráfico que representa el efecto de múltiples dosis de 50 mg u 80 mg de AD-57213 en la generación pico de trombina en sujetos humanos que tienen Hemofilia A o B sin inhibidores en el estudio de extensión de

etiqueta abierta (OLE) de Fase II de AD-57213. La Parte sombreada del gráfico representa el rango observado de niveles pico de trombina en voluntarios humanos sanos (HV) a quienes se les administró AD-57213 y con menos del 25% de reducción de la AT en el ensayo de Fase I de AD-57213 descrito en el Ejemplo 1. La línea punteada a través del rango de HV, representa el nivel pico promedio de trombina observado en voluntarios humanos sanos (HV) y con una disminución de AT de menos del 25% a quienes se les administró AD-57213 en el ensayo de Fase I de AD-57213 descrito en el Ejemplo 1.

La Figura 20A es una tabla que muestra los datos del evento de sangrado para los sujetos incluidos en el ensayo clínico Fase II OLE de AD-57213.

La Figura 20B es un gráfico que muestra la meobjetivo del índice de sangrado anual (ABR) antes del inicio del estudio, en la Parte de inicio del estudio y durante la Parte de observación del estudio para todos los sujetos del ensayo clínico Fase II OLE de AD-57213.

Descripción Detallada de la Invención

La presente invención se basa, al menos en parte, en el sorprendente descubrimiento que dosis muy bajas (*e.g.* dosis al menos aproximadamente 30 veces menores que las dosis enseñadas en el arte) de un agente iRNA bicatenario enlazado con GalNAc que comprende modificaciones químicas particulares

muestra una potencia excepcional para inhibir la expresión de Serpinc1, así como una duración excepcional de la inhibición de la expresión de Serpinc1. Específicamente, bajas dosis de agentes iRNA que incluyen un ligando de GalNAc en el que sustancialmente todos los nucleótidos son nucleótidos modificados, tales como un agente iRNA que incluye uno o más motivos de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos, incluyendo uno de tales motivos en el sitio de escisión de los agentes, seis enlaces de fosforotioato y un ligando de GalNAc se muestran aquí como excepcionalmente efectivas y duraderos para silenciar la actividad del gen Serpinc1.

Por consiguiente, la presente invención proporciona métodos para prevenir al menos un síntoma, *e.g.* hemorragia, en un sujeto, que tiene un trastorno, que se beneficiaría de la inhibición o reducción de la expresión de un gen Serpinc1, *e.g.* una enfermedad asociada a Serpinc1, tal como hemofilia (*e.g.* hemofilia A, hemofilia B o hemofilia C), usando composiciones iRNA que efectúan el corte mediado por el complejo de silenciamiento (RISC) RNA inducido de la transcripción RNA de un gen Serpinc1. La presente invención proporciona además métodos para tratar un sujeto, que tiene un trastorno, que se beneficiaría de inhibir o reducir la expresión de un gen Serpinc1, *e.g.* un trastorno hemorrágico, tal como hemofilia (*e.g.* hemofilia A, hemofilia B o hemofilia C), usando composiciones iRNA que efectúan el corte mediado por el complejo de silenciamiento (RISC) RNA inducido de la transcripción RNA de un gen Serpinc1.

Los agentes iRNA para uso en los métodos de la invención generalmente incluyen una cadena RNA (la cadena antisentido) que tiene una región que es de aproximadamente 30 nucleótidos o menos de longitud, *e.g.*15-30, 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23, o 21-22 nucleótidos de longitud, región que es sustancialmente complementaria a al menos Parte de una transcripción de mRNA de un gen Serpinc1.

En otras implementaciones, una o ambas cadenas de los agentes iRNA bicatenario de la invención tiene una longitud de hasta 66 nucleótidos, *e.g.* 36-66, 26-36, 25-36, 31-60, 22-43, 27-53 nucleótidos de longitud, con una región de al menos 19 nucleótidos contiguos que es sustancialmente complementaria a al menos una Parte de una transcripción de mRNA de un gen Serpinc1. En algunas implementaciones, las cadenas sentido y antisentido, forman un dúplex de 18-30 nucleótidos contiguos.

En algunas implementaciones, los agentes iRNA para uso en los métodos de la invención incluyen una cadena RNA (la cadena antisentido) que puede tener hasta 66 nucleótidos de longitud, *e.g.* 36-66, 26-36, 25-36, 31-60, 22-43, 27-53 nucleótidos de longitud, con una región de al menos 19 nucleótidos contiguos que

es sustancialmente complementaria a al menos una Parte de un transcrito de mRNA de un gen Serpinc1. En algunas implementaciones, tales agentes iRNA que tienen cadenas antisentido de longitud más larga pueden incluir una segunda cadena RNA (la cadena sentido) de 20-60 nucleótidos de longitud en la que las cadenas sentido y antisentido forman un dúplex de 18-30 nucleótidos contiguos.

La siguiente descripción detallada describe cómo hacer y usar composiciones que contienen iRNA para inhibir la expresión de un gen Serpinc1, así como composiciones, usos y métodos para tratar sujetos, que tienen enfermedades y trastornos, que se beneficiarían de la inhibición y/o reducción de la expresión de este gen.

I. Definiciones

Para que la presente invención se pueda entender más fácilmente, primero se definen ciertos términos. Además, se debe observar que siempre que se indique un valor o rango de valores de un parámetro, se pretende que los valores e intervalos intermedios a los valores indicados también se destinan a ser Parte de esta invención.

Los artículos "un" y "una" se usan en este documento para referirse a uno o más de uno (i.e., al menos a uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de

ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento, *e.g.* una pluralidad de elementos.

El término "que incluye" se usa en este documento para significar, y se usa de manera intercambiable con, la frase "que incluye pero no se limita a".

El término "o" se usa en este documento para significar, y se usa de manera intercambiable con, el término "y/o", a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Como se usa en este documento, "Serpinc1" se refiere a un polipéptido particular expresado en una célula. Serpinc1 también se conoce como inhibidor de serpin péptidasas, clado C (antitrombina; AT), miembro 1; antitrombina III; AT3; antitrombina; y el cofactor de heparina 1. La secuencia de un transcrito de mRNA de Serpinc1 humano se puede encontrar, por ejemplo, en el número de acceso de GenBank GI: 254588059 (NM_000488; SEC ID NO.: 1). La secuencia de mRNA de Serpinc1 de rhesus se puede encontrar en, por ejemplo, número de acceso de GenBank GI: 157167169 (NM_001104583; SEC ID NO.: 2). La secuencia del mRNA de Serpinc1 de ratón se puede encontrar, por ejemplo, en el número de acceso de GenBank GI: 237874216 (NM_080844; SEC ID NO.: 3). La secuencia del mRNA de Serpinc1 de rata se puede encontrar, por ejemplo, en el número de acceso de GenBank GI: 58865629 (NM_001012027; SEC ID NO.: 4).

El término "Serpinc1" como se usa en el presente documento también se refiere a un polipéptido particular expresado en una célula por variaciones de secuencia de DNA de origen natural del gen Serpinc1, tal como un polimorfismo de un solo nucleótido en el gen Serpinc1. Han sido identificados numerosos SNP dentro del gen Serpinc1 y se pueden encontrar en, por ejemplo, NCBI dbSNP (ver, por ejemplo, www.ncbi.nlm.nih.gov/snp). Los ejemplos no limitantes de SNP dentro del gen Serpinc1 se pueden encontrar en, NCBI dbSNP, números de acceso rs677; rs5877; rs5878; rs5879; rs941988; rs941989; rs1799876; rs19637711; rs2008946; y rs2227586.

Como se usa en este documento, un "sujeto" es un animal, tal como un mamífero, que incluye un primate (tal como un humano, un primate no humano, *e.g.* un mono y un chimpancé), un no primate (tal como una vaca, un cerdo, un camello, una llama, un caballo, una cabra, un conejo, una oveja, un hámster, un conejillo de Indias, un gato, un perro, una rata, un ratón, un caballo y una ballena), o un pájaro (*e.g.* un pato o un ganso). En una implementación, el sujeto es un ser humano, tal como un ser humano tratado o evaluado para una enfermedad, trastorno o afección que se beneficiaría de la reducción en la expresión de Serpinc1; un humano en riesgo de una enfermedad, trastorno o condición que se beneficiaría de la reducción de la expresión de Serpinc1; un humano que tiene una enfermedad, trastorno o afección que se beneficiaría de la reducción en la expresión de Serpinc1; y/o ser humano tratado por una enfermedad, trastorno o

afección que se beneficiaría de la reducción de la expresión de Serpinc1 como se describe en este documento.

Como se usa en este documento, los términos "tratar" o "tratamiento" se refieren a un resultado beneficioso o deseado que incluye, pero no se limita a, alivio o mejora de uno o más síntomas, disminuyendo el grado de sangrado, estado estabilizado del sangrado (i.e., no empeoramiento), mejora o paliación de la hemorragia, ya sea detectable o indetectable. El "tratamiento" también puede significar la prolongación de la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada en ausencia de tratamiento. En los métodos de la invención, el tratamiento incluye el tratamiento bajo demanda y control de los eventos de hemorragia, el manejo perioperatorio de la hemorragia y la profilaxis de rutina para reducir la frecuencia de los eventos de sangrado.

El término "inferior" en el contexto del nivel de una Serpinc1 en un sujeto o un marcador o síntoma de enfermedad se refiere a una disminución estadísticamente significativa en dicho nivel. La disminución puede ser, por ejemplo, al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 35%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95% o más y es preferiblemente hasta un nivel aceptado como dentro del rango de normal para un individuo sin tal trastorno.

Como se usa en este documento, "prevención" o "prevenir" cuando se usa en referencia a una enfermedad, trastorno o afección de la misma, que se beneficiaría de una reducción en la expresión de un gen Sertpinc1, se refiere a una reducción en la probabilidad de que un sujeto desarrolle un síntoma asociado con una enfermedad, trastorno o afección de este tipo, *e.g.* un síntoma como una hemorragia. La probabilidad de desarrollar una hemorragia se reduce, por ejemplo, cuando un individuo que tiene uno o más factores de riesgo para una hemorragia o bien, no desarrolla una hemorragia, o desarrolla una hemorragia con menor gravedad en relación con una población que tiene los mismos factores de riesgo y no recibe tratamiento como se describe aquí. El hecho de no desarrollar una enfermedad, trastorno o afección, o la reducción en el desarrollo de un síntoma asociado con dicha enfermedad, trastorno o afección (*e.g.* Al menos alrededor del 10% en una escala clínicamente aceptada para esa enfermedad o trastorno), o la exhibición retardada de síntomas retrasados (*e.g.* por días, semanas, meses o años) se considera una prevención efectivo.

Tal como se usa en el presente documento, el término "trastorno hemorrágico" es una enfermedad o trastorno que produce coagulación deficiente y/o hemorragia excesiva. Un trastorno hemorrágico puede ser un trastorno hereditario, como una hemofilia o enfermedad de von Willebrand, o un trastorno adquirido, asociado con, por ejemplo, coagulación intravascular diseminada, eclampsia asociada al embarazo, deficiencia de vitamina K, un trastorno autoinmune, enfermedad inflamatoria del intestino, colitis ulcerosa, un trastorno

dermatológico (*e.g.* psoriasis, pénfigo), una enfermedad respiratoria (*e.g.* asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica), una reacción alérgica a medicamentos, *e.g.* el resultado de medicamentos, como aspirina, heparina y warfarina, diabetes, infección aguda por hepatitis B, infección aguda por hepatitis C, una enfermedad maligna o un tumor sólido (*e.g.* próstata, pulmón, colon, páncreas, estómago, conducto biliar, cabeza y cuello, cuello uterino, mama, melanoma, riñón y/o neoplasia hematológica). En una implementación, un trastorno hemorrágico hereditario es una hemofilia, *e.g.* hemofilia A, B o C. En una implementación, un sujeto, que tiene un trastorno, hemorrágico hereditario, *e.g.* una hemofilia, ha desarrollado inhibidores, *e.g.* inhibidores de aloanticuerpos, para las terapias de coagulación de remplazo y se denomina en este documento "sujeto inhibidor". En una implementación, el sujeto inhibidor tiene una hemofilia A. En otra implementación, el sujeto inhibidor tiene una hemofilia B. En otra implementación más, el sujeto inhibidor tiene una hemofilia C.

"Cantidad terapéuticamente efectiva", como se usa en el presente documento, pretende incluir la cantidad de un agente iRNA que, cuando se administra a un sujeto, que tiene un trastorno, hemorrágico y sangrado, es suficiente para efectuar el tratamiento de la enfermedad (*e.g.* disminuyendo, mejorando o manteniendo la enfermedad existente o uno o más síntomas de la enfermedad). La "cantidad terapéuticamente efectiva" puede variar dependiendo del agente iRNA, cómo se administra el agente, la enfermedad y su gravedad y la historia, edad, peso, antecedentes familiares, composición genética, los tipos de

tratamientos anteriores o concomitantes, si los hubiera, y otras características individuales del sujeto a tratar.

"Cantidad profilácticamente efectiva", como se usa en este documento, pretende incluir la cantidad de un iRNA que, cuando se administra a un sujeto, que tiene un trastorno, hemorrágico pero no sangrado, *e.g.* un sujeto, que tiene un trastorno, hemorrágico y está programado para cirugía (*e.g.* tratamiento perioperatorio), es suficiente para prevenir o mejorar la enfermedad o uno o más síntomas de la enfermedad. La mejoría de la enfermedad incluye ralentizar el curso de la enfermedad o reducir la gravedad de una enfermedad en desarrollo posterior. La "cantidad profilácticamente efectiva" puede variar dependiendo del iRNA, cómo se administra el agente, el grado de riesgo de la enfermedad y la historia, edad, peso, antecedentes familiares, composición genética, los tipos de tratamientos anteriores o concomitantes, si los hubiera y otras características individuales del paciente a tratar.

Una "cantidad terapéuticamente efectiva" o "cantidad profilácticamente efectiva" también incluye una cantidad de un agente iRNA que produce algún efecto local o sistémico deseado a una relación beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento. El iRNA empleado en los métodos de la presente invención se puede administrar en una cantidad suficiente para producir una relación beneficio/riesgo razonable aplicable a dicho tratamiento.

La frase "farmacéuticamente aceptable" se emplea en este documento para referirse a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que, dentro del alcance de un juicio médico sólido, son adecuados para el uso en contacto con tejidos de sujetos humanos y animales sin toxicidad excesiva, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, acorde con una relación beneficio/riesgo razonable.

La frase "vehículo farmacéuticamente aceptable" como se usa en este documento significa un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como una carga líquida o sólida, diluyente, excipiente, ayuda de fabricación (*e.g.* lubricante, talco, magnesio, calcio o estearato de zinc, o ácido esteárico), o material encapsulante de solvente, implicado en llevar o transportar el compuesto objeto desde un órgano, o Parte del cuerpo, a otro órgano, o Parte del cuerpo. Cada portador debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación y no ser perjudicial para el sujeto que se está tratando. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; (2) almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata; (3) celulosa y sus derivados, tales como carboximetil celulosa sódica, etil celulosa y acetato de celulosa; (4) tragacanto en polvo; (5) malta; (6) gelatina; (7) agentes lubricantes, tales como el estado de magnesio, lauril sulfato de sodio y talco; (8) excipientes, tales como manteca de cacao y ceras para supositorios; (9) aceites, tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo,

aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soya; (10) glicoles, tales como propilenglicol; (11) polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; (12) ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; (13) agar; (14) agentes tamponantes, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; (15) ácido algínico; (16) agua libre de pirógenos; (17) solución salina isotónica; (18) solución de Ringer; (19) alcohol etílico; (20) soluciones tamponadas de pH; (21) poliésteres, policarbonatos y/o polianhídridos; (22) agentes de carga, tales como polipéptidos y aminoácidos (23) componentes del suero, tales como albúmina sérica, HDL y LDL; y (22) otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en formulaciones farmacéuticas.

Como se usa en este documento, "secuencia objeto" se refiere a una Parte contigua de la secuencia de nucleótidos de una molécula de mRNA formada durante la transcripción de un gen Serpinc1, que incluye mRNA que es un producto de procesamiento RNA de un producto de transcripción primario. En una implementación, la Parte objeto de la secuencia será al menos lo suficientemente larga como para servir como sustrato para la escisión dirigida por iRNA en o cerca de esa Parte de la secuencia de nucleótidos de una molécula de mRNA formada durante la transcripción de un gen Serpinc1.

La secuencia objeto puede ser de aproximadamente 9-36 nucleótidos de longitud, *e.g.* de aproximadamente 15-30 nucleótidos de longitud. Por ejemplo, la secuencia objeto puede ser de aproximadamente 15-30 nucleótidos, 15-29, 15-28,

15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21., 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18 -22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21 -29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 o 21-22 nucleótidos de longitud. Los rangos y longitudes intermedios a los intervalos y longitudes mencionados anteriormente también se contemplan como Parte de la invención.

Como se usa en el presente documento, el término "cadena que comprende una secuencia" se refiere a un oligonucleótido que comprende una cadena de nucleótidos que se describe mediante la secuencia a la que se hace referencia usando la nomenclatura de nucleótidos estándar.

"G", "C", "A", "T" y "U" representan cada uno generalmente un nucleótido que contiene guanina, citosina, adenina, timidina y uracilo como base, respectivamente. Sin embargo, se entenderá que el término "ribonucleótido" o "nucleótido" también se puede referir a un nucleótido modificado, como se detalla más adelante, o un resto de remplazo sustituto (ver, *e.g.* la Tabla 1). El versado en el arte es consciente que la guanina, la citosina, la adenina y el uracilo se pueden reemplazar por otros restos sin alterar sustancialmente las propiedades de apareamiento de bases de un oligonucleótido que comprende un nucleótido que porta dicho resto de sustitución. Por ejemplo, pero no se limitan, un nucleótido que comprende inosina como base puede formar pares de bases con nucleótidos que

contienen adenina, citosina o uracilo. Por lo tanto, los nucleótidos que contienen uracilo, guanina o adenina se pueden reemplazar en las secuencias de nucleótidos del dsRNA presentado en la invención por un nucleótido que contiene, por ejemplo, inosina. En otro ejemplo, la adenina y la citosina en cualquier Parte del oligonucleótido se pueden reemplazar con guanina y uracilo, respectivamente, para formar un apareamiento de base Wobble G-U con el mRNA objeto. Las secuencias que contienen tales restos de reemplazo son adecuadas para las composiciones y métodos presentados en la invención.

Los términos "iRNA", "agente iRNA", "agente iRNA", "agente interferente RNA" como se usan de forma intercambiable en este documento, se refieren a un agente que contiene RNA tal como se define aquí, y que media la escisión dirigida de un transcripto RNA a través de una vía del complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC). El iRNA dirige la degradación específica de secuencia del mRNA a través de un proceso conocido como interferencia RNA (iRNA). El iRNA modula, *e.g.* inhibe la expresión de Serpinc1 en una célula, *e.g.* una célula dentro de un sujeto, tal como un sujeto mamífero.

En una implementación, un agente iRNA de la invención incluye un RNA monocatenario que interactúa con una secuencia RNA objeto, *e.g.* una secuencia de mRNA objeto de Serpinc1, para dirigir la escisión del RNA objeto. Sin pretender imponer ninguna teoría, se cree que el RNA bicatenario largo introducido en las células se rompe en siRNA mediante una endonucleasa de tipo III conocida como

Dicer (Sharp et al., (2001) Genes Dev. 15: 485). Dicer, una enzima de tipo ribonucleasa III, procesa el dsRNA en RNA de interferencia de pares de base cortos de 19-23 con dos proyecciones 3' características (Bernstein, *et al.,* (2001) Nature 409: 363). Los siRNA se incorporan en un complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC) donde una o más helicasas desenrollan el dúplex de siRNA, permitiendo que la cadena complementaria antisentido guíe el reconocimiento del objetivo (Nykanen, *et al.,* (2001) Cell 107: 309). Tras la unión al mRNA objeto apropiado, una o más endonucleasas dentro del RISC escinden el objetivo para inducir el silenciamiento (Elbashir, *et al.,* (2001) Genes Dev. 15: 188). Por lo tanto, en un aspecto, la invención se refiere a un RNA monocatenario (siRNA) generado dentro de una célula y que promueve la formación de un complejo RISC para efectuar el silenciamiento del gen objetivo, i.e., un gen Serpinc1. De acuerdo con esto, el término "siRNA" también se usa en el presente documento para referirse a un iRNA como se describió anteriormente.

En otra implementación, el agente iRNA puede ser un siRNA monocatenario que se introduce en una célula u organismo para inhibir un mRNA objeto. Los agentes iRNA monocatenarios se unen a la endonucleasa RISC, Argonaute 2, que luego escinde el mRNA objeto. Los siRNA monocatenarios generalmente tienen 15-30 nucleótidos y están modificados químicamente. El diseño y prueba de los siRNA monocatenarios se describen en la patente de Estados Unidos Nº. 8,101,348 y en Lima *et al.,* (2012) Cell 150: 883-894, cuyos contenidos completos de cada una de las cuales se incorporan aquí como

referencia. Cualquiera de las secuencias de nucleótidos antisentido descritas en este documento se puede usar como un siRNA monocatenario como se describe en este documento o como químicamente modificado por los métodos descritos en Lima *et al.,* (2012) Cell 150: 883-894.

En otra implementación, un " iRNA" para usar en las composiciones, usos y métodos de la invención es un RNA bicatenario y se denomina en este documento "agente iRNA bicatenario", "molécula RNA de doble cadena (dsRNA)". "Agente dsRNA" o "dsRNA". El término "dsRNA" se refiere a un complejo de moléculas de ácido ribonucleico que tiene una estructura dúplex que comprende dos cadenas de ácido nucleico antiparalelas y sustancialmente complementarias, denominadas orientaciones "sentido" y "antisentido" con respecto a un RNA objeto, i.e., un gen Serpinc1. En algunas implementaciones de la invención, un RNA bicatenario (dsRNA) desencadena la degradación de un RNA objeto, *e.g.* un mRNA, a través de un mecanismo de silenciamiento génico postranscripcional referido aquí como RNA de interferencia o iRNA.

En general, la mayoría de los nucleótidos de cada cadena de una molécula de dsRNA son ribonucleótidos, pero como se describe en detalle en este documento, cada una o ambas cadenas también pueden incluir uno o más ribonucleótidos diferentes, *e.g.* un desoxirribonucleótido y/o un nucleótido modificado. Además, como se usa en esta especificación, un "agente iRNA" puede

incluir ribonucleótidos con modificaciones químicas; un agente iRNA puede incluir modificaciones sustanciales en múltiples nucleótidos.

Como se usa en el presente documento, el término "nucleótido modificado" se refiere a un nucleótido que tiene, independientemente, un resto de azúcar modificado, un enlace internucleótido modificado, y/o una nucleobase modificada. Por lo tanto, el término nucleótido modificado abarca sustituciones, adiciones o eliminación de, *e.g.* un grupo o átomo funcional, para enlaces internucleosídicos, restos de azúcar o nucleobases. Las modificaciones adecuadas para uso en los agentes de la invención incluyen todos los tipos de modificaciones descritas en este documento o conocidas en el arte. Cualquiera de tales modificaciones, tal como se usa en una molécula de tipo siRNA, están abarcadas por "agente iRNA" para los fines de especificación y reivindicaciones.

La región dúplex puede ser de cualquier longitud que permita la degradación específica de un RNA objetivo deseado a través de una ruta RISC, y puede variar de aproximadamente 9 a 36 pares de bases de longitud, *e.g.* aproximadamente 15-30 pares de bases de longitud, por ejemplo, aproximadamente 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, o 36 pares de bases de longitud, tal como aproximadamente 15-30, 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24,

19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23, o 21-22 pares de bases de longitud. Los rangos y longitudes intermedios a los intervalos y longitudes mencionados anteriormente también se contemplan como Parte de la invención.

Las dos cadenas que forman la estructura dúplex pueden ser Partes diferentes de una molécula RNA mayor, o pueden ser moléculas RNA separadas. Donde las dos cadenas son Parte de una molécula más grande, y por lo tanto están conectadas por una cadena ininterrumpida de nucleótidos entre el extremo 3´ de una cadena y el extremo 5' de la otra cadena respectiva formando la estructura dúplex, la cadena RNA de conexión se denomina "bucle de horquilla". Un bucle de horquilla puede comprender al menos un nucleótido no apareado. En algunas implementaciones, el bucle de horquilla puede comprender al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 20, en al menos 23 o más nucleótidos desapareados.

Cuando las dos cadenas sustancialmente complementarias de un dsRNA están comprendidas por moléculas RNA separadas, esas moléculas no necesitan, pero pueden estar conectadas covalentemente. Cuando las dos cadenas están conectadas covalentemente por medios distintos de una cadena ininterrumpida de nucleótidos entre el extremo 3´ de una cadena y el extremo 5' de la otra cadena respectiva que forma la estructura dúplex, la estructura de conexión se conoce

como un "enlazador". Las cadenas RNA pueden tener el mismo o diferente número de nucleótidos. El número máximo de pares de bases es el número de nucleótidos en la cadena más corta del dsRNA menos cualquier saliente que esté presente en el dúplex. Además de la estructura dúplex, una iRNA puede comprender uno o más salientes de nucleótidos.

En una implementación, un agente iRNA de la invención es un dsRNA de 24-30 nucleótidos que interactúa con una secuencia RNA objetivo, *e.g.* una secuencia de mRNA objeto Serpinc1, para dirigir la escisión del RNA objeto. Sin desear estar ligado a la teoría, el RNA bicatenario largo introducido en las células se rompe en siRNA mediante una endonucleasa tipo III conocida como Dicer (Sharp *et al.,* (2001) Genes Dev. 15: 485). Dicer, una enzima tipo ribonucleasa III, procesa el dsRNA en RNA de interferencia cortos de 19-23 pares de bases con dos proyecciones 3' características (Bernstein, *et al.,* (2001) Nature 409: 363). Los siRNA luego se incorporan en un complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC) donde una o más helicasas desenrollan el dúplex siRNA, permitiendo que la cadena complementaria antisentido guíe el reconocimiento del objetivo (Nykanen, *et al.,* (2001) Cell 107: 309). Tras la unión al mRNA objeto apropiado, una o más endonucleasas dentro del RISC escinden el objetivo para inducir el silenciamiento (Elbashir, *et al.,* (2001) Genes Dev. 15: 188).

Como se usa en el presente documento, el término "saliente de nucleótido" se refiere a al menos un nucleótido no apareado que sobresale de la estructura

dúplex de un iRNA, *e.g.* un dsRNA. Por ejemplo, cuando un extremo 3´ de una cadena de un dsRNA se extiende más allá del extremo 5' de la otra cadena, o viceversa, hay un saliente de nucleótido. Un dsRNA puede comprender un saliente de al menos un nucleótido; alternativamente, el saliente puede comprender al menos dos nucleótidos, al menos tres nucleótidos, al menos cuatro nucleótidos, al menos cinco nucleótidos o más. Un saliente de nucleótido puede comprender o consistir en un análogo de nucleótido/nucleósido, que incluye un desoxinucleótido/nucleósido. El (los) saliente(s) puede(n) estar en la cadena sentido, la cadena antisentido o cualquier combinación de los mismos. Además, el (los) nucleótido(s) de un saliente pueden estar presentes en el extremo 5', el extremo 3' o ambos extremos de una cadena sentido o antisentido de un dsRNA.

En una implementación, la cadena antisentido de un dsRNA tiene un nucleótido de 1-10, *e.g.* un 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos, saliente en el extremo 3' y/o el extremo 5'. En una implementación, la cadena sentido de un dsRNA tiene un nucleótido de 1-10, *e.g.* un 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos, saliente en el extremo 3' y/o el extremo 5'. En otra implementación, uno o más de los nucleótidos en el saliente se reemplazan por un nucleósido tiofosfato.

En ciertas implementaciones, el saliente en la cadena sentido o la cadena antisentido, o ambas, puede incluir longitudes extendidas más largas que 10 nucleótidos, *e.g.* 10-30 nucleótidos, 10-25 nucleótidos, 10-20 nucleótidos o 10-15 nucleótidos de longitud . En ciertas implementaciones, un saliente extendido está

en la cadena sentido del dúplex. En ciertas implementaciones, un saliente extendido está presente en el extremo 3´ de la cadena sentido del dúplex. En ciertas implementaciones, un saliente extendido está presente en el extremo 5’ de la cadena sentido del dúplex. En ciertas implementaciones, un saliente extendido está en la cadena antisentido del dúplex. En ciertas implementaciones, un saliente extendido está presente en el extremo 3´ de la cadena antisentido del dúplex. En ciertas implementaciones, un saliente extendido está presente en el extremo 5’ de la cadena antisentido del dúplex. En ciertas implementaciones, uno o más de los nucleótidos en el saliente extendido se reemplaza con un nucleósido tiofosfato.

"Extremo romo" o "romo" significa que no hay nucleótidos no apareados en ese extremo del agente iRNA bicatenario, i.e., ningún saliente de nucleótido. Un agente iRNA de "extremos romos" es un dsRNA que es de doble cadena en toda su longitud, i.e., no hay saliente de nucleótidos en ninguno de los extremos de la molécula. Los agentes iRNA de la invención incluyen agentes iRNA con salientes de nucleótidos en un extremo (i.e., agentes con un saliente y un extremo romo) o con salientes de nucleótidos en ambos extremos.

El término "cadena antisentido" o "cadena guía" se refiere a la cadena de un iRNA, *e.g.* un dsRNA, que incluye una región que es sustancialmente complementaria a una secuencia objeto, *e.g.* un mRNA de Serpinc1. Como se usa en este documento, el término "región de complementariedad" se refiere a la región en la cadena antisentido que es sustancialmente complementaria a una

secuencia, por ejemplo, una secuencia objeto, *e.g.* una secuencia de nucleótidos Serpinc1, como se define aquí. Cuando la región de complementariedad no es completamente complementaria a la secuencia objeto, las discordancias pueden estar en las regiones internas o terminales de la molécula. Generalmente, los no coincidentes más tolerados están en las regiones terminales, *e.g.* dentro de 5, 4, 3 o 2 nucleótidos del extremo 5' y/o 3' del iRNA.

El término "cadena sentido" o "cadena de pasajero" tal como se usa en el presente documento, se refiere a la cadena de un iRNA que incluye una región que es sustancialmente complementaria a una región de la cadena antisentido según se define dicho término en este documento.

Como se usa en el presente documento, el término "región de escisión" se refiere a una región que está situada inmediatamente adyacente al sitio de escisión. El sitio de escisión es el sitio en el objetivo en el que se produce la escisión. En algunas implementaciones, la región de escisión comprende tres bases en cada extremo e inmediatamente adyacentes al sitio de escisión. En algunas implementaciones, la región de escisión comprende dos bases en cada extremo de, e inmediatamente adyacente al sitio de escisión. En algunas implementaciones, el sitio de escisión se produce específicamente en el sitio unido por los nucleótidos 10 y 11 de la cadena antisentido, y la región de escisión comprende los nucleótidos 11, 12 y 13.

Como se usa en este documento, a menos que se indique lo contrario, el término "complementario" cuando se usa para describir una primera secuencia de nucleótidos en relación con una segunda secuencia de nucleótidos, se refiere a la capacidad de un oligonucleótido o polinucleótido que comprende la primera secuencia de nucleótidos para hibridar y formar estructura dúplex bajo ciertas condiciones con un oligonucleótido o polinucleótido que comprende la segunda secuencia de nucleótidos, como entenderá el versado en el arte. Tales condiciones pueden ser, por ejemplo, condiciones rigurosas, donde las condiciones restrictivas pueden incluir: NaCl 400 mM, PIPES 40 mM pH 6.4, EDTA 1 mM, 50ºC o 70ºC durante 12-16 horas seguido de lavado (ver, *e.g.* “Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook, *et al.,* (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press). Se pueden aplicar otras condiciones, como las condiciones fisiológicamente relevantes que se pueden encontrar dentro de un organismo. El versado en el arte podrá determinar el conjunto de condiciones más apropiadas para una prueba de complementariedad de dos secuencias de acuerdo con la última solicitud de los nucleótidos hibridados.

Las secuencias complementarias dentro de un iRNA, *e.g.* dentro de un dsRNA como se describe aquí, incluyen apareamiento de bases del oligonucleótido o polinucleótido que comprende una primera secuencia de nucleótidos para un oligonucleótido o polinucleótido que comprende una segunda secuencia de nucleótidos en toda la longitud de una o ambas secuencias de nucleótidos. Dichas secuencias se pueden referir como "totalmente

complementarias" entre sí en este documento. Sin embargo, cuando una primera secuencia se denomina "sustancialmente complementaria" con respecto a una segunda secuencia en este documento, las dos secuencias pueden ser completamente complementarias, o pueden formar una o más, pero generalmente no más de 5, 4, 3 o 2 pares de bases desajustadas tras la hibridación para un dúplex de hasta 30 pares de bases, al tiempo que retienen la capacidad de hibridar en las condiciones más relevantes para su aplicación final, *e.g.* la inhibición de la expresión génica a través de una vía de RISC. Sin embargo, cuando se diseñan dos oligonucleótidos para formar, tras la hibridación, uno o más salientes monocatenarios, tales salientes no deben considerarse no coincidentes con respecto a la determinación de la complementariedad. Por ejemplo, un dsRNA que comprende un oligonucleótido de 21 nucleótidos de longitud y otro oligonucleótido de 23 nucleótidos de longitud, en el que el oligonucleótido más largo comprende una secuencia de 21 nucleótidos que es completamente complementario al oligonucleótido más corto, se puede denominar "completamente complementario" para los fines descritos en este documento.

Las secuencias "complementarias", como se usan en este documento, también pueden incluir, o estar formadas enteramente, de pares de bases y/o pares de bases no Watson-Crick formados a partir de nucleótidos no naturales y modificados, en cuanto a los requisitos anteriores con respecto a su capacidad de hibridar se cumple. Tales pares de bases que no son de Watson-Crick incluyen, pero no se limitan a, apareamiento de bases G: U Wobble o Hoogstein.

Los términos "complementario", "completamente complementario" y "sustancialmente complementario" en este documento se pueden usar con respecto a la coincidencia de bases entre la cadena sentido y la cadena antisentido de un dsRNA, o entre la cadena antisentido de un agente iRNA y una secuencia objetivo, como se entenderá desde el contexto de su uso.

Como se usa en este documento, un polinucleótido que es "sustancialmente complementario a al menos Parte de" un RNA mensajero (mRNA) se refiere a un polinucleótido que es sustancialmente complementario a una Parte contigua del mRNA de interés (*e.g.* un mRNA que codifica Serpinc1). Por ejemplo, un polinucleótido es complementario a al menos una Parte de un mRNA de Serpinc1 si la secuencia es sustancialmente complementaria a una Parte no interrumpida de un mRNA que codifica Serpinc1.

Por consiguiente, en algunas implementaciones, los polinucleótidos de cadena antisentido descritos en este documento son completamente complementarios a la secuencia de Serpinc1 objetivo. En otras implementaciones, los polinucleótidos de cadena antisentido descritos aquí son sustancialmente complementarios a la secuencia Serpinc1 objetivo y comprenden una secuencia de nucleótidos contigua que es al menos aproximadamente 80% complementaria en toda su longitud a la región equivalente de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, o un fragmento de SEQ ID NO: 1, tal como aproximadamente 85%, aproximadamente 86%, aproximadamente 87%, aproximadamente 88%,

aproximadamente 89%, aproximadamente 90%, aproximadamente% 91%, aproximadamente 92%, aproximadamente 93%, aproximadamente 94%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, o aproximadamente 99% de complementariedad.

En una implementación, un agente iRNA de la invención incluye una cadena sentido que es sustancialmente complementaria a un polinucleótido antisentido que, a su vez, es complementario a una secuencia Serpinc1 objeto, y en donde el polinucleótido de cadena sentido comprende una secuencia de nucleótidos contigua que es al menos aproximadamente 80% complementario en toda su longitud a la región equivalente de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 5, o un fragmento de cualquiera de SEQ ID NO: 5, tal como aproximadamente 85%, aproximadamente 86%, aproximadamente 87%, aproximadamente 88%, aproximadamente 89%, aproximadamente 90%, aproximadamente% 91%, aproximadamente 92%, aproximadamente 93%, aproximadamente 94%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, o aproximadamente 99% complementario.

En un aspecto de la invención, un agente para uso en los métodos y composiciones de la invención es una molécula RNA antisentido monocatenario que inhibe un mRNA objeto vía de un mecanismo de inhibición antisentido. La molécula RNA antisentido monocatenario es complementaria a una secuencia dentro del mRNA objeto. Los oligonucleótidos antisentido monocatenarios pueden

inhibir la traducción de una manera estequiométrica por apareamiento de bases al mRNA y obstruir físicamente la maquinaria de traducción, ver Dias, N. et al., (2002) Mol Cancer Ther 1: 347-355. La molécula RNA antisentido monocatenario puede tener una longitud de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 nucleótidos y tiene una secuencia que es complementaria a una secuencia objeto. Por ejemplo, la molécula RNA antisentido monocatenario puede comprender una secuencia que es al menos aproximadamente 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más nucleótidos contiguos de cualquiera de las secuencias antisentido descritas aquí.

El término "inhibir", como se usa en este documento, se usa de forma intercambiable con "reducir", "silenciar", "regular a la baja", "suprimir" y otros términos similares, e incluye cualquier nivel de inhibición.

La frase "inhibir la expresión de Serpinc1", como se usa en este documento, incluye la inhibición de la expresión de cualquier gen Serpinc1 (tal como, *e.g.* un gen Serpinc1 de ratón, un gen Serpinc1 de rata, un gen Serpinc1 de mono o un gen Serpinc1 humano) así como variantes o mutantes de un gen Serpinc1 que codifica una proteína Serpinc1.

"Inhibir la expresión de un gen Serpinc1" incluye cualquier nivel de inhibición de un gen Serpinc1, *e.g.* al menos la supresión parcial de la expresión de un gen Serpinc1, tal como una inhibición en al menos aproximadamente 5%, al menos aproximadamente 10%, en al menos aproximadamente 15%, al menos

aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 25%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 45%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 55%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 65%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 91%, al menos aproximadamente 92%, al menos aproximadamente 93%, al menos aproximadamente 94%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96%, al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98%, o al menos aproximadamente 99%.

La expresión de un gen Serpinc1 se puede evaluar con base en el nivel de cualquier variable asociada con la expresión del gen Serpinc1, *e.g.* nivel de mRNA de Serpinc1, nivel de proteína Serpinc1 o, por ejemplo, niveles del complejo trombina: antitrombina como una medida del potencial de generación de trombina, tiempo de sangrado, tiempo de protrombina (PT), recuento de plaquetas y/o tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT). La inhibición se puede evaluar mediante una disminución en un nivel absoluto o relativo de una o más de estas variables en comparación con un nivel de control. El nivel de control puede ser cualquier tipo de nivel de control que se utilice en el arte, *e.g.* un nivel inicial previo a la dosis o un nivel determinado a partir de un sujeto, célula o muestra similar que

no se trata o se trata con un control (tal como, *e.g.* control solo de buffer o control de agente inactivo).

En una implementación, al menos la supresión parcial de la expresión de un gen Serpinc1, se evalúa mediante una reducción de la cantidad de mRNA de Serpinc1 que se puede aislar o detectar en una primera célula o grupo de células en las que se transcribe un gen Serpinc1 y que tiene o ha sido tratada o se ha tratado de manera que se inhibe la expresión de un gen Serpinc1, en comparación con una segunda célula o grupo de células sustancialmente idénticas a la primera célula o grupo de células pero que tiene o no han sido tratadas (células de control). El grado de inhibición se puede expresarse en términos de

$$\frac{\text{(mRNA en células Control)} - \text{(mRNA en Células Tratadas)}}{\text{(mRNA en Células Control)}} \cdot 100\%$$

La frase "poner en contacto una célula con un agente iRNA", tal como un dsRNA, como se usa en el presente documento, incluye poner en contacto una célula por cualquier promedio posible. Poner en contacto una célula con un agente iRNA incluye poner en contacto una célula *in vitro* con el iRNA o poner en contacto una célula *in vivo* con el iRNA. El contacto se puede hacer directa o indirectamente. Así, por ejemplo, el agente iRNA se puede poner en contacto físico con la célula por Parte del individuo que realiza el método o,

alternativamente, el agente iRNA se puede poner en una situación que permita o haga que entre en contacto posteriormente con la célula.

Poner en contacto una célula *in vitro* se puede realizar, por ejemplo, incubando la célula con el agente iRNA. Poner en contacto una célula *in vivo* se puede realizar, por ejemplo, inyectando el agente iRNA en o cerca del tejido donde se encuentra la célula, o inyectando el agente iRNA en otra área, *e.g.* el torrente sanguíneo o el espacio subcutáneo, de manera que el agente alcanzará posteriormente el tejido donde se encuentra la célula a contactar. Por ejemplo, el agente iRNA puede contener y/o estar acoplado a un ligando, *e.g.* GalNAc3, que dirige el agente iRNA a un sitio de interés, *e.g.* el hígado. También son posibles combinaciones de métodos de contacto *in vitro* e *in vivo*. Por ejemplo, una célula también se puede poner en contacto *in vitro* con un agente iRNA y posteriormente trasplantarse a un sujeto.

En una implementación, poner en contacto una célula con un iRNA incluye "introducir" o "administrar el iRNA en la célula" facilitando o efectuando la entrada o absorción en la célula. La absorción o captación de un iRNA puede ocurrir a través de procesos celulares difusivos o activos sin ayuda, o por agentes o dispositivos auxiliares. La introducción de un iRNA en una célula puede ser *in vitro* y/o *in vivo*. Por ejemplo, para la introducción *in vivo*, el iRNA se puede inyectar en un sitio de tejido o administrar sistémicamente. La administración *in vivo* también se puede realizar mediante un sistema de administración de beta-glucano, tal

como los descritos en las patentes de Estados Unidos No. 5,032,401 y 5,607,677, y la publicación de Estados Unidos No. 2005/0281781, cuyos contenidos completos se incorporan aquí como referencia. La introducción *in vitro* en una célula incluye métodos conocidos en el arte tales como electroporación y lipofección. Otros enfoques se describen a continuación en este documento y/o se conocen en el arte.

II. Métodos de la invención

La presente invención proporciona métodos terapéuticos y profilácticos que incluyen, administrar a un sujeto que tiene una enfermedad asociada a Serpinc1, *e.g.* un trastorno hemorrágico, *e.g.* una hemofilia (*e.g.* hemofilia A, hemofilia B o hemofilia C), un agente iRNA o una composición farmacéutica que comprende un agente iRNA de la invención. En algunos aspectos de la invención, los métodos incluyen además administrar al sujeto un agente terapéutico adicional.

En ciertas implementaciones de la invención, por ejemplo, cuando un agente iRNA bicatenario incluye uno o más motivos de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos, incluyendo uno de tales motivos en o cerca del sitio de escisión del agente, seis enlaces fosforotioato, y un ligando GalNAc, dicho agente se administra en una dosis de aproximadamente 0,200 a aproximadamente 1,825 mg/kg, de 0,200 a aproximadamente 1,800 mg/kg, de aproximadamente 0,200 a aproximadamente 1,700 mg/kg, de aproximadamente

0,200 a aproximadamente 1,600 mg/kg, de aproximadamente 0,200 a aproximadamente 1,500 mg/kg, de aproximadamente 0,200 a aproximadamente 1,400 mg/kg, de aproximadamente 0,200 a aproximadamente 1,400 mg/kg, de aproximadamente 0,200 a aproximadamente 1,200 mg/kg, de aproximadamente 0,200 a aproximadamente 1,100 mg/kg, de aproximadamente 0,200 a aproximadamente 1,000 mg/kg, de aproximadamente 0,200 a aproximadamente 0,900 mg/kg, de aproximadamente 0,200 a aproximadamente 0,800 mg/kg, de aproximadamente 0,200 a aproximadamente 0,700 mg/kg, de aproximadamente 0,200 a aproximadamente 0,600 mg/kg, de aproximadamente 0,200 a aproximadamente 0,500 mg/kg, de aproximadamente 0,200 a aproximadamente 0,400 mg/kg, de aproximadamente 0,225 a aproximadamente 1,825 mg/kg, de aproximadamente 0,225 a aproximadamente 1,800 mg/kg, de aproximadamente 0,225 a aproximadamente 1,700 mg/kg, de aproximadamente 0,225 a aproximadamente 1,600 mg/kg, de aproximadamente 0,225 a aproximadamente 1,500 mg/kg, de aproximadamente 0,225 a aproximadamente 1,400 mg/kg, de aproximadamente 0,225 a aproximadamente 1,400 mg/kg, de aproximadamente 0,225 a aproximadamente 1,200 mg/kg, de aproximadamente 0,225 a aproximadamente 1,100 mg/kg, de aproximadamente 0,225 a aproximadamente 1,000 mg/kg, de aproximadamente 0,225 a aproximadamente 0,900 mg/kg, de aproximadamente 0,225 a aproximadamente 0,800 mg/kg, de aproximadamente 0,225 a aproximadamente 0,700 mg/kg, de aproximadamente 0,225 a aproximadamente 0,600 mg/kg, de aproximadamente 0,225 a aproximadamente 0,500 mg/kg, de aproximadamente 0,225 a aproximadamente 0,400 mg/kg, de

aproximadamente 0,250 a aproximadamente 1,825 mg/kg, de aproximadamente 0,250 a aproximadamente 1,800 mg/kg, de aproximadamente 0,250 a aproximadamente 1,700 mg/kg, de aproximadamente 0,250 a aproximadamente 1,600 mg/kg, de aproximadamente 0,250 a aproximadamente 1,500 mg/kg, de aproximadamente 0,250 a aproximadamente 1,400 mg/kg, de aproximadamente 0,250 a aproximadamente 1,400 mg/kg, de aproximadamente 0,250 a aproximadamente 1,200 mg/kg, de aproximadamente 0,250 a aproximadamente 1,100 mg/kg, de aproximadamente 0,250 a aproximadamente 1,000 mg/kg, de aproximadamente 0,250 a aproximadamente 0,900 mg/kg, de aproximadamente 0,250 a aproximadamente 0,800 mg/kg, de aproximadamente 0,250 a aproximadamente 0,700 mg/kg, de aproximadamente 0,250 a aproximadamente 0,600 mg/kg, de aproximadamente 0,250 a aproximadamente 0,500 mg/kg, de aproximadamente 0,250 a aproximadamente 0,400 mg/kg, de aproximadamente 0,425 a aproximadamente 1,825 mg/kg, de aproximadamente 0,425 a aproximadamente 1,800 mg/kg, de aproximadamente 0,425 a aproximadamente 1,700 mg/kg, de aproximadamente 0,425 a aproximadamente 1,600 mg/kg, de aproximadamente 0,425 a aproximadamente 1,500 mg/kg, de aproximadamente 0,425 a aproximadamente 1,400 mg/kg, de aproximadamente 0,425 a aproximadamente 1,400 mg/kg, de aproximadamente 0,425 a aproximadamente 1,200 mg/kg, de aproximadamente 0,425 a aproximadamente 1,100 mg/kg, de aproximadamente 0,425 a aproximadamente 1,000 mg/kg, de aproximadamente 0,425 a aproximadamente 0,900 mg/kg, de aproximadamente 0,425 a aproximadamente 0,800 mg/kg, de aproximadamente 0,425 a aproximadamente

0,700 mg/kg, de aproximadamente 0,425 a aproximadamente 0,600 mg/kg, de aproximadamente 0,425 a aproximadamente 0,500 mg/kg, de aproximadamente 0,450 a aproximadamente 1,825 mg/kg, de aproximadamente 0,450 a aproximadamente 1,800 mg/kg, de aproximadamente 0,450 a aproximadamente 1,700 mg/kg, de aproximadamente 0,450 a aproximadamente 1,600 mg/kg, de aproximadamente 0,450 a aproximadamente 1,500 mg/kg, de aproximadamente 0,450 a aproximadamente 1,400 mg/kg, de aproximadamente 0,450 a aproximadamente 1,400 mg/kg, de aproximadamente 0,450 a aproximadamente 1,200 mg/kg, de aproximadamente 0,450 a aproximadamente 1,100 mg/kg, de aproximadamente 0,450 a aproximadamente 1,000 mg/kg, de aproximadamente 0,450 a aproximadamente 0,900 mg/kg, de aproximadamente 0,450 a aproximadamente 0,800 mg/kg, de aproximadamente 0,450 a aproximadamente 0,700 mg/kg, de aproximadamente 0,450 a aproximadamente 0,600 mg/kg, de aproximadamente 0,450 a aproximadamente 0,500 mg/kg, de aproximadamente 0,475 a aproximadamente 1,825 mg/kg, de aproximadamente 0,475 a aproximadamente 1,800 mg/kg, de aproximadamente 0,475 a aproximadamente 1,700 mg/kg, de aproximadamente 0,475 a aproximadamente 1,600 mg/kg, de aproximadamente 0,475 a aproximadamente 1,500 mg/kg, de aproximadamente 0,475 a aproximadamente 1,400 mg/kg, de aproximadamente 0,475 a aproximadamente 1,400 mg/kg, de aproximadamente 0,475 a aproximadamente 1,200 mg/kg, de aproximadamente 0,475 a aproximadamente 1,100 mg/kg, de aproximadamente 0,475 a aproximadamente 1,000 mg/kg, de aproximadamente 0,475 a aproximadamente 0,900 mg/kg, de aproximadamente 0,475 a

aproximadamente 0,800 mg/kg, de aproximadamente 0,475 a aproximadamente 0,700 mg/kg, de aproximadamente 0,475 a aproximadamente 0,600 mg/kg, de aproximadamente 0,475 a aproximadamente 0,500 mg/kg, de aproximadamente 0,875 a aproximadamente 1,825 mg/kg, de aproximadamente 0,875 a aproximadamente 1,800 mg/kg, de aproximadamente 0,875 a aproximadamente 1,700 mg/kg, de aproximadamente 0,875 a aproximadamente 1,600 mg/kg, de aproximadamente 0,875 a aproximadamente 1,500 mg/kg, de aproximadamente 0,875 a aproximadamente 1,400 mg/kg, de aproximadamente 0,875 a aproximadamente 1,400 mg/kg, de aproximadamente 0,875 a aproximadamente 1,200 mg/kg, de aproximadamente 0,875 a aproximadamente 1,100 mg/kg, de aproximadamente 0,875 a aproximadamente 1,000 mg/kg, de aproximadamente 0,875 a aproximadamente 0,900 mg/kg, de aproximadamente 0,900 a aproximadamente 1,825 mg/kg, de aproximadamente 0,900 a aproximadamente 1,800 mg/kg, de aproximadamente 0,900 a aproximadamente 1,700 mg/kg, de aproximadamente 0,900 a aproximadamente 1,600 mg/kg, de aproximadamente 0,900 a aproximadamente 1,500 mg/kg, de aproximadamente 0,900 a aproximadamente 1,400 mg/kg, de aproximadamente 0,900 a aproximadamente 1,400 mg/kg, de aproximadamente 0,900 a aproximadamente 1,200 mg/kg, de aproximadamente 0,900 a aproximadamente 1,100 mg/kg, de aproximadamente 0,900 a aproximadamente 1,000 mg/kg, de aproximadamente 0,925 a aproximadamente 1,825 mg/kg, de aproximadamente 0,925 a aproximadamente 1,800 mg/kg, de aproximadamente 0,925 a aproximadamente 1,700 mg/kg, de aproximadamente 0,925 a aproximadamente 1,600 mg/kg, de aproximadamente

0,925 a aproximadamente 1,500 mg/kg, de aproximadamente 0,925 a aproximadamente 1,400 mg/kg, de aproximadamente 0,925 a aproximadamente 1,400 mg/kg, de aproximadamente 0,925 a aproximadamente 1,200 mg/kg, de aproximadamente 0,925 a aproximadamente 1,100 mg/kg, o aproximadamente 0,925 a aproximadamente 1,000 mg/kg . Los valores e intervalos intermedios a los valores citados anteriormente también pretenden ser Parte de esta invención, *e.g.* el agente iRNA se puede administrar al sujeto en una dosis de aproximadamente 0,015 mg/kg a aproximadamente 0,45 mg/mg.

Por ejemplo, el agente iRNA, *e.g.* el agente iRNA en una composición farmacéutica, se puede administrar en una dosis de aproximadamente 0,2 mg/kg, 0,225 mg/kg, 0,25 mg/kg, 0,275 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,325 mg/kg, 0,35 mg/kg, 0,375 mg/kg, 0,4 mg/kg, 0,425 mg/kg, 0,45 mg/kg, 0,475 mg/kg, de aproximadamente 0,5 mg/kg, 0,525 mg/kg, 0,55 mg/kg, 0,575 mg/kg, de aproximadamente 0,6 mg/kg, 0,625 mg/kg, 0,65 mg/kg, 0,675 mg/kg, de aproximadamente 0,7 mg/kg, 0,725 mg/kg, 0,75 mg/kg, 0,775 mg/kg, de aproximadamente 0,8 mg/kg, 0,925 mg/kg, 0.95 mg/kg, 0.975 mg/kg, de aproximadamente 1,0 mg/kg, 1,025 mg/kg, 1,05 mg/kg, 1,075 mg/kg, de aproximadamente 1,1 mg/kg, 1,125 mg/kg, 1,15 mg/kg, 1,175 mg/kg, de aproximadamente 1,2 mg/kg, 1,225 mg/kg, 1,25 mg/kg, 1,275 mg/kg, de aproximadamente 1,3 mg/kg, 1,325 mg/kg, 1,35 mg/kg, 1,375 mg/kg, de aproximadamente 1,4 mg/kg, 1,425 mg/kg, 1,45 mg/kg, 1,475 mg/kg, de aproximadamente 1,5 mg/kg, 1,525 mg/kg, 1,55 mg/kg, 1,575 mg/kg, de aproximadamente 1,6 mg/kg, 1,625 mg/kg, 1,65 mg/kg, 1,675 mg/kg, de

aproximadamente 1,7 mg/kg, 1,725 mg/kg, 1,75 mg/kg, 1,775 mg/kg, o aproximadamente 1,8 mg/kg. Los valores intermedios a los valores citados anteriormente también pretenden ser Parte de esta invención.

Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona métodos para prevenir al menos un síntoma en un sujeto, que tiene un trastorno, que se beneficiaría de la reducción en la expresión de Serpinc1, *e.g.* un trastorno hemorrágico, *e.g.* una hemofilia. Los métodos incluyen administrar al sujeto una dosis profilácticamente efectiva, *e.g.* una dosis de aproximadamente 0,200 mg/kg a aproximadamente 1,825 mg/k del agente iRNA, *e.g.* dsRNA, de la invención (*e.g.* una composición farmacéutica que comprende un dsRNA de la invención), evitando así al menos un síntoma en el sujeto, que tiene un trastorno, que se beneficiaría de la reducción en la expresión de Serpinc1.

En otro aspecto, la presente invención proporciona métodos para tratar un sujeto, que tiene un trastorno, que se beneficiaría de la reducción de la expresión de Serpinc1, *e.g.* un trastorno hemorrágico, *e.g.* una hemofilia, que incluye administrar al sujeto, *e.g.* un ser humano, una dosis terapéuticamente efectiva, *e.g.* una dosis de aproximadamente 0,200 mg/kg a aproximadamente 1,800 mg/kg, de un agente iRNA que se dirige a un gen Serpinc1 o una composición farmacéutica que comprende un agente iRNA que se dirige a un gen Serpinc1, tratando así al sujeto, con un trastorno, que se beneficiaría de la reducción en la expresión de Serpinc1.

En otro aspecto, la invención proporciona usos de una dosis profilácticamente efectiva, *e.g.* una dosis de aproximadamente 0,200 mg/kg a aproximadamente 1,825 mg/kg, de un iRNA, *e.g.* un dsRNA, de la invención para prevenir al menos un síntoma en un sujeto, que padece un trastorno, que se beneficiaría de una reducción y/o inhibición de la expresión de Serpinc1, tal como un trastorno hemorrágico, *e.g.* una hemofilia.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona usos de una dosis profilácticamente efectiva, *e.g.* una dosis de aproximadamente 0,200 mg/kg a aproximadamente 1,825 mg/kg de un agente iRNA de la invención en la fabricación de un medicamento para prevenir al menos un síntoma en un sujeto, que padece un trastorno, que se beneficiaría de una reducción y/o inhibición de la expresión de Serpinc1, tal como un trastorno hemorrágico, *e.g.* una hemofilia.

En otro aspecto, la presente invención proporciona usos de una dosis terapéuticamente efectiva, *e.g.* una dosis de aproximadamente 0,200 mg/kg a aproximadamente 1,825 mg/kg, de un agente iRNA de la invención para tratar un sujeto, *e.g.* un sujeto que se beneficiaría de una reducción y/o inhibición de la expresión de Serpinc1.

En otro aspecto más, la presente invención proporciona el uso de un agente iRNA, *e.g.* un dsRNA, de la invención dirigido a un gen Serpinc1 o una composición farmacéutica que comprende una dosis terapéuticamente efectiva,

e.g. una dosis de aproximadamente 0,200 mg/kg a aproximadamente 1,825 mg/kg, de un agente iRNA dirigido a un gen Serpinc1 en la fabricación de un medicamento para tratar un sujeto, *e.g.* un sujeto que se beneficiaría de una reducción y/o inhibición de la expresión de Serpinc1, tal como un sujeto, que tiene un trastorno, hemorrágico; *e.g.* una hemofilia.

En algunas implementaciones de la invención, por ejemplo, cuando un agente iRNA bicatenario comprende una cadena sentido y una cadena antisentido, la cadena antisentido comprende una región de complementariedad que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de 5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3' (SEQ ID NO: 15), en donde sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena sentido y sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena antisentido son nucleótidos modificados, y en donde la cadena sentido está conjugada a una ligando unido en el extremo 3', dicho agente se administra en una dosis de aproximadamente 0,200 a aproximadamente 1,825 mg/kg, *e.g.* en una dosis de aproximadamente 0,200 mg/kg a aproximadamente 0,250 mg/kg; o en una dosis de aproximadamente 0,425 mg/kg a aproximadamente 0,475 mg/kg; o en una dosis de aproximadamente 0,875 mg/kg a aproximadamente 0,925 mg/kg; o en una dosis de aproximadamente 1,775 mg/kg a aproximadamente 1,825 mg/kg.

Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona métodos para prevenir al menos un síntoma en un sujeto, que tiene un trastorno, que se beneficiaría de la reducción en la expresión de Serpinc1, *e.g.* un trastorno hemorrágico, *e.g.* una hemofilia. Los métodos incluyen administrar al sujeto una dosis profilácticamente efectiva, *e.g.* una dosis de aproximadamente 0,200 mg/kg a aproximadamente 1,825 mg/kg de un agente de ácido ribonucleico de doble cadena (iRNA), que comprende una cadena sentido y una cadena antisentido, la cadena antisentido comprende una región de complementariedad que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de 5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3' (SEC ID NO.: 15), en donde sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena sentido y sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena antisentido son nucleótidos modificados, y en donde la cadena sentido está conjugada a un ligando unido en el extremo 3' (*e.g.* una composición farmacéutica que comprende el agente iRNA), evitando así al menos un síntoma en el sujeto, que tiene un trastorno, que se beneficiaría de la reducción en la expresión de Serpinc1.

En otro aspecto, la presente invención proporciona métodos para tratar un sujeto, que tiene un trastorno, que se beneficiaría de la reducción de la expresión de Serpinc1, *e.g.* un trastorno hemorrágico, *e.g.* una hemofilia, que incluye administrar al sujeto, *e.g.* un ser humano, una dosis terapéuticamente efectiva, *e.g.* una dosis de aproximadamente 0,200 mg/kg a aproximadamente 1,825 mg/kg, de un agente de ácido ribonucleico bicatenario (iRNA), que comprende una

cadena sentido y una cadena antisentido, la cadena antisentido comprende una región de complementariedad que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de 5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3' (SEQ ID NO: 15), en donde sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena sentido y sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena antisentido son nucleótidos modificados, y en el que la cadena sentido está conjugada con un ligando unido en el extremo 3' o una composición farmacéutica que comprende el agente iRNA que se dirige a un gen Serpinc1, tratando así al sujeto, que tiene un trastorno, que se beneficiaría de la reducción en la expresión de Serpinc1.

En otro aspecto, la invención proporciona usos de una dosis profilácticamente efectiva, *e.g.* una dosis de aproximadamente 0,200 mg/kg a aproximadamente 1,825 mg/kg de un agente de ácido ribonucleico de doble cadena (iRNA), que comprende una cadena sentido y una cadena antisentido, la cadena antisentido comprende una región de complementariedad que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de 5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3' (SEC ID NO.: 15), en donde sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena sentido y sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena antisentido son nucleótidos modificados, y en donde la cadena sentido está conjugada a un ligando unido en el extremo 3' para prevenir al menos un síntoma en un sujeto, que padece un

trastorno, que se beneficiaría de una reducción y/o inhibición de la expresión de Serpinc1, tal como un trastorno hemorrágico, *e.g.* una hemofilia.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona usos de una dosis profilácticamente efectiva, *e.g.* una dosis de aproximadamente 0,200 mg/kg a aproximadamente 1,825 mg/kg de un agente de ácido ribonucleico de doble cadena (iRNA), que comprende una cadena sentido y una cadena antisentido, la cadena antisentido comprende una región de complementariedad que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de 5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3' (SEC ID NO.: 15), en donde sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena sentido y sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena antisentido son nucleótidos modificados, y en donde la cadena sentido está conjugada a un ligando unido en el extremo 3' en la fabricación de un medicamento para prevenir al menos un síntoma en un sujeto, que padece un trastorno, que se beneficiaría de una reducción y/o inhibición de la expresión de Serpinc1, tal como un trastorno hemorrágico, *e.g.* una hemofilia.

En otro aspecto, la presente invención proporciona usos de una dosis terapéuticamente efectiva, *e.g.* una dosis de aproximadamente 0,200 mg/kg a aproximadamente 1,825 mg/kg, de un agente de ácido ribonucleico de cadena doble (iRNA), que comprende una cadena sentido y una cadena antisentido, la cadena antisentido comprende una región de complementariedad que comprende

al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de 5’-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3' (SEC ID NO.: 15), en donde sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena sentido y sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena antisentido son nucleótidos modificados, y en donde la cadena sentido está conjugada a un ligando unido en el extremo 3’ para tratar un sujeto, *e.g.* un sujeto que se beneficiaría de una reducción y/o inhibición de la expresión de Serpinc1.

En otro aspecto más, la presente invención proporciona el uso de un agente iRNA, *e.g.* un dsRNA, de la invención dirigido a un gen Serpinc1 o una composición farmacéutica que comprende una dosis terapéuticamente efectiva, *e.g.* una dosis de aproximadamente 0,200 mg/kg a aproximadamente 1,825 mg/kg, de un agente de ácido ribonucleico bicatenario (iRNA), que comprende una cadena sentido y una cadena antisentido, la cadena antisentido comprende una región de complementariedad que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de 5’-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3' (SEQ ID NO: 15), en donde sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena sentido y sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena antisentido son nucleótidos modificados, y en donde la cadena sentido está conjugada a un ligando unido en el extremo 3’ en la fabricación de un medicamento para tratar un sujeto, *e.g.* un sujeto que se beneficiaría de una reducción y/o inhibición de la expresión de Serpinc1, tal como un sujeto, que tiene un trastorno, hemorrágico, *e.g.* una hemofilia.

En algunas implementaciones, un agente iRNA de la invención se administra a un sujeto en una dosis fija. Una "dosis fija" (*e.g.* una dosis en mg) significa que se usen una dosis de un agente iRNA para todos los sujetos independientemente de cualquier factor específico relacionado con el sujeto, como el peso. En una implementación particular, una dosis fija de un agente iRNA de la invención se basa en un peso o edad predeterminados.

En algunas implementaciones, el agente iRNA se administra en una dosis fija de entre aproximadamente 25 mg a aproximadamente 100 mg, *e.g.* entre aproximadamente 25 mg a aproximadamente 95 mg, entre aproximadamente 25 mg a aproximadamente 90 mg, entre aproximadamente 25 mg a aproximadamente 85. mg, entre aproximadamente 25 mg a aproximadamente 80 mg, entre aproximadamente 25 mg a aproximadamente 75 mg, entre aproximadamente 25 mg a aproximadamente 70 mg, entre aproximadamente 25 mg a aproximadamente 65 mg, entre aproximadamente 25 mg a aproximadamente 60 mg, entre aproximadamente 25 mg a aproximadamente 50 mg, entre aproximadamente 50 mg a aproximadamente 100 mg, entre aproximadamente 50 mg a aproximadamente 95 mg, entre aproximadamente 50 mg a aproximadamente 90 mg, entre aproximadamente 50 mg a aproximadamente 85 mg, entre aproximadamente 50 mg a aproximadamente 80 mg, entre aproximadamente 30 mg a aproximadamente 100 mg, entre aproximadamente 30 mg a aproximadamente 90 mg, entre aproximadamente 30 mg a aproximadamente 80 mg, entre aproximadamente 40 mg a

aproximadamente 100 mg, entre aproximadamente 40 mg a aproximadamente 90 mg, entre aproximadamente 40 mg a aproximadamente 80 mg, entre aproximadamente 60 mg a aproximadamente 100 mg, entre aproximadamente 60 mg a aproximadamente 90 mg, entre aproximadamente 25 mg a aproximadamente 55 mg, entre aproximadamente 25 mg a aproximadamente 65 mg, entre aproximadamente 30 mg a aproximadamente 95 mg, entre aproximadamente 30 mg a aproximadamente 85 mg, entre aproximadamente 30 mg a aproximadamente 75 mg, entre aproximadamente 30 mg a aproximadamente 65 mg, entre aproximadamente 30 mg a aproximadamente 55 mg, entre aproximadamente 40 mg a aproximadamente 95 mg, entre aproximadamente 40 mg a aproximadamente 85 mg, entre aproximadamente 40 mg a aproximadamente 75 mg, entre aproximadamente 40 mg a aproximadamente 65 mg, entre aproximadamente 40 mg a aproximadamente 55 mg, o entre aproximadamente 45 mg a aproximadamente 95 mg.

En algunas implementaciones, el agente iRNA se administra en una dosis fija aproximadamente 25 mg, aproximadamente 30 mg, aproximadamente 35 mg, aproximadamente 40 mg, aproximadamente 45 mg, aproximadamente 50 mg, aproximadamente 55 mg, aproximadamente 60 mg, aproximadamente 65 mg, aproximadamente 70 mg, aproximadamente 75 mg, aproximadamente 80 mg, aproximadamente 85 mg, aproximadamente 90 mg, aproximadamente 95 mg, o aproximadamente 100 mg.

Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona métodos para prevenir al menos un síntoma en un sujeto, que tiene un trastorno, que se beneficiaría de la reducción en la expresión de Serpinc1, *e.g.* un trastorno hemorrágico, *e.g.* una hemofilia. Los métodos incluyen administrar al sujeto una dosis profilácticamente efectiva, *e.g.* una dosis fija aproximadamente 25 mg a aproximadamente 100 mg, del agente iRNA, *e.g.* dsRNA, de la invención (*e.g.* una composición farmacéutica que comprende un dsRNA de la invención), evitando así al menos un síntoma en el sujeto, que tiene un trastorno, que se beneficiaría de la reducción en la expresión de Serpinc1. En una implementación, los métodos incluyen administrar al sujeto una dosis profilácticamente efectiva, *e.g.* una dosis fija aproximadamente 50 mg del agente iRNA, *e.g.* dsRNA, de la invención (*e.g.* una composición farmacéutica que comprende un dsRNA de la invención), evitando así al menos un síntoma en el sujeto, que tiene un trastorno, que se beneficiaría de la reducción en la expresión de Serpinc1. En otra implementación, los métodos incluyen administrar al sujeto una dosis profilácticamente efectiva, *e.g.* una dosis fija aproximadamente 80 mg, del agente iRNA, *e.g.* dsRNA, de la invención (*e.g.* una composición farmacéutica que comprende un dsRNA de la invención), evitando así al menos un síntoma en el sujeto, que tiene un trastorno, que se beneficiaría de la reducción en la expresión de Serpinc1.

En otro aspecto, la presente invención proporciona métodos para tratar un sujeto, que tiene un trastorno, que se beneficiaría de la reducción de la expresión de Serpinc1, *e.g.* un trastorno hemorrágico, *e.g.* una hemofilia, que incluye

administrar al sujeto, *e.g.* un ser humano, una dosis terapéuticamente efectiva, *e.g.* una dosis fija aproximadamente 25 mg a aproximadamente 100 mg, de un agente iRNA dirigido a un gen Serpinc1 o una composición farmacéutica que comprende un agente iRNA dirigido a un gen Serpinc1, tratando así al sujeto con un trastorno que se beneficiaría de la reducción en la expresión Serpinc1. En una implementación, los métodos incluyen administrar al sujeto una dosis terapéuticamente efectiva, *e.g.* una dosis fija aproximadamente 50 mg, del agente iRNA, *e.g.* dsRNA, de la invención (*e.g.* una composición farmacéutica que comprende un dsRNA del invención), tratando así al sujeto, que tiene un trastorno, que se beneficiaría de la reducción de la expresión de Serpinc1. En otra implementación, los métodos incluyen administrar al sujeto una dosis terapéuticamente efectiva, *e.g.* una dosis fija aproximadamente 80 mg, del agente iRNA, *e.g.* dsRNA, de la invención (*e.g.* una composición farmacéutica que comprende un dsRNA del invención), tratando así al sujeto, que tiene un trastorno, que se beneficiaría de la reducción de la expresión de Serpinc1.

En otro aspecto, la invención proporciona usos de una dosis profilácticamente efectiva, *e.g.* una dosis fija aproximadamente 25 mg a aproximadamente 100 mg, de un iRNA, *e.g.* un dsRNA, de la invención para prevenir al menos un síntoma en un sujeto que padece de un trastorno que se beneficiaría de una reducción y/o inhibición de la expresión de Serpinc1, tal como un trastorno hemorrágico, *e.g.* una hemofilia. En una implementación, la invención proporciona usos de una dosis profilácticamente efectiva, *e.g.* una dosis fija

aproximadamente 50 mg de un iRNA, *e.g.* un dsRNA, de la invención para prevenir al menos un síntoma en un sujeto, que padece un trastorno, que se beneficiaría de una reducción y/o inhibición de la expresión de Serpinc1, tal como un trastorno hemorrágico, *e.g.* una hemofilia. En otra implementación, la invención proporciona usos de una dosis profilácticamente efectiva, *e.g.* una dosis fija aproximadamente 80 mg, de un iRNA, *e.g.* un dsRNA, de la invención para prevenir al menos un síntoma en un sujeto, que padece un trastorno, que se beneficiaría de una reducción y/o inhibición de la expresión de Serpinc1, tal como un trastorno hemorrágico, *e.g.* una hemofilia.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona usos de una dosis profilácticamente efectiva, *e.g.* una dosis fija aproximadamente 25 mg a aproximadamente 100 mg de un agente iRNA de la invención en la fabricación de un medicamento para prevenir al menos un síntoma en un sujeto, que padece un trastorno, que se beneficiaría de una reducción y/o inhibición de la expresión de Serpinc1, tal como un trastorno hemorrágico, *e.g.* una hemofilia. En una implementación, la presente invención proporciona usos de una dosis profilácticamente efectiva, *e.g.* una dosis fija aproximadamente 50 mg de un agente iRNA de la invención en la fabricación de un medicamento para prevenir al menos un síntoma en un sujeto, que padece un trastorno, que se beneficiaría de una reducción y/o inhibición de la expresión de Serpinc1, tal como un trastorno hemorrágico, *e.g.* una hemofilia. En otra implementación, la presente invención proporciona usos de una dosis profilácticamente efectiva, *e.g.* una dosis fija

aproximadamente 80 mg de un agente iRNA de la invención en la fabricación de un medicamento para prevenir al menos un síntoma en un sujeto, que padece un trastorno, que se beneficiaría de una reducción y/o inhibición de la expresión de Serpinc1, tal como un trastorno hemorrágico, *e.g.* una hemofilia.

En otro aspecto, la presente invención proporciona usos de una dosis terapéuticamente efectiva, *e.g.* una dosis fija aproximadamente 25 mg a aproximadamente 100 mg, de un agente iRNA de la invención para tratar un sujeto, *e.g.* un sujeto que se beneficiaría de una reducción y/o inhibición de la expresión de Serpinc1. En una implementación, la presente invención proporciona usos de una dosis terapéuticamente efectiva, *e.g.* una dosis fija aproximadamente 50 mg, de un agente iRNA de la invención para tratar un sujeto, *e.g.* un sujeto que se beneficiaría de una reducción y/o inhibición de la expresión de Serpinc1. En otra implementación, la presente invención proporciona usos de una dosis terapéuticamente efectiva, *e.g.* una dosis fija aproximadamente 80 mg, de un agente iRNA de la invención para tratar un sujeto, *e.g.* un sujeto que se beneficiaría de una reducción y/o inhibición de la expresión de Serpinc1.

En otro aspecto más, la presente invención proporciona el uso de un agente iRNA, *e.g.* un dsRNA, de la invención dirigido a un gen Serpinc1 o una composición farmacéutica que comprende una dosis terapéuticamente efectiva, *e.g.* una dosis fija aproximadamente 25 mg a aproximadamente 100 mg, de un agente iRNA dirigido a un gen Serpinc1 en la fabricación de un medicamento para

tratar un sujeto, *e.g.* un sujeto que se beneficiaría de una reducción y/o inhibición de la expresión de Serpinc1, tal como un sujeto, que tiene un trastorno, hemorrágico, *e.g.* un hemofilia. En una implementación, la presente invención proporciona el uso de un agente iRNA, *e.g.* un dsRNA, de la invención dirigido a un gen Serpinc1 o una composición farmacéutica que comprende una dosis terapéuticamente efectiva, *e.g.* una dosis fija aproximadamente 50 mg de un agente iRNA dirigido a un gen Serpinc1 en la fabricación de un medicamento para tratar un sujeto, *e.g.* un sujeto que se beneficiaría de una reducción y/o inhibición de la expresión de Serpinc1, tal como un sujeto, que tiene un trastorno, hemorrágico, *e.g.* una hemofilia. En otra implementación, la presente invención proporciona el uso de un agente iRNA, *e.g.* un dsRNA, de la invención dirigido a un gen Serpinc1 o una composición farmacéutica que comprende una dosis terapéuticamente efectiva, *e.g.* una dosis fija aproximadamente 80 mg de un agente iRNA dirigido a un gen Serpinc1 en la fabricación de un medicamento para tratar un sujeto, *e.g.* un sujeto que se beneficiaría de una reducción y/o inhibición de la expresión de Serpinc1, tal como un sujeto, que tiene un trastorno, hemorrágico, *e.g.* una hemofilia.

En algunas implementaciones de la invención, por ejemplo, cuando un agente iRNA bicatenario comprende una cadena sentido y una cadena antisentido, la cadena antisentido comprende una región de complementariedad que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de 5’-

UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3' (SEQ ID NO: 15), en donde sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena sentido y sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena antisentido son nucleótidos modificados, y en donde la cadena sentido está conjugada a una ligando unido en el extremo 3', dicho agente se administra en una dosis fija aproximadamente 25 mg a aproximadamente 100 mg, *e.g.* en una dosis fija aproximadamente 25 mg; o en una dosis fija aproximadamente 50 mg; o en una dosis fija aproximadamente 80 mg; o en una dosis fija aproximadamente 100 mg. En una implementación, la dosis fija es 50 mg. En otra implementación, la dosis fija es 80 mg.

Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona métodos para prevenir al menos un síntoma en un sujeto, que tiene un trastorno, que se beneficiaría de la reducción en la expresión de Serpinc1, *e.g.* un trastorno hemorrágico, *e.g.* una hemofilia. Los métodos incluyen administrar al sujeto una dosis profilácticamente efectiva, *e.g.* una dosis fija aproximadamente 25 mg a aproximadamente 100 mg de un agente de ácido ribonucleico de doble cadena (iRNA), que comprende una cadena sentido y una cadena antisentido, la cadena antisentido comprende una región de complementariedad que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de 5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3' (SEQ ID NO: 15), donde sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena sentido y sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena antisentido son nucleótidos modificados, y en el que la cadena sentido está conjugada con un ligando unido

en el extremo 3’ (*e.g.* una composición farmacéutica que comprende el agente iRNA), evitando así al menos un síntoma en el sujeto, que tiene un trastorno, que se beneficiaría de la reducción en la expresión de Serpinc1. En una implementación, la dosis fija es 50 mg. En otra implementación, la dosis fija es 80 mg.

En otro aspecto, la presente invención proporciona métodos para tratar un sujeto, que tiene un trastorno, que se beneficiaría de la reducción de la expresión de Serpinc1, *e.g.* un trastorno hemorrágico, *e.g.* una hemofilia, que incluye administrar al sujeto, *e.g.* un ser humano, una dosis terapéuticamente efectiva, *e.g.* una dosis fija aproximadamente 25 mg a aproximadamente 100 mg, de un agente de ácido ribonucleico bicatenario (iRNA), que comprende una cadena sentido y una cadena antisentido, la cadena antisentido comprende una región de complementariedad que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de 5’-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3' (SEQ ID NO: 15), en donde sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena sentido y sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena antisentido son nucleótidos modificados, y en el que la cadena sentido está conjugada con un ligando unido en el extremo 3’ o una composición farmacéutica que comprende el agente iRNA dirigido a un gen Serpinc1, que trata al sujeto, que tiene un trastorno, que se beneficiaría de la reducción en la expresión de Serpinc1. En una implementación, la dosis fija es 50 mg. En otra implementación, la dosis fija es 80 mg.

En otro aspecto, la invención proporciona usos de una dosis profilácticamente efectiva, *e.g.* una dosis fija aproximadamente 25 mg a aproximadamente 100 mg, de un agente de ácido ribonucleico de doble cadena (iRNA), que comprende una cadena sentido y una cadena antisentido, la cadena antisentido que comprende una región de complementariedad que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de 5’-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3' (SEC ID NO.: 15), en donde sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena sentido y sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena antisentido son nucleótidos modificados, y en el que la cadena sentido está conjugada con un ligando unido en el extremo 3’ para prevenir al menos un síntoma en un sujeto, que padece un trastorno, que se beneficiaría de una reducción y/o la inhibición de la expresión de Serpinc1, tal como un trastorno hemorrágico, *e.g.* una hemofilia. En una implementación, la dosis fija es 50 mg. En otra implementación, la dosis fija es 80 mg.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona usos de una dosis profilácticamente efectiva, *e.g.* una dosis fija aproximadamente 25 mg a aproximadamente 100 mg de un agente de ácido ribonucleico de doble cadena (iRNA), que comprende una cadena sentido y una cadena antisentido, la cadena antisentido comprende una región de complementariedad que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de 5’-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3' (SEC ID

NO.: 15), en donde sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena sentido y sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena antisentido son nucleótidos modificados, y en donde la cadena sentido está conjugada con un ligando unido en el extremo 3’ en la fabricación de un medicamento para prevenir al menos un síntoma en un sujeto que padece una trastorno que se beneficiaría de una reducción y/o inhibición de la expresión de Serpinc1, tal como un trastorno hemorrágico, *e.g.* una hemofilia. En una implementación, la dosis fija es 50 mg. En otra implementación, la dosis fija es 80 mg

.

En otro aspecto, la presente invención proporciona usos de una dosis terapéuticamente efectiva, *e.g.* una dosis fija aproximadamente 25 mg a aproximadamente 100 mg, de un agente de ácido ribonucleico de doble cadena (iRNA), que comprende una cadena sentido y una cadena antisentido, la cadena antisentido comprende una región de complementariedad que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de 5’-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3' (SEC ID NO.: 15), en donde sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena sentido y sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena antisentido son nucleótidos modificados, y en donde la cadena sentido está conjugada con un ligando unido en el extremo 3’ para tratar un sujeto, *e.g.* un sujeto que se beneficiaría de una reducción y/o inhibición de la expresión de Serpinc1. En una implementación, la dosis fija es 50 mg. En otra implementación, la dosis fija es 80 mg.

En otro aspecto más, la presente invención proporciona el uso de un agente iRNA, *e.g.* un dsRNA, de la invención dirigido a un gen Serpinc1 o una composición farmacéutica que comprende una dosis terapéuticamente efectiva, *e.g.* una dosis fija aproximadamente 25 mg a aproximadamente 100 mg, de un agente de ácido ribonucleico de doble cadena (iRNA), que comprende una cadena sentido y una cadena antisentido, la cadena antisentido comprende una región de complementariedad que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de 5' - UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3' (SEQ ID NO: 15), en donde sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena sentido y sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena antisentido son nucleótidos modificados, y en donde la cadena sentido está conjugada con un ligando unido al extremo 3' en la fabricación de un medicamento para tratar un sujeto, *e.g.* un sujeto que se beneficiaría de una reducción y/o inhibición de la expresión de Serpinc1, tal como un sujeto, que tiene un trastorno, hemorrágico, *e.g.* una hemofilia. En una implementación, la dosis fija es 50 mg. En otra implementación, la dosis fija es 80 mg.

Los métodos y usos de la invención incluyen la administración de una composición descrita en este documento de manera que la expresión del gen Serpinc1 objeto disminuye, tal como para aproximadamente 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, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53,

54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, o aproximadamente 80 días. En una implementación, la expresión del gen Serpinc1 objeto se disminuye durante una duración prolongada, *e.g.* al menos aproximadamente siete días o más, *e.g.* aproximadamente una semana, dos semanas, tres semanas, aproximadamente cuatro semanas, aproximadamente 5 semanas, aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 2 meses, aproximadamente in trimestre o más.

La reducción en la expresión génica se puede evaluar mediante cualquier método conocido en el arte. Por ejemplo, una reducción en la expresión de Serpinc1 se puede establecer determinando el nivel de expresión de mRNA de Serpinc1 usando métodos de rutina para un versado en el arte, *e.g.* transferencia de Northern (Northern Blotting), qRT-PCR, determinando el nivel de proteína de Serpinc1 usando métodos rutinarios para un versado versado en el arte, tales como transferencia de Western (Western Blotting), técnicas inmunológicas, y/o determinando una actividad biológica de Serpinc1, tal como afectando una o más moléculas asociadas con el mecanismo de coagulación sanguínea celular (o en, la coagulación de la sangre en sí misma). En una implementación, el tiempo de generación de trombina, el tiempo de formación de coágulo y/o el tiempo de coagulación se determinan para evaluar la expresión de Serpinc1 usando, *e.g.* análisis de tromboelastometría ROTEM® de sangre completa.

La administración del dsRNA de acuerdo con los métodos y usos de la invención puede dar como resultado una reducción de la gravedad, signos, síntomas y/o marcadores de tales enfermedades o trastornos en un paciente con una enfermedad asociada a Serpinc1. Por "reducción" en este contexto se entiende una disminución estadísticamente significativa en dicho nivel. La reducción puede ser, por ejemplo, al menos aproximadamente 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o aproximadamente 100%

La eficacia del tratamiento o la prevención de la enfermedad se puede evaluar, por ejemplo midiendo la progresión de la enfermedad, la remisión de la enfermedad, la gravedad de los síntomas, la frecuencia de hemorragias, la reducción del dolor, la calidad de vida, la dosis requerida de un medicamento para sostener un efecto de tratamiento, el nivel de un marcador de enfermedad o cualquier otro parámetro medible apropiado para una enfermedad dada, que se trata o se destina a la prevención. Está dentro de la capacidad de un versado en el arte monitorizar la eficacia del tratamiento o la prevención midiendo cualquiera de dichos parámetros, o cualquier combinación de parámetros. Por ejemplo, la eficacia del tratamiento de un trastorno hemorrágico se puede evaluar, por ejemplo, mediante un control periódico de los niveles de la trombina: anti-trombina. Las comparaciones de las lecturas posteriores con las lecturas iniciales proporcionan al médico una indicación de si el tratamiento es efectivo. Está dentro de la capacidad de un versado en el arte monitorizar la eficacia del tratamiento o la

prevención midiendo cualquiera de dichos parámetros, o cualquier combinación de parámetros. En relación con la administración de un iRNA dirigido a Serpinc1 o una composición farmacéutica del mismo, "efectiva contra" un trastorno hemorrágico indica que la administración de una manera clínicamente apropiada da como resultado un efecto beneficioso para al menos una fracción estadísticamente significativa de pacientes, tal como una mejora de síntomas, una cura, una reducción de la enfermedad, la extensión de la vida, una mejora en la calidad de vida u otro efecto generalmente reconocido como positivo por médicos familiarizados con el tratamiento de los trastornos de la coagulación y las causas relacionadas.

Un tratamiento o efecto preventivo es evidente cuando hay una mejoría estadísticamente significativa en uno o más parámetros del estado de la enfermedad, o por una falla al empeorar o desarrollar síntomas donde de otra manera se hubieran anticipado. Como ejemplo, un cambio favorable de al menos 10% en un parámetro medible de enfermedad, y preferiblemente al menos 20%, 30%, 40%, 50% o más puede ser indicativo de un tratamiento efectivo. La eficacia para un fármaco de iRNA dado o formulación de ese fármaco también se puede evaluar usando un modelo animal experimental para la enfermedad dada como se conoce en el arte. Cuando se usa un modelo animal experimental, la eficacia del tratamiento se evidencia cuando se observa una reducción estadísticamente significativa en un marcador o síntoma.

Alternativamente, la eficacia se puede medir mediante una reducción en la gravedad de la enfermedad según lo determine un versado en el arte del diagnóstico con base en una escala de clasificación de la gravedad de la enfermedad clínicamente aceptada. Cualquier cambio positivo que resulte en, *e.g.* disminución de la gravedad de la enfermedad medida usando la escala apropiada, representa un tratamiento adecuado usando una formulación de iRNA o iRNA como se describe en este documento.

El iRNA (o las composiciones farmacéuticas que comprenden el iRNA) se pueden administrar al sujeto aproximadamente una vez a la semana, aproximadamente dos veces al mes, aproximadamente una vez cada seis semanas, aproximadamente una vez cada 2 meses, o una vez por trimestre.

Un agente iRNA bicatenario se puede administrar a un sujeto en una o más dosis. Por ejemplo, un agente iRNA bicatenario se puede administrar a un sujeto en una dosis mensual de aproximadamente 0,200 mg/kg a aproximadamente 1,825 mg/kg. Alternativamente, un agente iRNA bicatenario se puede administrar a un sujeto en una dosis fija aproximadamente 25 mg a aproximadamente 100 mg.

En una implementación, un agente iRNA bicatenario comprende una cadena sentido y una cadena antisentido, la cadena antisentido comprende una región de complementariedad que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de 5’-

UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3’ (SEQ ID NO: 15), en donde sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena sentido y sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena antisentido son nucleótidos modificados, y en donde la cadena sentido está conjugada con un ligando unido al extremo 3' que se administra al sujeto en una dosis mensual de aproximadamente 0,200 mg/kg a aproximadamente 0,250 mg/kg, *e.g.* aproximadamente 0,225 mg/kg.

En otra implementación, un agente iRNA bicatenario comprende una cadena sentido y una cadena antisentido, la cadena antisentido comprende una región de complementariedad que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de 5’-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3’ (SEQ ID NO: 15), en donde sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena sentido y sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena antisentido son nucleótidos modificados, y en donde la cadena sentido está conjugada con un ligando unido al extremo 3' que se administra al sujeto en una dosis mensual de aproximadamente 0,425 mg/kg a aproximadamente 0,475 mg/kg, *e.g.* aproximadamente 0,450 mg/kg.

En otra implementación más, un agente iRNA bicatenario comprende una cadena sentido y una cadena antisentido, la cadena antisentido comprende una región de complementariedad que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de 5’-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3’ (SEQ ID NO: 15), en el que

sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena sentido y sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena antisentido son nucleótidos modificados, y en el que la cadena sentido está conjugada con un ligando unido al extremo 3' que se administra al sujeto en una dosis mensual de aproximadamente 0,875 mg/kg a aproximadamente 0,925 mg/kg, *e.g.* aproximadamente 0,900 mg/kg.

En una implementación, un agente iRNA bicatenario comprende una cadena sentido y una cadena antisentido, la cadena antisentido comprende una región de complementariedad que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de 5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3' (SEQ ID NO: 15), en donde sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena sentido y sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena antisentido son nucleótidos modificados, y en donde la cadena sentido está conjugada con un ligando unido al extremo 3' que se administra al sujeto en una dosis mensual de aproximadamente 1,775 mg/kg a aproximadamente 1,825 mg/kg, *e.g.* aproximadamente 1,800 mg/kg.

En una implementación, un agente iRNA bicatenario comprende una cadena sentido y una cadena antisentido, la cadena antisentido comprende una región de complementariedad que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de 5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3' (SEQ ID NO: 15), en donde sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena sentido y sustancialmente

todos los nucleótidos de la cadena antisentido son nucleótidos modificados, y en donde la cadena sentido está conjugada con un ligando unido al extremo 3' que se administra al sujeto en una dosis fija aproximadamente 25 a aproximadamente 100 mg, *e.g.* aproximadamente 25 mg, 50 mg, 80 mg o 100 mg. En una implementación, la dosis fija es 50 mg. En otra implementación, la dosis fija es 80 mg.

La administración se puede repetir, por ejemplo, de forma regular, como mensualmente, durante un mes, dos meses, tres meses, cuatro meses o más. Después de un régimen de tratamiento inicial, los tratamientos se pueden administrar con menos frecuencia. Por ejemplo, después de la administración mensual durante tres meses, la administración se puede repetir una vez por trimestre, durante un año o más.

Por consiguiente, en algunas implementaciones, el agente iRNA se administra en un régimen de dosificación que incluye una "fase de carga" de administraciones estrechamente espaciadas que puede ser seguida por una "fase de mantenimiento", en la que el agente iRNA se administra a intervalos espaciados más largos.

Un programa de dosificación de carga y/o un programa de dosificación de mantenimiento opcionalmente se pueden repetir para una o más iteraciones. El número de iteraciones puede depender del logro de un efecto deseado, *e.g.* la

supresión de un gen Serpinc1 y/o el logro de un efecto terapéutico o profiláctico, *e.g.* aumentar la coagulación sanguínea, reducir el tiempo de formación del coágulo y/o reducir el tiempo de coagulación.

La administración del iRNA puede reducir los niveles de Serpinc1, *e.g.* en una célula, tejido, sangre, orina u otro comportamiento del paciente en al menos aproximadamente 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%., 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28 %, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78 %, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o al menos aproximadamente 99% o más.

El iRNA se puede administrar por infusión intravenosa durante un período de tiempo, como por 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o aproximadamente un período de 25 minutos.

Antes de la administración de una dosis completa del iRNA, a los pacientes se les puede administrar una dosis más pequeña, como una infusión al 5%, y controlar los efectos adversos, como una reacción alérgica. En otro ejemplo, el

paciente se puede controlar para detectar efectos inmunoestimuladores no deseados, tales como niveles aumentados de citoquinas (*e.g.* TNF-alfa o INF-alfa).

Debido a los efectos inhibidores sobre la expresión de Serpinc1, una composición de acuerdo con la invención o una composición farmacéutica preparada a partir de la misma puede mejorar la calidad de vida.

Un iRNA de la invención se puede administrar en forma "desnuda", o como un "iRNA libre". Se administra un iRNA desnudo en ausencia de una composición farmacéutica. El iRNA desnudo puede estar en una solución tampón adecuada. La solución tampón puede comprender acetato, citrato, prolamina, carbonato o fosfato, o cualquier combinación de los mismos. En una implementación, la solución tampón es solución salina tamponada con fosfato (PBS). El pH y la osmolaridad de la solución tampón que contiene el iRNA se pueden ajustar de manera que sea adecuada para la administración a un sujeto.

Alternativamente, un iRNA de la invención se puede administrar como una composición farmacéutica, tal como una formulación liposomal de dsRNA.

Los sujetos que se beneficiarían de una reducción y/o inhibición de la expresión del gen Serpinc1 son aquellos que tienen un trastorno hemorrágico, *e.g.* un trastorno hemorrágico hereditario o un trastorno hemorrágico adquirido como se describe en este documento. En una implementación, un sujeto, que tiene un

trastorno, hemorrágico hereditario tiene una hemofilia, *e.g.* hemofilia A, B o C. En una implementación, un sujeto, que tiene un trastorno, hemorrágico hereditario, *e.g.* una hemofilia, es un sujeto inhibidor (un sujeto que se ha vuelto refractario a los factores de coagulación de reemplazo). En una implementación, el sujeto inhibidor tiene una hemofilia A. En otra implementación, el sujeto inhibidor tiene una hemofilia B. En otra implementación más, el sujeto inhibidor tiene una hemofilia C. el tratamiento de un sujeto que se beneficiaría de una reducción y/o inhibición de la expresión génica de Serpinc1 incluye tratamiento terapéutico (*e.g.* bajo demanda, *e.g.* el sujeto está sangrado (sangrado espontáneo o hemorragia como resultado de un trauma) y no coagula) y profiláctico (*e.g.* el sujeto no está sangrando y/o va a someterse a cirugía).

La invención proporciona además métodos y usos para la utilización de un iRNA o una composición farmacéutica del mismo, *e.g.* para tratar un sujeto que se beneficiaría de la reducción y/o inhibición de la expresión de Serpinc1, *e.g.* un sujeto, que tiene un trastorno, hemorrágico, en combinación con otros productos farmacéuticos y/u otros métodos terapéuticos, *e.g.* con productos farmacéuticos conocidos y/o métodos terapéuticos conocidos, tales como, por ejemplo, los que se emplean actualmente para tratar estos trastornos.

Por ejemplo, en ciertas implementaciones, se administra un iRNA que se dirige a Serpinc1 en combinación con, *e.g.* un agente útil en el tratamiento de un trastorno hemorrágico como se describe en otra Parte de este documento. Por

ejemplo, los procedimientos terapéuticos y terapéuticos adicionales adecuados para tratar un sujeto que se beneficiaría de la reducción en la expresión de Serpinc1, *e.g.* un sujeto, que tiene un trastorno, hemorrágico, incluyen plasma recién congelado (FFP); FVIIa recombinante; FIX recombinante; concentrados FXI; virus inactivados, concentrados FVIII que contienen vWF; terapia de desensibilización que puede incluir grandes dosis de FVIII o FIX, junto con esteroides o inmunoglobulina intravenosa (IGIV) y ciclofosfamida; plasmaféresis junto con inmunosupresión e infusión de FVIII o FIX, con o sin terapia antifibrinolítica; la inducción de tolerancia inmune (ITI), con o sin terapia inmunosupresora (*e.g.* ciclofosfamida, prednisona, y/o anti-CD20); acetato de desmopresina [DDAVP]; antifibrinolíticos, tales como ácido aminocaproico y ácido tranexámico; concentrado de complejo de protrombina activado (PCC); agentes antihemofílicos; corticosteroides; agentes inmunosupresores; y estrógenos.

El iRNA y un agente terapéutico y/o tratamiento adicional se pueden administrar al mismo tiempo y/o en la misma combinación, *e.g.* parenteralmente, o el agente terapéutico adicional se puede administrar como Parte de una composición separada o en momentos separados y/o mediante otro método conocido en el arte o descrito en este documento.

En una implementación, la presente invención proporciona métodos para tratar a un sujeto, que padece un trastorno hemorrágico, *e.g.* una hemofilia, mediante la administrando por vía subcutánea al sujeto del compuesto AD-57213

(cadena Sentido: 5'-GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf-3’ (SEQ ID NO: 13) y cadena antisentido: 5'-usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg-3’ (SEQ ID NO: 14), en donde A, C, G y U son ribosa A, C, G o U; a, c, g y u son 2’-O-metil (2'-OMe) A, C, G o U; Af, Cf, Gf o Uf son 2'-flúor A, C, G o U; y s es un enlace fosforotioato) en una dosis de aproximadamente 0,200 mg/kg a aproximadamente 1,800 mg/kg, *e.g.* una dosis mensual de aproximadamente 0,200 mg/kg a aproximadamente 0,250 mg/kg; aproximadamente 0,425 mg/kg a aproximadamente 0,475 mg/kg; aproximadamente 0,875 mg/kg a aproximadamente 0,925 mg/kg; o aproximadamente 1,775 mg/kg a aproximadamente 1,825 mg/kg.

En otra implementación, la presente invención proporciona métodos para tratar un sujeto que padece un trastorno hemorrágico, *e.g.* una hemofilia, mediante la administrando por vía subcutánea al sujeto del compuesto AD-57213 (cadena Sentido: 5'-GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf-3’ (SEQ ID NO: 13) y cadena antisentido: 5'-usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg-3’ (SEQ ID NO: 14), en donde A, C, G y U son ribosa A, C, G o U; a, c, g y u son 2’ -O-metil (2'-OMe) A, C, G o U; Af, Cf, Gf o Uf son 2'-flúor A, C, G o U; y s es un enlace fosforotioato) en una dosis fija aproximadamente 25 mg a aproximadamente 100 mg, *e.g.* una dosis fija aproximadamente 25 mg, aproximadamente 50 mg, aproximadamente 80 mg o aproximadamente 100 mg. En una implementación, la dosis fija es 50 mg. En otra implementación, la dosis fija es 80 mg.

III. iRNA para uso en los métodos de la invención

En este documento, se describen métodos para el uso de agentes iRNA bicatenarios mejorados que inhiben la expresión de un gen Serpinc1 en una célula, tal como una célula dentro de un sujeto, *e.g.* un mamífero, tal como un ser humano que tiene un trastorno asociado a Serpinc1, *e.g.* un trastorno hemorrágico, *e.g.* hemofilia.

Por consiguiente, la invención proporciona agentes iRNA bicatenarios con modificaciones químicas capaces de inhibir la expresión de un gen objetivo (i.e., un gen Serpinc1) *in vivo*. En ciertos aspectos de la invención, se modifican sustancialmente todos los nucleótidos de un iRNA de la invención. En otras implementaciones de la invención, se modifican todos los nucleótidos de un iRNA de la invención. Los iRNA de la invención en los que "sustancialmente todos los nucleótidos están modificados" están en gran medida pero no completamente modificados y pueden incluir no más de 5, 4, 3, 2 o 1 nucleótidos no modificados.

El agente iRNA comprende una cadena sentido y una cadena antisentido. Cada cadena del agente iRNA puede variar de 12-30 nucleótidos de longitud. Por ejemplo, cada cadena puede tener entre 14-30 nucleótidos de longitud, 17-30 nucleótidos de longitud, 19-30 nucleótidos de longitud, 25-30 nucleótidos de longitud, 27-30 nucleótidos de longitud, 17-23 nucleótidos de longitud, 17-21 nucleótidos de longitud, 17-19 nucleótidos de longitud, 19-25 nucleótidos de

longitud, 19-23 nucleótidos de longitud, 19-21 nucleótidos de longitud, 21-25 nucleótidos de longitud o 21- 23 nucleótidos de longitud.

La cadena sentido y la cadena antisentido típicamente forman un RNA bicatenario doble ("dsRNA"), también denominado aquí "agente iRNA". La región dúplex de un agente iRNA puede tener una longitud de 12-30 nucleótidos. Por ejemplo, la región dúplex puede tener entre 14-30 pares de nucleótidos de longitud, 17-30 pares de nucleótidos de longitud, 27-30 pares de nucleótidos de longitud, 17-23 pares de nucleótidos de longitud, 17-21 pares de nucleótidos de longitud, 17 -19 pares de nucleótidos de longitud, 19-25 pares de nucleótidos de longitud, 19-23 pares de nucleótidos de longitud, 19-21 pares de nucleótidos de longitud, 21-25 pares de nucleótidos de longitud o 21-23 pares de nucleótidos de longitud. En otro ejemplo, la región dúplex se selecciona de 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 y 27 nucleótidos de longitud.

En una implementación, el agente iRNA puede contener una o más regiones salientes y/o grupos de terminación en el extremo 3’, el extremo 5' o ambos extremos de una o ambas cadenas. El saliente puede tener 1-6 nucleótidos de longitud, por ejemplo, 2-6 nucleótidos de longitud, 1-5 nucleótidos de longitud, 2-5 nucleótidos de longitud, 1-4 nucleótidos de longitud, 2-4 nucleótidos de longitud, 1-3 nucleótidos de longitud, 2-3 nucleótidos de longitud o 1-2 nucleótidos de longitud. Los salientes pueden ser el resultado de una cadena que es más larga que la otra, o el resultado de dos cadenas de la misma longitud que se

escalonan. El saliente puede formar una falta de coincidencia con el mRNA objeto o puede ser complementario a las secuencias de genes que se dirigen o puede ser otra secuencia. La primera y la segunda cadenas también se pueden unir, *e.g.* mediante bases adicionales para formar una horquilla, o mediante otros enlazadores no básicos.

En una implementación, los nucleótidos en la región saliente del agente iRNA pueden ser cada uno independientemente un nucleótido modificado o no modificado que incluye, pero no está limitado a 2'-azúcar modificado, tal como, 2-F, 2'-O-metil, timidina (T), 2'-O-metoxietil-5-metiluridina (Teo), 2'-O-metoxietiladenosina (Aeo), 2'-O-metoxietil-5-metilcitidina (m5Ceo), y cualquiera de sus combinaciones. Por ejemplo, TT puede ser una secuencia saliente para cualquiera de los extremos en cualquier cadena. El saliente puede formar una falta de coincidencia con el mRNA objeto o puede ser complementario a las secuencias de genes que se dirigen o puede ser otra secuencia.

Los salientes 5' o 3' en la cadena sentido, cadena antisentido o ambas cadenas del agente iRNA se pueden fosforilar. En algunas implementaciones, la (s) región (es) saliente (s) contiene (n) dos nucleótidos que tienen un fosforotioato entre los dos nucleótidos, donde los dos nucleótidos pueden ser iguales o diferentes. En una implementación, el saliente está presente en el extremo 3´ de la cadena sentido, cadena antisentido o ambas cadenas. En una implementación,

este saliente 3’ está presente en la cadena antisentido. En una implementación, este saliente 3’ está presente en la cadena sentido.

El agente iRNA puede contener solo un saliente único, lo que puede fortalecer la actividad de interferencia del iRNA, sin afectar su estabilidad general. Por ejemplo, el saliente monocatenario puede estar ubicado en el extremo 3’ terminal de la cadena sentido o, alternativamente, en el extremo 3' terminal de la cadena antisentido. El iRNA también puede tener un extremo romo, localizado en el extremo 5’ de la cadena antisentido (o el extremo 3' de la cadena sentido) o *viceversa*. Generalmente, la cadena antisentido del iRNA tiene un saliente nucleotídico en el extremo 3’, y el extremo 5' es romo. Aunque no se desea estar limitado por la teoría, el extremo romo asimétrico en el extremo 5’ de la cadena antisentido y el saliente en el extremo 3' de la cadena antisentido favorecen la carga de la cadena guía en el proceso RISC.

Cualquiera de los ácidos nucleicos presentados en la invención se puede sintetizar y/o modificar mediante métodos bien establecidos en el arte, tales como los descritos en “Current protocols in nucleic acid chemistry,” Beaucage, S.L. *et al.,* (Edrs.), John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USA, que se incorpora aquí como referencia. Las modificaciones incluyen, por ejemplo, modificaciones finales, por ejemplo, modificaciones en el extremo 5’ (fosforilación, conjugación, enlaces invertidos) o modificaciones en el extremo 3' (conjugación, nucleótidos de DNA, enlaces invertidos, etc.); modificaciones de bases, *e.g.*, reemplazo con bases

estabilizantes, bases desestabilizantes o bases que se emparejan por bases con un repertorio expandido de parejas, eliminación de bases (nucleótidos abásicos) o bases conjugadas; modificaciones de azúcar (*e.g.* en la posición 2’ o posición 4') o reemplazo del azúcar; y/o modificaciones de la cadena principal, incluida la modificación o sustitución de los enlaces fosfodiéster. Los ejemplos específicos de compuestos de iRNA útiles en las implementaciones descritas en este documento incluyen, pero no se limitan a, RNA que contienen cadenas principales modificadas o sin enlaces internucleosídicos naturales. Los RNA que tienen cadenas principales modificadas incluyen, entre otros, los que no tienen un átomo de fósforo en la cadena principal. Para los fines de esta especificación, y como se menciona a veces en el arte, los RNA modificados que no tienen un átomo de fósforo en su cadena principal internucleosida también se pueden considerar oligonucleósidos. En algunas implementaciones, un iRNA modificado tendrá un átomo de fósforo en su cadena principal internucleosídica.

Las cadenas principales RNA modificadas incluyen, por ejemplo, fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fosforoditioatos, fosfotriesteres, aminoalquilfosfotriesteres, metil y otros alquilfosfonatos, incluidos 3'-alquilenfosfonatos y fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos, incluyendo 3'-aminofosforamidato y aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionoalquilfosfonatos, tionoalquilfosfotriesteres, y boranofosfatos que tienen enlaces 3'-5’ normales, análogos enlazados en 2'-5' de estos y aquellos que tienen polaridad invertida en los que los pares adyacentes de unidades de nucleósidos

están unidos 3'-5' a 5'-3’ o 2'-5’ a 5'-2'. También están incluidas varias sales, sales mixtas y formas de ácido libre.

Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de los enlaces anteriores que contienen fósforo incluyen, pero no se limitan a, las patentes de ESTADO UNIDOS. 3,687,808; 4,469,863; 4,476,301; 5,023,243; 5,177,195; 5,188,897; 5,264,423; 5,276,019; 5,278,302; 5,286,717; 5,321,131; 5,399,676; 5,405,939; 5,453,496; 5,455,233; 5,466,677; 5,476,925; 5,519,126; 5,536,821; 5,541,316; 5,550,111; 5,563,253; 5,571,799; 5,587,361; 5,625,050; 6,028,188; 6,124,445; 6,160,109; 6,169,170; 6,172,209; 6,239,265; 6,277,603; 6,326,199; 6,346,614; 6,444,423; 6,531,590; 6,534,639; 6,608,035; 6,683,167; 6,858,715; 6,867,294; 6,878,805; 7,015,315; 7,041,816; 7,273,933; 7,321,029; y la patente de los ESTADO UNIDOS. RE39464, cuyos contenidos completos se incorporan aquí como referencia.

Las cadenas principales RNA modificadas que no incluyen un átomo de fósforo tienen cadenas principales formadas por enlaces internucleosídicos de alquilo o cicloalquilo de cadena corta, enlaces internucleosídicos de alquilo o cicloalquilo y heteroátomos mixtos, o uno o más enlaces internucleosídicos heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta. Estos incluyen aquellos que tienen enlaces morfolino (formados en Parte a partir de la Parte de azúcar de un nucleósido); cadenas principales de siloxano; cadenas principales de sulfuro, sulfóxido y sulfona; cadenas principales formacetilo y tioformacetilo; cadenas

principales de metileno formacetilo y tioformacetilo; cadenas que contienen alqueno; cadenas de sulfamato; cadenas principales de metilenoimino y metilenohidrazino; cadenas principales de sulfonato y sulfonamida; cadena principal de amida; y otros que tienen Partes componentes N, O, S y CH_2 mezcladas.

Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de los oligonucleósidos anteriores incluyen, pero no se limitan a, las patentes de Estados Unidos Nos. 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; y, 5.677.439, los contenidos completos de cada una de las cuales se incorporan aquí como referencia.

En otras implementaciones, se contemplan los miméticos RNA adecuados para uso en los iRNA, en los que tanto el enlace de azúcar como el enlace internucleosídico, i.e., la cadena principal, de las unidades de nucleótidos se reemplazan con grupos novedosos. Las unidades de base se mantienen para la hibridación con un compuesto objeto de ácido nucleico apropiado. Uno de dichos compuestos oligoméricos, un RNA mimético que se ha demostrado que tiene excelentes propiedades de hibridación, se denomina ácido nucleico peptídico (PNA). En los compuestos de PNA, la cadena principal de azúcar de un RNA se

reemplaza por una cadena principal que contiene amida, en particular una cadena principal de aminoetilglicina. Las nucleobases se retienen y se unen directa o indirectamente a los átomos de nitrógeno aza de la Parte de amida de la cadena principal. Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de compuestos de PNA incluyen, pero no se limitan a, las patentes de Estados Unidos números 5,539,082; 5,714,331; y 5,719,262, los contenidos completos de cada una de las cuales se incorporan aquí como referencia. Los compuestos de PNA adicionales adecuados para uso en los iRNA de la invención se describen, por ejemplo, en Nielsen *et al.,* Science, 1991, 254, 1497-1500.

Algunas implementaciones presentadas en la invención incluyen RNA con cadenas de fosforotioato y oligonucleósidos con cadenas de heteroátomos, y en particular --CH_2--NH--CH_2-, --CH_2--N(CH_3)--O--CH_2-[conocido como una cadena principal de metileno (metilimino) o MMI], --CH_2--O--N(CH_3)--CH_2--, --CH_2--N(CH_3)--N(CH_3)--CH_2-- and --N(CH_3)--CH_2--CH_2--[en el que la cadena principal de fosfodiéster nativa se representa como --O--P--O--CH_2--] de la patente de los Estados Unidos mencionada anteriormente Nº. 5,489,677, y las cadenas de amida de la patente de Estados Unidos mencionada anteriormente número 5,602,240. En algunas implementaciones, los RNA presentados aquí tienen estructuras de cadena principal morfolina de la Patente de Estados Unidos número 5,034,506 mencionada anteriormente.

Los RNA modificados también pueden contener uno o más restos de azúcar sustituidos. Los iRNA, *e.g.*, dsRNA, presentados en este documento pueden incluir uno de los siguientes en la posición 2: OH; F; O-, S-, o N-alquilo; O-, S- o N-alquenilo; O-, S-, o N-alquinilo; u O-alquil-O-alquilo, en donde el alquilo, alquenilo y alquinilo pueden ser alquilo C_1 a C_{10} sustituido o no sustituido o alquenilo y alquinilo C_2 a C_{10}. Las modificaciones adecuadas a modo de ejemplo incluyen $O[(CH_2)_nO]_mCH_3$, $O(CH_2)._nOCH_3$, $O(CH_2)_nNH_2$, $O(CH_2)_nCH_3$, $O(CH_2)_nONH_2$, and $O(CH_2)_nON[(CH_2)_nCH_3)]_2$, donde n y m son de 1 a aproximadamente 10. En otras implementaciones, los dsRNA incluyen uno de los siguientes en la posición 2': alquilo inferior de C_1 a C_{10}, alquilo inferior sustituido, alcarilo, aralquilo, O-alcarilo u O-aralquilo, SH, SCH_3, OCN, Cl, Br, CN, CF_3, OCF_3, $SOCH_3$, SO_2CH_3, ONO_2, NO_2, N_3, NH_2, heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino, sililo sustituido, un grupo de escisión de RNA, un grupo reportero, un intercalador, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un iRNA, o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un iRNA, y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. En algunas implementaciones, la modificación incluye un 2' metoxietoxi (2'-O-$CH_2CH_2OCH_3$, también conocido como 2'-O-(2-metoxietilo) o 2'-MOE) () (Martin *et al., Helv. Chim. Acta*, 1995, 78:486-504) i.e., un grupo alcoxi-alcoxi. Otra modificación de ejemplo es 2'-dimetilaminooxietoxi, i.e., un grupo $O(CH_2)_2ON(CH_3)_2$, también conocido como 2'-DMAOE, como se describe en los ejemplos a continuación, y 2'-dimetilaminoetoxietoxi (también conocido en el arte como 2'-O-dimetilaminoetoxietilo o 2'-DMAEOE), i.e., 2'-O-CH_2-O-CH_2-N$(CH_2)_2$.

Otras modificaciones incluyen 2'-metoxi (2'-OCH_3), 2'-aminopropoxi (2'-$OCH_2CH_2CH_2NH_2$) y 2'-flúor (2'-F). También se pueden realizar modificaciones similares en otras posiciones sobre el RNA de un iRNA, particularmente la posición 3´ del azúcar en el nucleótido terminal 3' o en los dsRNA enlazados en 2'-5' y la posición 5' del nucleótido terminal 5'. Los iRNA también pueden tener miméticos de azúcar tales como restos ciclobutilo en lugar del azúcar pentofuranosilo. Las patentes de Estado Unidos representativas que enseñan la preparación de tales estructuras de azúcar modificadas incluyen, pero no se limitan a, las patentes de Estados Unidos Nos. 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; y 5700,920, algunas de los cuales son propiedad común con la solicitud actual. Los contenidos completos de cada una de las anteriores se incorporan aquí como referencia.

Un iRNA también puede incluir modificaciones o sustituciones de nucleobases (a menudo referidas en el arte simplemente como "base"). Como se usa en este documento, las nucleobases "no modificadas" o "naturales" incluyen las bases de purina adenina (A) y guanina (G), y las bases de pirimidina timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Las nucleobases modificadas incluyen otras nucleobases sintéticas y naturales tales como desoxitimina (dT), 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetil citosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metil y otros derivados alquílicos de adenina y guanina, 2-propilo y otros derivados alquílicos de

adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracilo y citosina, 5-propinil uracilo y citosina, 6-azouracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo anal otras adeninas y guaninas 8-sustituidas, 5-halo, particularmente 5-bromo, 5-triflúormetilo y otros uracilos y citosinas 5-sustituidas, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-deazaguanina y 7-deazaadenina y 3-deazaguanina y 3-deazaadenina. Las nucleobases adicionales incluyen las descritas en la patente de Estados Unidos No. 3,687,808, las descritas en Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine, Herdewijn, e.g., ed. Wiley-VCH, 2008; los divulgados en The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, pages 858-859, Kroschwitz, J. L, ed. John Wiley & Sons, 1990, estos divulgados por Englisch *et al.,* Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613, y los divulgados por Sanghvi, Y S., Chapter 15, dsRNA Research and Applications, pages 289-302, Crooke, S. T. and Lebleu, B., Ed., CRC Press, 1993. Algunas de estas nucleobases son particularmente útiles para aumentar la afinidad de unión de los compuestos oligoméricos presentados en la invención. Estos incluyen pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas N-2, N-6 y 0-6 sustituidas, que incluyen 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. Se ha demostrado que las sustituciones de 5-metilcitosina aumentan la estabilidad del dúplex de ácido nucleico en 0,6-1,2°C ((Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. and Lebleu, B., Eds., dsRNA Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278) y son

ejemplos de sustituciones de bases, incluso más particularmente cuando se combinan con modificaciones de azúcares 2'-O-metoxietilo.

Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de algunas de las nucleobases modificadas mencionadas anteriormente así como otras nucleobases modificadas incluyen, pero no se limitan a, las patentes de Estados Unidos mencionadas anteriormente Nos. 3,687,808, 4,845,205; 5,130,30; 5,134,066; 5,175,273; 5,367,066; 5,432,272; 5,457,187; 5,459,255; 5,484,908; 5,502,177; 5,525,711; 5,552,540; 5,587,469; 5,594,121, 5,596,091; 5,614,617; 5,681,941; 5,750,692; 6,015,886; 6,147,200; 6,166,197; 6,222,025; 6,235,887; 6,380,368; 6,528,640; 6,639,062; 6,617,438; 7,045,610; 7,427,672; y 7,495,088, cuyos contenidos completos de cada una de las cuales se incorporan aquí como referencia.

El RNA de un iRNA también se puede modificar para incluir uno o más restos de azúcares bicíclicos. Un "azúcar bicíclico" es un anillo de furanosilo modificado por el puente de dos átomos. Un "nucleósido bicíclico" ("BNA") es un nucleósido que tiene un resto de azúcar que comprende un puente que conecta dos átomos de carbono del anillo de azúcar, formando así un sistema de anillo bicíclico. En ciertas implementaciones, el puente conecta el 4'-carbono y el 2'-carbono del anillo de azúcar. Por lo tanto, en algunas implementaciones, un agente de la invención puede incluir el RNA de un iRNA que también se puede modificar para incluir uno o más ácidos nucleicos bloqueados (LNA). Un ácido

nucleico bloqueado es un nucleótido que tiene un resto de ribosa modificado en el que el resto de ribosa comprende un puente adicional que conecta los carbonos 2' y 4'. En otras palabras, un LNA es un nucleótido que comprende un resto de azúcar bicíclico que comprende un puente 4'-CH_2-O-2'. Esta estructura "bloquea" efectivamente la ribosa en la conformación estructural 3'-endo. Se ha demostrado que la adición de ácidos nucleicos bloqueados a los siRNA aumenta la estabilidad del siRNA en el suero y reduce los efectos fuera del objetivo (Elmen, J. *et al.,* (2005) *Nucleic Acids Research* 33(1):439-447; Mook, OR. *et al.,* (2007) *Mol Canc Ther* 6(3):833-843; Grunweller, A. *et al.,* (2003) *Nucleic Acids Research* 31(12):3185-3193).

Los ejemplos de nucleósidos bicíclicos para uso en los polinucleótidos de la invención incluyen, pero no se limitan, nucleósidos que comprenden un puente entre los átomos del anillo ribosilo 4' y 2'. En ciertas implementaciones, los agentes polinucleotídicos antisentido de la invención incluyen uno o más nucleósidos bicíclicos que comprenden un puente 4' a 2'. Los ejemplos de dichos nucleósidos bicíclicos puenteados de 4' a 2' incluyen, pero no se limitan a, 4′-(CH2)—O-2′ (LNA); 4′-(CH2)—S-2′; 4′-(CH2)2—O-2′ (ENA); 4′-CH(CH3)—O-2′ (también denominado "etilo restringido" o "cEt") y 4′-CH(CH2OCH3)—O-2′ (y análogos de los mismos; ver, e.g., patente de los Estados Unidos No. 7,399,845); 4′-C(CH3)(CH3)—O-2′ (y análogos de los mismos, ., la Patente de Estados Unidos Nº 8,278,283); 4′-CH2—N(OCH3)-2′ (y análogos de los mismos, ver, e.g., la Patente de Estados Unidos Nº. . 8,278,425); 4′-CH2—O—N(CH3)-2′ (ver, e.g., la

publicación de patente de los Estados Unidos 2004/0171570); 4′-CH2—N(R)—O-2′, en donde R es H, alquilo C1-C12, o un grupo protector (ver, e.g., la Patente de Estados Unidos Nº 7,427,672); 4'-CH2-C(H)(CH3)-2' (ver, e.g., Chattopadhyaya *et al., J. Org. Chem*., 2009, 74, 118-134); y 4'-CH2-C(=CH2)-2' (y análogos de los mismos, ver, e.g., la Patente de Estados Unidos Nº 8,278,426). Los contenidos completos de cada una de los anteriores se incorporan aquí como referencia.

Las Patentes de Estados Unidos representativas adicionales y las Publicaciones de Patente de los Estados Unidos que enseñan la preparación de nucleótidos de ácido nucleico bloqueados incluyen, pero no se limitan a, las siguientes: Patentes de Estados Unidos Nº. 6,268,490; 6,525,191; 6,670,461; 6,770,748; 6,794,499; 6,998,484; 7,053,207; 7,034,133;7,084,125; 7,399,845; 7,427,672; 7,569,686; 7,741,457; 8,022,193; 8,030,467; 8,278,425; 8,278,426; 8,278,283; US 2008/0039618; y US 2009/0012281, los contenidos completos de cada una de los cuales se incorporan aquí como referencia.

Cualquiera de los nucleósidos bicíclicos anteriores se puede preparar con una o más configuraciones estereoquímicas de azúcar que incluyen, por ejemplo, α-L-ribofuranosa y β-D-ribofuranosa (ver el documento WO 99/14226).

El RNA de un iRNA también se puede modificar para incluir uno o más nucleótidos de etilo restringidos. Como se usa en este documento, un "nucleótido de etilo restringido" o "cEt" es un ácido nucleico bloqueado que comprende un

resto de azúcar bicíclico que comprende un puente 4'-CH(CH3)-0-2’. En una implementación, un nucleótido de etilo restringido está en la conformación S referida aquí como "S-cEt".

Un iRNA de la invención también puede incluir uno o más "nucleótidos conformacionalmente restringidos" ("CRN"). Los nucleótidos CRN son análogos con un enlazador que conecta los carbonos C2' y C4’ de ribosa o los carbonos C3 y -C5' de ribosa. Los CRN bloquean el anillo de ribosa en una conformación estable y aumenta la afinidad de hibridación con el mRNA. El enlazador tiene una longitud suficiente para colocar el oxígeno en una posición óptima para la estabilidad y la afinidad, lo que da como resultado un menor fruncimiento del anillo de ribosa.

Las publicaciones representativas que enseñan la preparación de algunos de los CRN mencionados anteriormente incluyen, pero no se limitan a, la Publicación de Patente de Estados Unidos Nº 2013/0190383; y la publicación PCT WO 2013/036868, cuyos contenidos completos se incorporan aquí como referencia.

Uno o más de los nucleótidos de un iRNA de la invención también pueden incluir un nucleótido sustituido con hidroximetilo. Un "nucleótido sustituido con hidroximetilo" es un 2'-3'-seco-nucleótido acíclico, también denominado como una modificación de "ácido nucleico desbloqueado" ("UNA").

Las publicaciones representativas de ESTADOS UNIDOS, que enseñan la preparación de UNA incluyen, pero no se limitan a, la Patente de Estados Unidos Nº. 8,314,227; y las Publicaciones de Patente de los Estados Unidos Nos. 2013/0096289; 2013/0011922; y 2011/0313020, los contenidos completos de cada una de las cuales se incorporan aquí como referencia.

Las modificaciones potencialmente estabilizantes en los extremos de las moléculas RNA pueden incluir N-(acetilaminocaproil)-4-hidroxiprolinol(Hyp-C6-NHAc), N-(caproil-4-hidroxiprolinol(Hyp-C6), N-(acetil-4-hidroxiprolinol)(Hyp-NHAc), timidina-2'-0-desoxitimidina(éter), N-(aminocaproil)-4-hidroxiprolinol (Hyp-C6-amino), 2-docosanoil-uridina-3"-fosfato, base invertida dT (idT) y otras. La divulgación de esta modificación se puede encontrar en la Publicación PCT No. WO 2011/005861.

A. iRNA modificados que comprenden motivos de la invención

En ciertos aspectos de la invención, los agentes iRNA bicatenario de la invención incluyen agentes con modificaciones químicas como se describe, por ejemplo, en la Solicitud Provisional de Estados Unidos Nº- 61/561,710, presentada el 18 de noviembre de 2011 o en PCT/US2012/065691, presentada el 16 de noviembre de 2012, los contenidos completos de cada una de las cuales se incorporan aquí como referencia.

Como se muestra aquí, en la Solicitud Provisional Nº- 61/561,710, y en PCT/US2012/065691, se puede obtener un resultado superior introduciendo uno o más motivos de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos en una cadena sentido y/o cadena antisentido de un agente iRNA, particularmente en o cerca del sitio de escisión. En algunas implementaciones, de otra manera, la cadena sentido y la cadena antisentido del agente iRNA se pueden modificar completamente. La introducción de estos motivos interrumpe el patrón de modificación, si está presente, de la cadena sentido y/o antisentido. El agente iRNA puede estar opcionalmente conjugado con un ligando derivado de GalNAc, por ejemplo en la cadena sentido. Los agentes iRNA resultantes presentan una actividad silenciadora superior del gen.

Más específicamente, se ha descubierto sorprendentemente que cuando la cadena sentido y la cadena antisentido del agente iRNA bicatenario se modifican para tener uno o más motivos de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos en o cerca del sitio de escisión de al menos una cadena de un agente iRNA, la actividad silenciadora de genes del agente iRNA se mejoró de manera superior.

En una implementación, el agente iRNA es un doble extremo romo de 19 nucleótidos de longitud, donde la cadena sentido contiene al menos un motivo de tres modificaciones 2'-F en tres nucleótidos consecutivos en las posiciones 7, 8, 9 del extremo 5’. La cadena antisentido contiene al menos un motivo de tres

modificaciones 2'-O-metilo en tres nucleótidos consecutivos en las posiciones 11, 12, 13 desde el extremo 5’.

En otra implementación, el agente iRNA es un doble extremo romo de 20 nucleótidos de longitud, en el que la cadena sentido contiene al menos un motivo de tres modificaciones 2'-F en tres nucleótidos consecutivos en las posiciones 8, 9, 10 del extremo 5’. La cadena antisentido contiene al menos un motivo de tres modificaciones 2'-O-metilo en tres nucleótidos consecutivos en las posiciones 11, 12, 13 desde el extremo 5’.

En aún otra implementación, el agente iRNA es un doble extremo romo de 21 nucleótidos de longitud, en el que la cadena sentido contiene al menos un motivo de tres modificaciones 2'-F en tres nucleótidos consecutivos en las posiciones 9, 10, 11 del extremo 5’. La cadena antisentido contiene al menos un motivo de tres modificaciones 2'-O-metilo en tres nucleótidos consecutivos en las posiciones 11, 12, 13 desde el extremo 5’.

En una implementación, el agente iRNA comprende una cadena sentido de 21 nucleótidos y una cadena antisentido de 23 nucleótidos, donde la cadena sentido contiene al menos un motivo de tres modificaciones 2'-F en tres nucleótidos consecutivos en las posiciones 9, 10, 11 del extremo 5’; la cadena antisentido contiene al menos un motivo de tres modificaciones 2'-O-metilo en tres nucleótidos consecutivos en las posiciones 11, 12, 13 del extremo 5’ , en donde un

extremo del agente iRNA es romo, mientras que el otro extremo comprende 2 nucleótidos salientes. Preferiblemente, el saliente de 2 nucleótidos está en el extremo 3´ de la cadena antisentido. Cuando el saliente de 2 nucleótidos está en el extremo 3´ de la cadena antisentido, puede haber dos enlaces internucleótidos de fosforotioato entre los tres nucleótidos terminales, en donde dos de los tres nucleótidos son los nucleótidos salientes, y el tercer nucleótido es un nucleótido apareado próximo al saliente nucleótido. En una implementación, el agente iRNA tiene adicionalmente dos enlaces internucleótidos de fosforotioato entre los tres nucleótidos terminales tanto en el extremo 5’ de la cadena sentido como en el extremo 5' de la cadena antisentido. En una implementación, cada nucleótido en la cadena sentido y la cadena antisentido del agente iRNA, que incluye los nucleótidos que son Parte de los motivos, son nucleótidos modificados. En una implementación, cada residuo se modifica independientemente con un 2'-O-metilo o 3'-flúor, e.g., en un motivo alternante. Opcionalmente, el agente iRNA comprende además un ligando (preferiblemente GalNAc3).

En una implementación, el agente iRNA comprende cadenas sentido y antisentido, en donde el agente iRNA comprende una primera cadena que tiene una longitud que es al menos 25 y como máximo 29 nucleótidos y una segunda cadena que tiene una longitud que es como máximo 30 nucleótidos con al menos un motivo de tres modificaciones 2'-O-metilo en tres nucleótidos consecutivos en la posición 11, 12, 13 desde el extremo 5’; donde el extremo 3´ de la primera cadena y el extremo 5' de la segunda cadena forman un extremo romo y la

segunda cadena es 1-4 nucleótidos más larga en su extremo 3’ que la primera cadena, en donde la región de la región dúplex que está a al menos 25 nucleótidos de longitud, y la segunda cadena es suficientemente complementaria a un mRNA objeto a lo largo de al menos 19 nucleótidos de la segunda longitud de cadena para reducir la expresión del gen objeto cuando el agente iRNA se introduce en una célula de mamífero, y en donde la escisión dicer del agente iRNA da preferentemente como resultado un siRNA que comprende el extremo 3´ de la segunda cadena, reduciendo de ese modo la expresión del gen objeto en el mamífero. Opcionalmente, el agente iRNA comprende además un ligando.

En una implementación, la cadena sentido del agente iRNA contiene al menos un motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos, donde uno de los motivos se produce en o cerca del sitio de escisión en la cadena sentido.

En una implementación, la cadena antisentido del agente iRNA también puede contener al menos un motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos, donde uno de los motivos se produce en o cerca del sitio de escisión en la cadena antisentido.

Para un agente iRNA que tiene una región dúplex de 17-23 nucleótidos de longitud, el sitio de escisión de la cadena antisentido está típicamente de aproximadamente las posiciones 10, 11 y 12 desde el extremo 5’. Por lo tanto, los

motivos de tres modificaciones idénticas pueden ocurrir en las posiciones 9, 10, 11; las posiciones 10, 11, 12 las posiciones; 11, 12, 13 las posiciones; 12, 13, 14; o las posiciones 13, 14, 15 de la cadena antisentido, el recuento que comienza desde el primer nucleótido desde el extremo 5’ de la cadena antisentido, o el recuento que comienza desde el primer nucleótido apareado dentro de la región dúplex desde el extremo 5' de la cadena antisentido. El sitio de escisión en la cadena antisentido también puede cambiar de acuerdo con la longitud de la región dúplex del iRNA del extremo 5’.

La cadena sentido del agente iRNA puede contener al menos un motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos en el sitio de escisión de la cadena; y la cadena antisentido puede tener al menos un motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos en o cerca del sitio de escisión de la cadena. Cuando la cadena sentido y la cadena antisentido forman un dúplex dsRNA, la cadena sentido y la cadena antisentido pueden alinearse de modo que un motivo de los tres nucleótidos en la cadena sentido y un motivo de los tres nucleótidos en la cadena antisentido tengan al menos una superposición de nucleótidos, i.e., al menos uno de los tres nucleótidos del motivo en la cadena sentido forma un par de bases con al menos uno de los tres nucleótidos del motivo en la cadena antisentido. Alternativamente, al menos dos nucleótidos pueden superponerse, o los tres nucleótidos pueden superponerse.

En una implementación, la cadena sentido del agente iRNA puede contener más de un motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos. El primer motivo puede aparecer en o cerca del sitio de escisión de y los otros motivos pueden ser una modificación del ala. El término "modificación de ala" en este documento se refiere a un motivo que se produce en otra Parte de la cadena que está separado del motivo en o cerca del sitio de escisión de la misma cadena. La modificación del ala esta, ya sea adyacente al primer motivo o está separada por al menos uno o más nucleótidos. Cuando los motivos son inmediatamente adyacentes entre sí, la química de los motivos es distinta entre sí y cuando los motivos están separados por uno o más nucleótidos, las químicas pueden ser iguales o diferentes. Pueden estar presentes dos o más modificaciones de ala. Por ejemplo, cuando hay presentes dos modificaciones de ala, cada modificación de ala puede ocurrir en un extremo con relación al primer motivo que está en o cerca del sitio de escisión o en cualquier lado del motivo principal.

Al igual que la cadena sentido, la cadena antisentido del agente iRNA puede contener más de un motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos, con al menos uno de los motivos que se produce en o cerca del sitio de escisión de la cadena. Esta cadena antisentido también puede contener una o más modificaciones de ala en una alineación similar a las modificaciones de ala que pueden estar presentes en la cadena sentido.

En una implementación, la modificación del ala en la cadena sentido o cadena antisentido del agente iRNA típicamente no incluye el primero o los dos nucleótidos terminales en el extremo 3’, el extremo 5' o ambos extremos de la cadena.

En otra implementación, la modificación del ala en la cadena sentido o cadena antisentido del agente iRNA típicamente no incluye el primero o segundo nucleótidos apareados dentro de la región dúplex en el extremo 3’, el extremo 5' o ambos extremos de la cadena.

Cuando la cadena sentido y la cadena antisentido del agente iRNA contienen cada una al menos una modificación de ala, las modificaciones de ala pueden caer en el mismo extremo de la región dúplex, y tienen una superposición de uno, dos o tres nucleótidos.

Cuando la cadena sentido y la cadena antisentido del agente iRNA contienen cada una al menos dos modificaciones de ala, la cadena sentido y la cadena antisentido se pueden alinear de modo que dos modificaciones de una cadena caigan en un extremo de la región dúplex, que tiene una superposición de uno, dos o tres nucleótidos; dos modificaciones cada una de una cadena caen en el otro extremo de la región dúplex, que tiene una superposición de uno, dos o tres nucleótidos; dos modificaciones de una cadena caen sobre cada lado del motivo

principal, teniendo una superposición de uno, dos o tres nucleótidos en la región dúplex.

En una implementación, se puede modificar cada nucleótido en la cadena sentido y la cadena antisentido del agente iRNA, incluyendo los nucleótidos que son Parte de los motivos. Cada nucleótido se puede modificar con la misma o diferente modificación que puede incluir una o más alteraciones de uno o ambos de los oxígenos de fosfato que no se unen y/o de uno o más de los oxígenos de fosfato de enlace; la alteración de un constituyente del azúcar ribosa, e.g., del hidroxilo 2' sobre el azúcar ribosa; reemplazo masivo del resto de fosfato con enlazadores "defosfo"; modificación o reemplazo de una base natural; y reemplazo o modificación de la cadena principal de ribosa-fosfato.

Como los ácidos nucleicos son polímeros de subunidades, muchas de las modificaciones ocurren en una posición que se repite dentro de un ácido nucleico, e.g., una modificación de una base, o un resto fosfato, o un O no enlazante de un resto fosfato. En algunos casos, la modificación ocurrirá en todas las posiciones del sujeto en el ácido nucleico, pero en muchos casos no ocurrirá. A modo de ejemplo, una modificación solo puede ocurrir en una posición terminal 3’ o 5', solo puede ocurrir en una región terminal, e.g., en una posición en un nucleótido terminal o en los últimos 2, 3, 4, 5 o 10 nucleótidos de una cadena. Se puede producir una modificación en una región de doble cadena, una región de cadena única o en ambas. Una modificación puede ocurrir solo en la región de doble

cadena de un RNA o puede ocurrir solo en una región de cadena única de un RNA. Por ejemplo, una modificación de fosforotioato en una posición O no enlazante solo puede ocurrir en uno o en ambos extremos, solo puede ocurrir en una región terminal, e.g., en una posición en un nucleótido terminal o en los últimos 2, 3, 4, 5, o 10 nucleótidos de una cadena, o puede ocurrir en regiones de doble cadena y cadena simple, particularmente en los extremos. El extremo o los extremos 5' se pueden fosforilar.

Puede ser posible, e.g., mejorar la estabilidad, incluir bases particulares en salientes, o incluir nucleótidos modificados o sustitutos de nucleótidos, en salientes de una sola cadena, e.g., en un saliente de 5' o 3', o en ambos. Por ejemplo, puede ser deseable incluir nucleótidos de purina en salientes. En algunas implementaciones, todas o algunas de las bases en un saliente 3’ o 5' se pueden modificar, e.g., con una modificación descrita en este documento. Las modificaciones pueden incluir, e.g., el uso de modificaciones en la posición 2' del azúcar ribosa con modificaciones que son conocidas en el arte, e.g., el uso de desoxirribonucleótidos, 2'-desoxi-2'-flúor (2'-F)) o 2'-O-metilo modificado en lugar del riboazúcar de la nucleobase, y modificaciones en el grupo fosfato, e.g., modificaciones de fosforotioato. Los salientes no necesitan ser homólogos con la secuencia objetivo.

En una implementación, cada residuo de la cadena sentido y de la cadena antisentido se modifica independientemente con LNA, HNA, CeNA, 2'-metoxietilo,

2'-O-metilo, 2'-O-alilo, 2'-C-alilo, 2'-deoxi, 2'-hidroxilo o 2'-flúor. Las cadenas pueden contener más de una modificación. En una implementación, cada residuo de la cadena sentido y de la cadena antisentido se modifica independientemente con 2'-O-metilo o 2'-flúor.

Al menos dos modificaciones diferentes están típicamente presentes en la cadena sentido y la cadena antisentido. Esas dos modificaciones pueden ser las modificaciones 2'-O-metil o 2'-flúor u otras.

En una implementación, el Na y/o Nb comprenden modificaciones de un patrón alternante. El término "motivo alternante", como se usa en el presente documento, se refiere a un motivo que tiene una o más modificaciones, cada modificación ocurre en nucleótidos alternantes de una cadena. El nucleótido alternante se puede referir a uno por cada otro nucleótido o uno por cada tres nucleótidos, o un patrón similar. Por ejemplo, si A, B y C representan cada uno un tipo de modificación del nucleótido, el motivo alternante puede ser “ABABABABABAB…,” “AABBAABBAABB…,” “AABAABAABAAB…,” “AAABAAABAAAB…,” “AAABBBAAABBB…,” o “ABCABCABCABC…,” etc.

Los tipos de modificaciones contenidas en el motivo alternante pueden ser el mismo o diferente. Por ejemplo, si A, B, C, D representan cada uno un tipo de modificación en el nucleótido, el patrón alternante, i.e., las modificaciones en cada otro nucleótido, pueden ser las mismas, pero se puede seleccionar cada cadena

sentido o antisentido de varias posibilidades de modificaciones dentro del motivo alternante como "ABABAB ...", "ACACAC ..." "BDBDBD ..." o "CDCDCD ...", etc.

En una implementación, el agente iRNA de la invención comprende el patrón de modificación para el motivo alternante en la cadena sentido con respecto al patrón de modificación para el motivo alternante en la cadena antisentido que se desplaza. El desplazamiento puede ser tal que el grupo modificado de nucleótidos de la cadena sentido corresponde a un grupo de nucleótidos diferentemente modificado de la cadena antisentido y viceversa. Por ejemplo, la cadena sentido cuando se combina con la cadena antisentido en el dúplex de dsRNA, el motivo alternante en la cadena sentido puede comenzar con "ABABAB" desde 5'-3' de la cadena y el motivo alternante en la cadena antisentido puede comenzar con "BABABA"de 5'-3' de la cadena dentro de la región dúplex. Como otro ejemplo, el motivo alternante en la cadena sentido puede comenzar con "AABBAABB" desde 5'-3' de la cadena y el motivo alternante en la cadena antisentido puede comenzar con "BBAABBAA" desde 5'-3’ de la cadena dentro de la región dúplex, de modo que hay un desplazamiento completo o parcial de los patrones de modificación entre la cadena sentido y la cadena antisentido.

En una implementación, el agente iRNA comprende el patrón del motivo alternante de la modificación 2'-O-metilo y la modificación 2'-F en la cadena sentido inicialmente tiene un desplazamiento relativo al patrón del motivo alternante de la modificación 2'-O-metilo y la modificación 2'-F en la cadena

antisentido inicialmente, i.e., el nucleótido modificado 2'-O-metilo en los pares de bases de cadena sentido con un nucleótido modificado 2'-F en la cadena antisentido y viceversa. La posición 1 de la cadena sentido puede comenzar con la modificación 2'-F, y la posición 1 de la cadena antisentido puede comenzar con la modificación 2'-O-metilo.

La introducción de uno o más motivos de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos a la cadena sentido y/o a la cadena antisentido interrumpe el patrón de modificación inicial presente en la cadena sentido y/o en la cadena antisentido. Esta interrupción del patrón de modificación de la cadena sentido y/o de la cadena antisentido introduciendo uno o más motivos de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos a la cadena sentido y/o ala cadena antisentido aumenta sorprendentemente la actividad silenciadora del gen objetivo.

En una implementación, cuando se introduce el motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos a cualquiera de las cadenas, la modificación del nucleótido próximo al motivo es una modificación diferente de la modificación del motivo. Por ejemplo, la Parte de la secuencia que contiene el motivo es "...NaYYYNb...", donde "Y" representa la modificación del motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos, y "Na" y "Nb" representan una modificación del nucleótido junto al motivo "YYY" que es diferente de la modificación de Y, y donde Na y Nb pueden ser las mismas o

diferentes modificaciones. Alternativamente, Na y/o Nb pueden estar presentes o ausentes cuando hay una modificación de ala presente.

El agente iRNA puede comprender además al menos un enlace internucleotídico de fosforotioato o metilfosfonato. La modificación del enlace internucleotídico de fosforotioato o metilfosfonato puede tener lugar en cualquier nucleótido de la cadena sentido o de la cadena antisentido o en ambas cadenas en cualquier posición de la cadena. Por ejemplo, la modificación del enlace internucleotídico puede ocurrir en cada nucleótido en la cadena sentido y/o en la cadena antisentido; cada modificación de enlace internucleotídico puede ocurrir en un patrón alternante en la cadena sentido y/o la cadena antisentido; o la cadena sentido o la cadena antisentido pueden contener ambas modificaciones de enlace internucleotídico en un patrón alternante. El patrón alternante de la modificación del enlace internucleotídico en la cadena sentido puede ser igual o diferente de la cadena antisentido, y el patrón alternante de la modificación del enlace internucleotídico en la cadena sentido puede tener un desplazamiento relativo al patrón alternante de la modificación del enlace internucleotídico en la cadena antisentido.

En una implementación, el iRNA comprende una modificación del enlace internucleotídico de fosforotioato o metilfosfonato en la región saliente. Por ejemplo, la región saliente puede contener dos nucleótidos que tienen un enlace internucleotídico fosforotioato o metilfosfonato entre los dos nucleótidos. También

se pueden realizar modificaciones del enlace internucleotídico para unir los nucleótidos salientes con los nucleótidos apareados terminales dentro de la región dúplex. Por ejemplo, al menos 2, 3, 4 o todos los nucleótidos salientes se pueden unir mediante enlaces internucleotídicos de fosforotioato o metilfosfonato y, opcionalmente, pueden existir enlaces internucleótidos adicionales de fosforotioato o metilfosfonato que unan el nucleótido saliente con un nucleótido apareado que esté próximo al nucleótido saliente. Por ejemplo, pueden haber al menos dos enlaces internucleótidos de fosforotioato entre los tres nucleótidos terminales, en los que dos de los tres nucleótidos son nucleótidos salientes, y el tercero es un nucleótido apareado próximo al nucleótido saliente. Estos tres nucleótidos terminales pueden estar en el extremo 3’ de la cadena antisentido, el extremo 3' de la cadena sentido, el extremo 5’ de la cadena antisentido y/o el extremo 5' de la cadena antisentido.

En una implementación, el saliente de 2 nucleótidos está en el extremo 3’ de la cadena antisentido, y existen dos enlaces internucleótidos de fosforotioato entre los tres nucleótidos terminales, en donde dos de los tres nucleótidos son los nucleótidos salientes, y el tercer nucleótido es un nucleótido apareado al lado del nucleótido saliente. Opcionalmente, el agente iRNA puede tener adicionalmente dos enlaces internucleótidos de fosforotioato entre los tres nucleótidos terminales tanto en el extremo 5’ de la cadena sentido como en el extremo 5' de la cadena antisentido.

En una implementación, el agente iRNA comprende apareamientos incorrectos con el objetivo, dentro del dúplex, o combinaciones de los mismos. Un "no coincidente" puede ser un apareamiento de bases no canónicas o un apareamiento canónico diferente de nucleótidos. El no coincidente puede ocurrir en la región saliente o en la región dúplex. El par de bases se puede clasificar en función de su propensión para promover la disociación o fusión (e.g., en la energía libre de asociación o disociación de un apareamiento particular, el enfoque más simple es examinar los pares en un par de bases individuales, aunque también se puede usar el próximo vecino o un análisis similar). En términos de promoción de la disociación: A: U es preferido a G: C; G: U es preferido sobre G: C; e I: C es preferido sobre G: C (I = inosina). Los no coincidentes, e.g., apareamientos no canónicos o distintos de los apareamientos canónicos (como se describe en otra Parte de este documento) son preferibles a los apareamientos canónicos (A: T, A: U, G: C); y las parejas que incluyen una base universal son preferibles a las parejas canónicas. Una "base universal" es una base que exhibe la capacidad de reemplazar cualquiera de las cuatro bases normales (G, C, A y U) sin desestabilizar significativamente las interacciones vecinas de pares de bases o alterar la utilidad bioquímica funcional esperada del oligonucleótido modificado. Los ejemplos no limitantes de bases universales incluyen 2'-desoxiinosina (desoxinucleótido de hipoxantina) o sus derivados, análogos de nitroazol y bases aromáticas hidrófobicas no enlazadas a hidrógeno.

En una implementación, el agente iRNA comprende al menos uno de los primeros 1, 2, 3, 4 o 5 pares de bases dentro de las regiones dúplex del extremo 5’ de la cadena antisentido seleccionada independientemente del grupo de: A: U, G: U, I: C, y pares no coincidentes, e.g., apareamientos o apareamientos no canónicos o distintos de los canónicos que incluyen una base universal, para promover la disociación de la cadena antisentido en el extremo 5’ del dúplex.

En una implementación, el nucleótido en la posición 1 dentro de la región dúplex desde el extremo 5’ en la cadena antisentido se selecciona del grupo que consiste en A, dA, dU, U y dT. Alternativamente, al menos uno del primer 1, 2 o 3 pares de bases dentro de la región dúplex desde el extremo 5’ de la cadena antisentido es un par de bases AU. Por ejemplo, el primer par de bases dentro de la región dúplex desde el extremo 5’ de la cadena antisentido es un par de bases AU.

En otra implementación, el nucleótido en el extremo 3’ de la cadena sentido es desoxitimina (dT). En otra implementación, el nucleótido en el extremo 3’ de la cadena antisentido es desoxitimina (dT). En una implementación, existe una secuencia corta de nucleótidos de desoxitimina, por ejemplo, dos nucleótidos dT en el extremo 3’ de la cadena sentido y/o cadena antisentido.

En una implementación, la secuencia de cadena sentido se puede representar por la fórmula (I):

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

donde:

i y j son cada uno independientemente 0 o 1;

p y q son cada uno independientemente 0-6;

cada N_a representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 0-25 nucleótidos modificados, cada secuencia comprende al menos dos nucleótidos modificados de forma diferente;

cada N_b representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 0-10 nucleótidos modificados;

cada n_p y n_q representan independientemente un nucleótido saliente;

en donde N_b y Y no tienen la misma modificación; y

XXX, YYY y ZZZ representan cada uno independientemente un motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos. Preferiblemente, es todos los nucleótidos modificados en 2'- F son YYY.

En una implementación, el N_a y/o N_b comprenden modificaciones de patrón alternante.

En una implementación, el motivo YYY se produce en o cerca del sitio de escisión de la cadena sentido. Por ejemplo, cuando el agente iRNA tiene una región dúplex de 17-23 nucleótidos de longitud, el motivo YYY puede aparecer en o cerca del sitio de escisión (e.g.: puede ocurrir en las posiciones 6, 7, 8, 7, 8, 9, 8, 9, 10, 9, 10, 11, 10, 11, 12 u 11, 12, 13) de la cadena sentido, el recuento que

comienza desde el primer nucleótido, desde el extremo 5'; u opcionalmente, el recuento comienza en el primer nucleótido apareado dentro de la región dúplex, desde el extremo 5'.

En una implementación, i es 1 y j es 0, o i es 0 y j es 1, o ambos i y j son 1. Por lo tanto, la cadena sentido se puede representar mediante las siguientes fórmulas:

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

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

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

Cuando la cadena sentido está representada por la fórmula (Ib), N_b representa una secuencia de oligonucleótidos que comprende 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 o 0 nucleótidos modificados. Cada N_a puede representar independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 2-20, 2-15 o 2-10 nucleótidos modificados.

Cuando la cadena sentido se representa como la fórmula (Ic), N_b representa una secuencia de oligonucleótidos que comprende 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 o 0 nucleótidos modificados. Cada N_a puede representar independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 2-20, 2-15, o 2-10 nucleótidos modificados.

Cuando la cadena sentido se representa como la fórmula (Id), cada N_b representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 o 0 nucleótidos modificados. Preferiblemente, N_b es 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6. Cada N_a puede representar independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 2-20, 2-15 o 2-10 nucleótidos modificados.

Cada uno de X, Y Z puede ser el mismo o diferente el uno del otro.

En otras implementaciones, i es 0 y j es 0, y la cadena sentido se puede representar por la fórmula:

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

Cuando la cadena sentido está representada por la fórmula (Ia), cada N_a puede representar independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 2-20, 2-15, o 2-10 nucleótidos modificados.

En una implementación, la secuencia de cadena antisentido del iRNA se puede representar por la fórmula (II):

5' $n_{q'}$-N_a′-(Z’Z′Z′)$_k$-N_b′-Y′Y′Y′-N_b′-(X′X′X′)$_l$-N′$_a$-n_p′ 3' (II)

donde:

k y l son cada uno independientemente 0 o 1;

p' y q' son cada uno independientemente 0-6;

cada N_a' representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 0-25 nucleótidos modificados, cada secuencia comprende al menos dos nucleótidos modificados de manera diferente;

cada N_b' representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 0-10 nucleótidos modificados;

cada n_p' y n_q' representan independientemente un nucleótido saliente;

en donde N_b' y Y' no tienen la misma modificación;

y

X'X'X', Y'Y'Y' y Z'Z'Z' representan cada uno independientemente un motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos.

En una implementación, el N_a' y/o N_b' comprenden modificaciones de patrón alternante.

El motivo Y'Y'Y' aparece en o cerca del sitio de escisión de la cadena antisentido. Por ejemplo, cuando el agente iRNA tiene una región dúplex de 17-23 nucleótidos de longitud, el motivo Y'Y'Y' puede aparecer en las posiciones 9, 10, 11, 10, 11, 12; 11, 12, 13; 12, 13, 14; o 13, 14, 15 de la cadena antisentido, con el recuento que comienza en el primer nucleótido, desde el extremo 5'; u opcionalmente, el recuento que comienza en el primer nucleótido apareado dentro

de la región dúplex, desde el extremo 5’. Preferiblemente, el motivo Y'Y'Y' aparece en las posiciones 11, 12, 13.

En una implementación, el motivo Y'Y'Y' son todos los nucleótidos modificados en 2'-OMe.

En una implementación, k es 1 y l es 0, o k es 0 y l es 1, o ambos k y l son 1.

La cadena antisentido por lo tanto se puede representar mediante las siguientes fórmulas:

5' $n_{q'}$-N_a′-Z′Z′Z′-N_b′-Y′Y′Y′-N_a′-$n_{p'}$ 3' (IIb);

5' $n_{q'}$-N_a′-Y′Y′Y′-N_b′-X′X′X′-$n_{p'}$ 3' (IIc); o

5' $n_{q'}$-N_a′- Z′Z′Z′-N_b′-Y′Y′Y′-N_b′- X′X′X′-N_a′-$n_{p'}$ 3' (IId).

Cuando la cadena antisentido está representada por la fórmula (IIb), N_b' representa una secuencia de oligonucleótidos que comprende 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 o 0 nucleótidos modificados. Cada Na’ representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 2-20, 2-15 o 2-10 nucleótidos modificados.

Cuando la cadena antisentido se representa como la fórmula (IIc), N_b' representa una secuencia de oligonucleótidos que comprende 0-10, 0-7, 0-10, 0-7,

0-5, 0-4, 0-2 o 0 nucleótidos modificados. Cada Na' representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 2-20, 2-15 o 2-10 nucleótidos modificados.

Cuando la cadena antisentido se representa como la fórmula (IId), cada N_b ' representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 o 0 nucleótidos modificados. Cada Na' representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 2-20, 2-15 o 2-10 nucleótidos modificados. Preferiblemente, N_b es 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

En otras implementaciones, k es 0 y l es 0 y la cadena antisentido se puede representar por la fórmula:

5' $n_{p'}$-$N_{a'}$-Y'Y'Y'- $N_{a'}$-$n_{q'}$ 3' (Ia).

Cuando la cadena antisentido se representa como la fórmula (IIa), cada Na' representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 2-20, 2-15 o 2-10 nucleótidos modificados.

Cada uno de X', Y' y Z' puede ser el mismo o diferente el uno del otro.

Cada nucleótido de la cadena sentido y de la cadena antisentido se puede modificar independientemente con LNA, HNA, CeNA, 2'-metoxietilo, 2'-O-metilo,

2'-O-alilo, 2'-C-alilo, 2'-hidroxilo, o 2'-flúor. Por ejemplo, cada nucleótido de la cadena sentido y de la cadena antisentido se modifica independientemente con 2'-O-metilo o 2'-flúor. Cada X, Y, Z, X', Y' y Z', en particular, pueden representar una modificación 2'-O-metilo o una modificación 2'-flúor.

En una implementación, la cadena sentido del agente iRNA puede contener un motivo YYY que aparece en las posiciones 9, 10 y 11 de la cadena cuando la región dúplex es 21 nt, comenzando el recuento desde el primer nucleótido en el el extremo 5’ u opcionalmente el recuento que comienza en el primer nucleótido apareado dentro de la región dúplex, desde el extremo 5’; y Y representa la modificación 2'-F. La cadena sentido puede contener adicionalmente motivo XXX o motivos ZZZ como modificaciones de ala en el extremo opuesto de la región dúplex; y XXX y ZZZ representan cada uno independientemente una modificación 2'-OMe o una modificación 2'-F.

En una implementación, la cadena antisentido puede contener el motivo Y’Y’Y’ que aparece en las posiciones 11, 12, 13 de la cadena, el recuento que comienza desde el primer nucleótido desde el extremo 5', u opcionalmente, el recuento que comienza en el 1er nucleótido apareado dentro de la región dúplex, desde el extremo 5’; y Y’ representa la modificación 2'-O-metilo. La cadena antisentido puede contener adicionalmente el motivo X'X'X' o los motivos Z'Z'Z' como modificaciones de ala en el extremo opuesto de la región dúplex; y X'X'X' y

Z'Z'Z' representan cada uno independientemente una modificación 2'-OMe o una modificación 2'-F.

La cadena sentido representada por cualquiera de las fórmulas anteriores (Ia), (Ib), (Ic) y (Id) anteriores forma un dúplex con una cadena antisentido representada por cualquiera de las fórmulas (IIa), (IIb), (IIc) y (IId), respectivamente.

Por consiguiente, los agentes iRNA para uso en los métodos de la invención pueden comprender una cadena sentido y una cadena antisentido, teniendo cada cadena de 14 a 30 nucleótidos, el dúplex iRNA representado por la fórmula (III):

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

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

(III)

donde:

i, j, k y l son cada una independientemente 0 o 1;

p, p', q y q' son cada una independientemente 0-6;

cada N_a y N_a' representan independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 0-25 nucleótidos modificados, cada secuencia comprende al menos dos nucleótidos modificados de forma diferente;

cada N_b y N_b' representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 0-10 nucleótidos modificados;

donde

cada n_p', n_p, n_q' y n_q, cada uno de los cuales puede estar presente o no, representan independientemente un nucleótido saliente; y

XXX, YYY, ZZZ, X'X'X', Y'Y'Y' y Z'Z'Z' representan cada uno independientemente un motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos.

En una implementación, i es 0 y j es 0; o i es 1 y j es 0; o i es 0 y j es 1; o ambos i y j son 0; o ambos i y j son 1. En otra implementación, k es 0 y l es 0; o k es 1 y l es 0; k es 0 y l es 1; o ambos k y l son 0; o ambos k y l son 1.

Las combinaciones de ejemplo de la cadena sentido y de la cadena antisentido que forman un dúplex iRNA incluyen las siguientes fórmulas:

5' n_p - N_a -Y Y Y -N_a-n_q 3'

3' n_p'-N_a'-Y′Y′Y′ -$N_a'$$n_q'$ 5'

(IIIa)

5' n_p -N_a -Y Y Y -N_b -Z Z Z -N_a-n_q 3'

3' n_p'-N_a'-Y′Y′Y′-N_b'-Z′Z′Z′-$N_a'$$n_q'$ 5'

(IIIb)

5' n_p-N_a- X X X -N_b -Y Y Y - N_a-n_q 3'

3' n_p'-N_a'-X′X′X′-N_b'-Y′Y′Y′-N_a'-n_q' 5'

(IIIc)

5' n_p -N_a -X X X -N_b-Y Y Y -N_b- Z Z Z -N_a-n_q 3'

3' n_p'-N_a'-X′X′X′-N_b'-Y′Y′Y′-N_b'-Z′Z′Z′-N_a-n_q' 5'

(IIId)

5' - N_a -Y Y Y -N_a- 3'

3' n_p'-N_a'-Y′Y′Y′ -N_a' 5'

(IIIe)

Cuando el agente iRNA está representado por la fórmula (IIIa), cada N_a representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 2-20, 2-15 o 2-10 nucleótidos modificados.

Cuando el agente iRNA está representado por la fórmula (IIIb), cada N_b representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 1-10, 1-7, 1-5 o 1-4 nucleótidos modificados. Cada N_a representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 2-20, 2-15 o 2-10 nucleótidos modificados.

Cuando el agente iRNA se representa como la fórmula (IIIc), cada N_b, N_b' representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 o 0 nucleótidos modificados. Cada N_a representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 2-20, 2-15 o 2-10 nucleótidos modificados.

Cuando el agente iRNA se representa como la fórmula (IIId), cada N_b, N_b' representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que

comprende 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 o 0 nucleótidos modificados. Cada N_a, N_a' representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 2-20, 2-15, o 2-10 nucleótidos modificados. Cada uno de N_a, N_a', N_b y N_b ' comprenden independientemente modificaciones de patrón alternante.

Cuando el agente iRNA se representa como la fórmula (IIId), cada N_b, N_b' representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 o 0 nucleótidos modificados. Cada Na, Na' representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 2-20, 2-15, o 2-10 nucleótidos modificados. Cada uno de N_a, N_a', N_b y N_b ' comprende independientemente modificaciones de patrón alternante.

Cuando el agente iRNA se representa como la fórmula (IIIe), cada N_a y N_a' representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 0-25 nucleótidos que están modificados o no modificados o combinaciones de los mismos, cada secuencia comprende al menos dos nucleótidos modificados de forma diferente.

Cada uno de X, Y y Z en las fórmulas (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc), (IIId) y (IIIe) pueden ser iguales o diferentes entre sí.

Cuando el agente iRNA está representado por la fórmula (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc), (IIId) y (IIIe), al menos uno de los nucleótidos Y puede formar un par de

bases con uno de los nucleótidos Y'. Alternativamente, al menos dos de los nucleótidos Y forman pares de bases con los correspondientes nucleótidos Y'; o los tres nucleótidos Y forman todos pares de bases con los correspondientes nucleótidos Y'.

Cuando el agente iRNA está representado por la fórmula (IIIb) o (IIId), al menos uno de los nucleótidos Z puede formar un par de bases con uno de los nucleótidos Z'. Alternativamente, al menos dos de los nucleótidos Z forman pares de bases con los correspondientes nucleótidos Z'; o los tres nucleótidos Z forman todos pares de bases con los correspondientes nucleótidos Z'.

Cuando el agente iRNA se representa como la fórmula (IIIc) o (IIId), al menos uno de los nucleótidos X puede formar un par de bases con uno de los nucleótidos X'. Alternativamente, al menos dos de los nucleótidos X forman pares de bases con los correspondientes nucleótidos X'; o los tres nucleótidos X forman todos pares de bases con los correspondientes nucleótidos X'.

En una implementación, la modificación en el nucleótido Y es diferente de la modificación en el nucleótido Y', la modificación en el nucleótido Z es diferente de la modificación en el nucleótido Z', y/o la modificación en el nucleótido X es diferente de la modificación en el nucleótido X'.

En una implementación, cuando el agente iRNA está representado por la fórmula (IIId), las modificaciones de N_a son modificaciones 2'-O-metilo o 2'-flúor.

En otra implementación, cuando el agente iRNA está representado por la fórmula (IIId), las modificaciones de N_a son modificaciones 2'-O-metilo o 2'-flúor y $n_p' > 0$ y al menos un n_p' está unido a un nucleótido vecino mediante un enlace fosforotioato. En otra implementación más, cuando el agente iRNA está representado por la fórmula (IIId), las modificaciones de N_a son modificaciones 2'-O-metilo o 2'-flúor, $n_p' > 0$ y al menos un n_p está unido a un nucleótido vecino mediante un enlace de fosforotioato, y la cadena sentido está conjugada a uno o más derivados GalNAc unidos a través de un enlazador ramificado monovalente, bivalente o trivalente. En otra implementación, cuando el agente iRNA está representado por la fórmula (IIId), las modificaciones de N_a son modificaciones 2'-O-metilo o 2'-flúor, $n_p' > 0$ y al menos un n_p' está unido a un nucleótido vecino mediante un enlace fosforotioato, la cadena sentido comprende al menos un enlace fosforotioato, y la cadena sentido está conjugada con uno o más derivados GalNAc unidos a través de un enlazador ramificado monovalente, bivalente o trivalente.

En una implementación, cuando el agente iRNA está representado por la fórmula (IIIa), las modificaciones de N_a son modificaciones 2'-O-metilo o 2'-flúor, $n_p' > 0$ y al menos un n_p' está unido a un nucleótido vecino mediante un enlace fosforotioato, la cadena sentido comprende al menos un enlace fosforotioato, y la cadena sentido está conjugada con uno o más derivados GalNAc unidos a través de un enlazador ramificado monovalente, bivalente o trivalente.

En una implementación, el agente iRNA es un multímero que contiene al menos dos dúplex representados por la fórmula (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc), (IIId) y (IIIe), en donde los dúplex están conectados por un enlazador. El enlazador puede ser escindible o no escindible. Opcionalmente, el multímero comprende además un ligando. Cada uno de los dúplex puede tener como objetivo el mismo gen o dos genes diferentes; o cada uno de los dúplex puede apuntar al mismo gen en dos sitios objetivo diferentes.

En una implementación, el agente iRNA es un multímero que contiene tres, cuatro, cinco, seis o más dúplex representados por la fórmula (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc), (IIId) y (IIIe), en donde los dúplex están conectados por un enlazador. El enlazador puede ser escindible o no escindible. Opcionalmente, el multímero comprende además un ligando. Cada uno de los dúplex puede tener como objetivo el mismo gen o dos genes diferentes; o cada uno de los dúplex puede apuntar al mismo gen en dos sitios objetivo diferentes.

En una implementación, dos agentes iRNA representados por la fórmula (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc), (IIId) y (IIIe) están unidos entre sí en el extremo 5’, y uno o ambos de los extremos 3' y están opcionalmente conjugados a un ligando. Cada uno de los agentes puede apuntar al mismo gen o a dos genes diferentes; o cada uno de los agentes puede dirigirse al mismo gen en dos sitios objeto diferentes.

Diversas publicaciones describen agentes iRNA multiméricos que se pueden usar en los métodos de la invención. Dichas publicaciones incluyen los documentos WO2007/091269, Patentes de Estados Unidos 7858769, WO2010/141511, WO2007/117686, WO2009/014887 y WO2011/031520, cuyos contenidos completos se incorporan aquí como referencia.

El agente iRNA que contiene conjugaciones de uno o más restos de carbohidrato con un agente iRNA puede optimizar una o más propiedades del agente iRNA. En muchos casos, el resto de carbohidrato se unirá a una subunidad modificada del agente iRNA. Por ejemplo, el azúcar ribosa de una o más subunidades de ribonucleótidos de un agente dsRNA se puede reemplazar con otro resto, e.g., un vehículo no carbohidrato (preferiblemente cíclico) al que está unido un ligando de carbohidrato. Una subunidad de ribonucleótido en la que el azúcar ribosa de la subunidad se ha reemplazado de esta manera se denomina en el presente documento subunidad de modificación de sustitución de ribosa (RRMS). Un vehículo cíclico puede ser un sistema de anillo carbocíclico, i.e., todos los átomos del anillo son átomos de carbono, o un sistema de anillo heterocíclico, i.e., uno o más átomos del anillo pueden ser un heteroátomo, e.g., nitrógeno, oxígeno, azufre. El vehículo cíclico puede ser un sistema de anillo monocíclico, o puede contener dos o más anillos, e.g., anillos fusionados. El vehículo cíclico puede ser un sistema de anillo totalmente saturado, o puede contener uno o más dobles enlaces.

El ligando se pueden unir al polinucleótido a través de un vehículo. Los vehículos incluyen (i) al menos un "punto de unión de estructura principal", preferiblemente dos "puntos de unión de estructura" y (ii) al menos un "punto de unión de anclaje". Un "punto de unión de estructura" como se usa en el presente documento se refiere a un grupo funcional, e.g., un grupo hidroxilo, o en general, un enlace disponible para, y que es adecuado para la incorporación del vehículo en la cadena principal, e.g., el fosfato o fosfato modificado, e.g., azufre que contiene, cadena principal, de un ácido ribonucleico. Un "punto de unión de anclaje" (TAP) en algunas implementaciones se refiere a un átomo de anillo constituyente del vehículo cíclico, e.g., un átomo de carbono o un heteroátomo (distinto de un átomo que proporciona un punto de unión de estructura principal), que conecta un resto seleccionado. El resto puede ser, e.g., un carbohidrato, e.g., monosacárido, disacárido, trisacárido, tetrasacárido, oligosacárido y polisacárido. Opcionalmente, el resto seleccionado se conecta mediante una atadura intermedia al vehículo cíclico. Por lo tanto, el vehículo cíclico incluirá a menudo un grupo funcional, e.g., un grupo amino, o en general, proporciona un enlace, que es adecuado para la incorporación o el anclaje de otra entidad química, e.g., un ligando al anillo constituyente.

Los agentes iRNA se pueden conjugar con un ligando a través de un vehículo, en donde el vehículo puede ser un grupo cíclico o un grupo acíclico; preferiblemente, el grupo cíclico se selecciona de pirrolidinilo, pirazolinilo, pirazolidinilo, imidazolinilo, imidazolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, [1,3] dioxolano,

oxazolidinilo, isoxazolidinilo, morfolinilo, tiazolidinilo, isotiazolidinilo, quinoxalinilo, piridazinonilo, tetrahidrofurilo y decalina; preferiblemente, el grupo acíclico se selecciona de la cadena principal de serinol o la cadena principal de dietanolamina.

En ciertas implementaciones específicas, el agente iRNA para uso en los métodos de la invención es AD-57213 (cadena sentido: 5'-GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf-3 '(SEC ID NO: 13) y cadena antisentido: 5'-usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg-3' (SEQ ID NO: 14), en donde A, C, G y U son ribosa A, C, G o U; a, c, g, y u son 2'-O-metil (2'-OMe) A, C, G, o U; Af, Cf, Gf o Uf son 2'-flúor A, C, G o U; y s es un enlace fosforotioato.

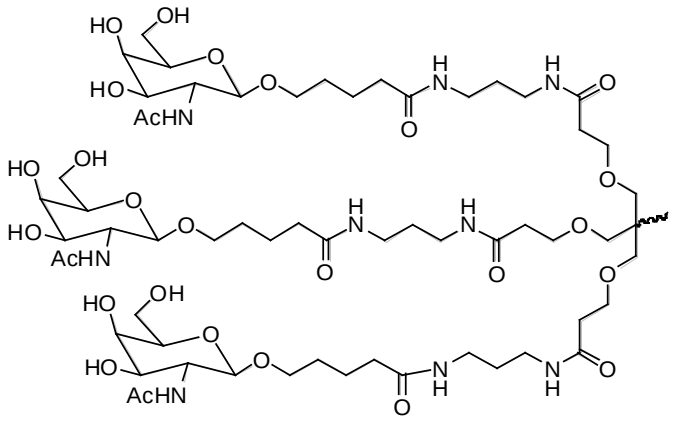
Estos agentes pueden comprender además un ligando.

Ligandos

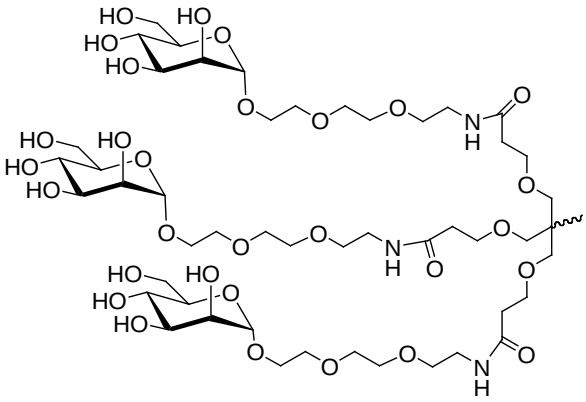
Los agentes RNA bicatenario (dsRNA) de la invención se pueden conjugar opcionalmente con uno o más ligandos. El ligando se puede unir a la cadena sentido, cadena antisentido o a ambas cadenas, en el extremo 3', en el extremo 5' o en ambos extremos. Por ejemplo, el ligando se puede conjugar con la cadena sentido. En implementaciones preferidas, el ligando se conjuga con el extremo 3' de la cadena sentido.

En una implementación, el ligando es un conjugado de carbohidrato, tal como un monosacárido. En una implementación, el ligando es un derivado de N-acetilgalactosamina (GalNAc) GalNAc o derivado de GalNAc. En ciertas implementaciones de la invención, el GalNAc o derivado de GalNAc se une a un agente iRNA de la invención a través de un enlazador monovalente. En algunas implementaciones, el GalNAc o derivado de GalNAc se une a un agente iRNA de la invención a través de un enlazador bivalente. En otras implementaciones más de la invención, el GalNAc o derivado de GalNAc se une a un agente iRNA de la invención a través de un enlazador trivalente.

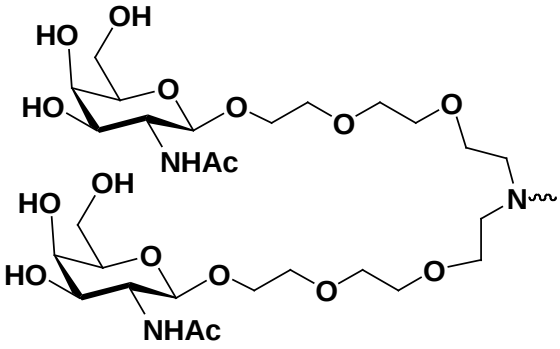
En una implementación, un conjugado de carbohidrato para uso en las composiciones y métodos de la invención se selecciona del grupo que consiste en:



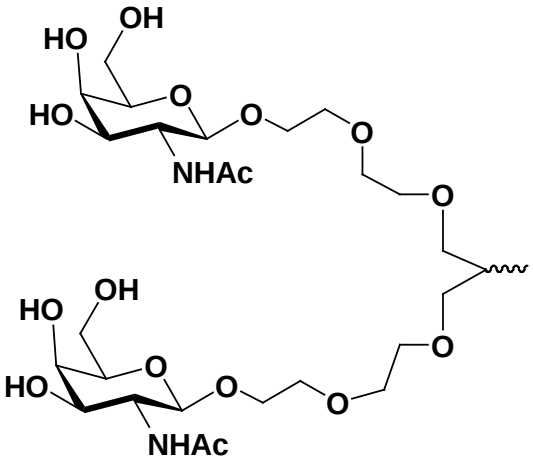
Formula II,



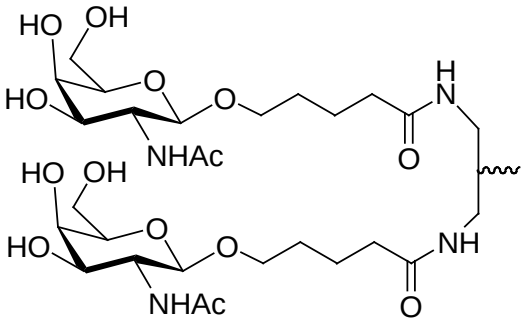
Formula III,



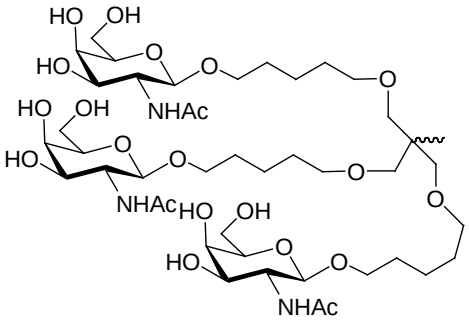
Formula IV,



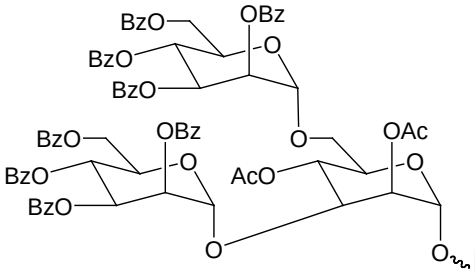
Formula V,



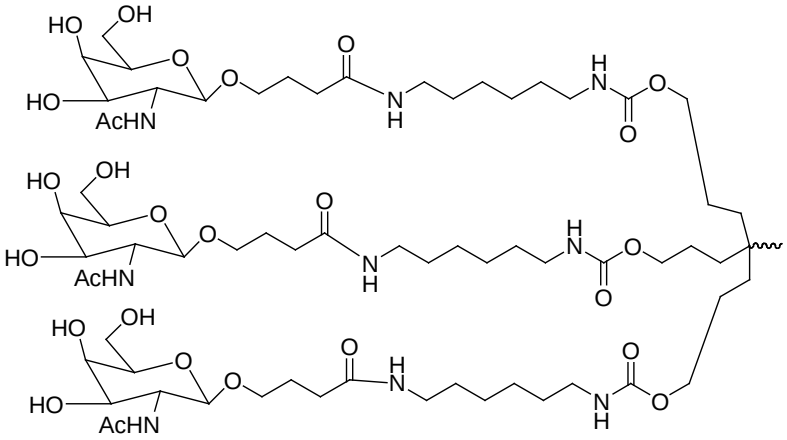
Formula VI,



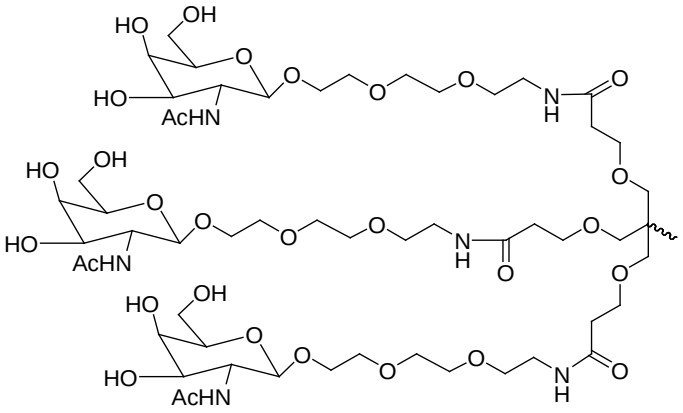
Formula VII,



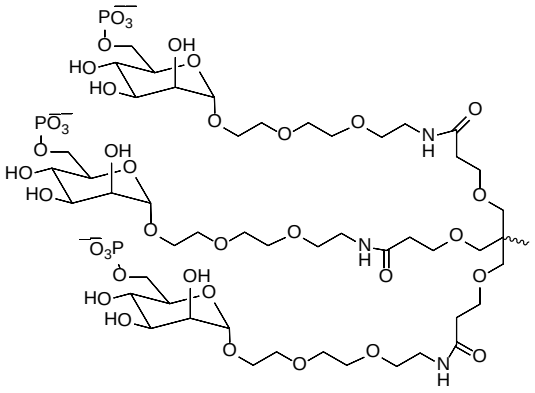
Formula VIII,



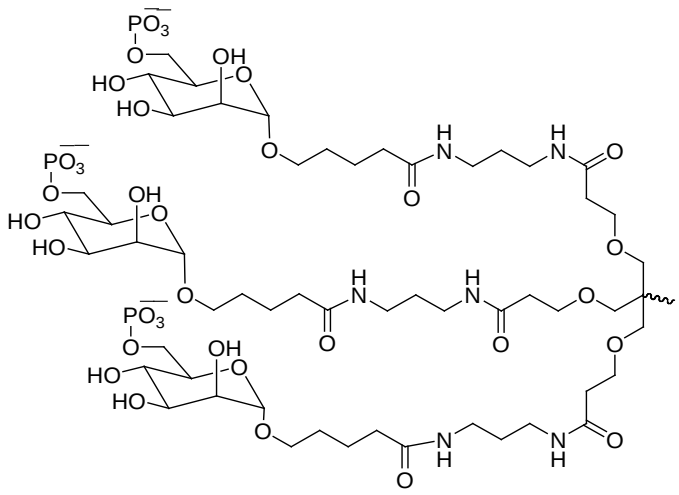
Formula IX,



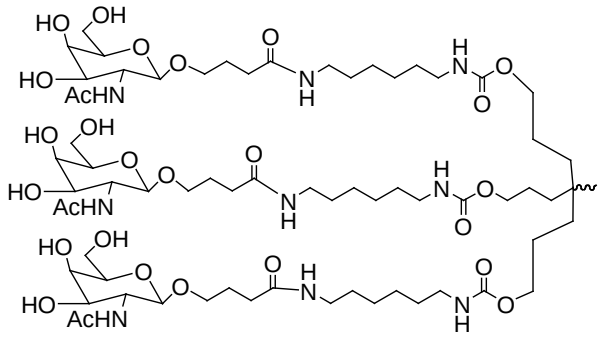
Formula X,



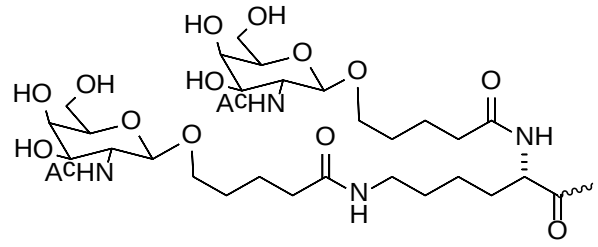
Formula XI,



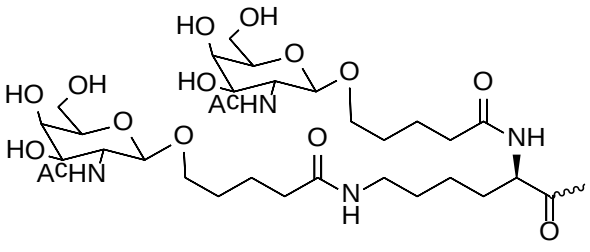
Formula XII,



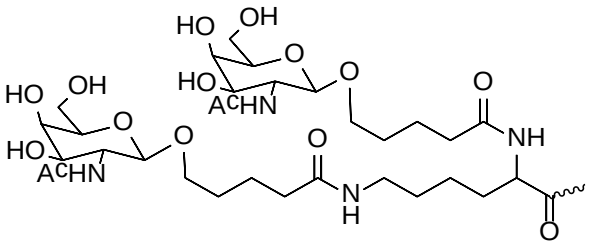
Formula XIII,



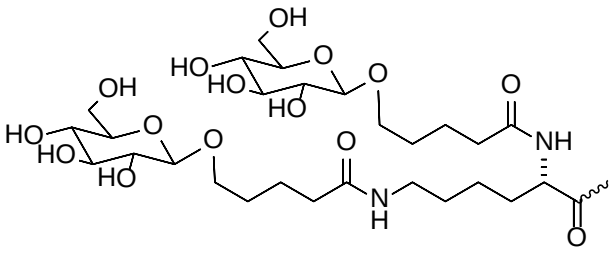
Formula XIV,



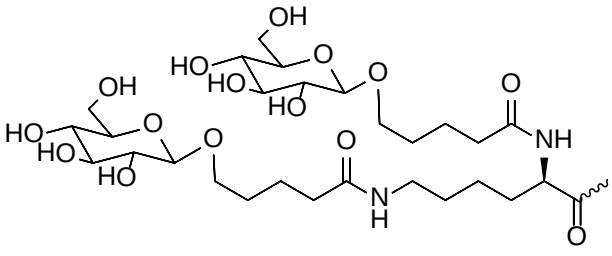
Formula XV,



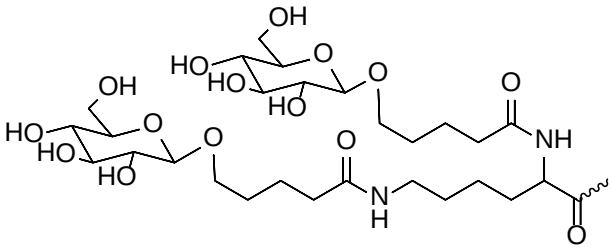
Formula XVI,



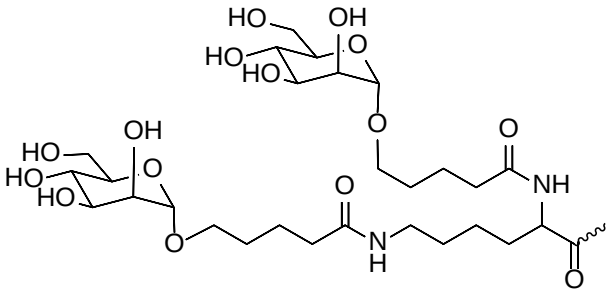
Formula XVII,



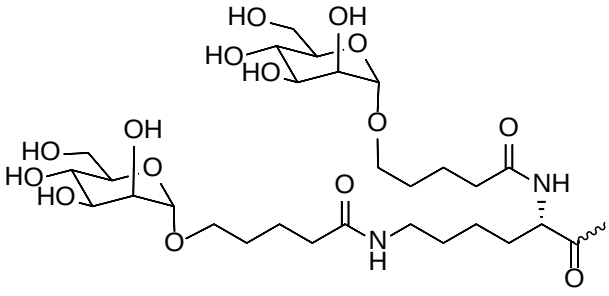
Formula XVIII,



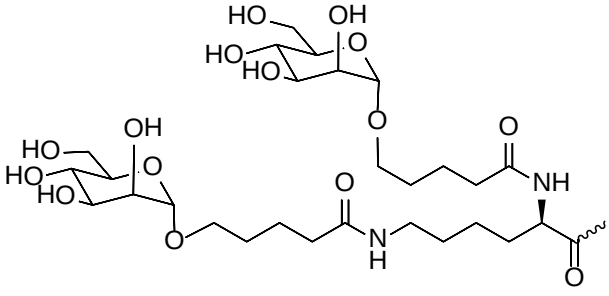
Formula XIX,



Formula XX,

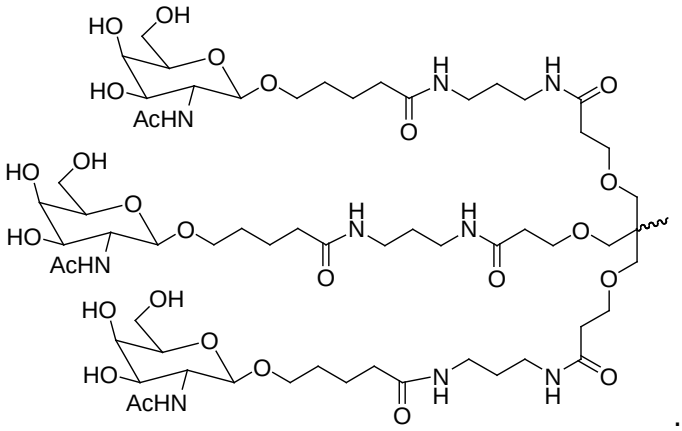


Formula XXI,

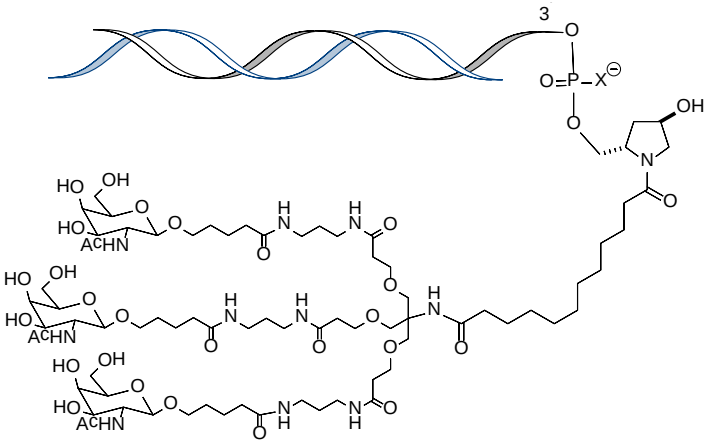


Formula XXII.

En una implementación, el GalNAc o un derivado de GalNAc es $GalNAc_3$:



En algunas implementaciones, el ligando, e.g., ligando GalNAc está unido al extremo 3' del agente iRNA. En una implementación, el agente iRNA está conjugado con el ligando, e.g., ligando GalNAc, como se muestra en el siguiente esquema



en donde X es O o S. En una implementación, X es O.

Se puede acoplar una amplia variedad de entidades a los agentes iRNA de la presente invención. Los restos preferidos son ligandos, que se acoplan, preferiblemente de manera covalente, directa o indirectamente a través de un enlace intermedio.

En implementaciones preferidas, un ligando altera la distribución, el direccionamiento o el tiempo de vida de la molécula en la que se incorpora. En implementaciones preferidas, un ligando proporciona una afinidad mejorada para un objetivo seleccionado, e.g., molécula, célula o tipo de célula, compartimento , receptor, e.g., un comportamiento celular u órgano, tejido, órgano o región del cuerpo, como, e.g., en comparación con una especie donde está ausente tal ligando. Los ligandos que proporcionan una afinidad mejorada para un objetivo seleccionado también se denominan ligandos de direccionamiento.

Algunos ligandos pueden tener propiedades endosomolíticas. Los ligandos endosomolíticos promueven la lisis del endosoma y/o el transporte de la composición de la invención, o sus componentes, desde el endosoma hasta el citoplasma de la célula. El ligando endosomolítico puede ser un péptido polianiónico o peptidomimético que muestra actividad de membrana y fusogenicidad dependientes del pH. En una implementación, el ligando endosomolítico asume su conformación activa a pH endosómico. La conformación "activa" es aquella conformación en la que el ligando endosomolítico promueve la lisis del endosoma y/o el transporte de la composición de la invención, o sus

componentes, desde el endosoma hasta el citoplasma de la célula. Los ligandos endosomolíticos de ejemplo incluyen el péptido GALA (Subbarao *et al., Biochemistry*, 1987, 26: 2964-2972), el péptido EALA (Vogel *et al., J. Am. Chem. Soc*., 1996, 118: 1581-1586) y sus derivados (Turk *et al., Biochem. Biophys. Acta*, 2002, 1559: 56-68). En una implementación, el componente endosomolítico puede contener un grupo químico (e.g., un aminoácido) que experimentará un cambio en la carga o protonación en respuesta a un cambio en el pH. El componente endosomolítico puede ser lineal o ramificado.

Los ligandos pueden mejorar las propiedades de transporte, hibridación y especificidad y también pueden mejorar la resistencia a la nucleasa del oligorribonucleótido natural o modificado resultante, o una molécula polimérica que comprende cualquier combinación de monómeros descritos en el presente documento y/o ribonucleótidos naturales o modificados.

Los ligandos en general pueden incluir modificadores terapéuticos, e.g., para mejorar la captación; compuestos de diagnóstico o grupos informadores, e.g., para monitorear la distribución; agentes de reticulación; y restos que confieren resistencia a nucleasas. Los ejemplos generales incluyen lípidos, esteroides, vitaminas, azúcares, proteínas, péptidos, poliaminas y péptidos miméticos.

Los ligandos pueden incluir una sustancia de ocurrencia natural, tal como una proteína (e.g., albúmina de suero humano (HSA), lipoproteína de baja

densidad (LDL), lipoproteína de alta densidad (HDL) o globulina); un carbohidrato (e.g., un dextrano, pululano, quitina, quitosano, inulina, ciclodextrina o ácido hialurónico); o un lípido. El ligando también puede ser una molécula recombinante o sintética, tal como un polímero sintético, e.g., un poliaminoácido sintético, un oligonucleótido (e.g., un aptámero). Ejemplos de poliaminoácidos incluyen el poliaminoácido que es una polilisina (PLL), ácido poli L aspártico, ácido poli L-glutámico, copolímero anhídrido de ácido estireno-maleico, copolímero poli (L-lactido-co-glicolido), copolímero divinil éter-anhídrido maleico, copolímero de N-(2-hidroxipropil) metacrilamida (HMPA), polietilenglicol (PEG), polivinil alcohol (PVA), poliuretano, poli (ácido 2-etilacrílico), polímeros de N-isopropilacrilamida o polifosfazina. Ejemplo de poliaminas incluyen: polietilenimina, polilisina (PLL), espermina, espermidina, poliamina, pseudopeptido-poliamina, peptidomimético poliamina, dendrímero poliamina, arginina, amidina, protamina, lípido catiónico, porfirina catiónica, sal cuaternaria de una poliamina o péptido alfa hélice.

Los ligandos también pueden incluir grupos de direccionamiento, e.g., un agente dirigido a células o tejidos, e.g., una lectina, glicoproteína, lípido o proteína, e.g., un anticuerpo, que se une a un tipo celular específico, como una célula renal. Un grupo objetivo puede ser una tirotropina, melanotropina, lectina, glicoproteína, proteína surfactante A, carbohidrato de mucina, lactosa multivalente, galactosa multivalente, N-acetil-galactosamina, manosa multivalente N-acetil-gulucosamina, fucosa multivalente, poliaminoácidos glicosilados, galactosa multivalente, transferrina, bisfosfonato, poliglutamato, poliasParteato, lípido, colesterol,

esteroide, ácido biliar, ácido fólico, vitamina B12, biotina, péptido RGD, péptido RGD mimético o un aptámero.

Otros ejemplos de ligandos incluyen colorantes, agentes intercaladores (e.g., acridinas), reticulantes (e.g., psoraleno, mitomicina C), porfirinas (TPPC4, texafirina, sapfirina), hidrocarburos aromáticos policíclicos (e.g., fenazina, dihidrofenazina), endonucleasas artificiales o un quelante (e.g., EDTA), moléculas lipofílicas, e.g., colesterol, ácido cólico, adamantano, ácido acético, ácido 1-pireno butírico, dihidrotestosterona, 1,3-Bis-O (hexadecil) glicerol, grupo geraniloxihexilo, hexadecilglicerol, borneol, mentol, 1,3-propanodiol, grupo heptadecilo, ácido palmítico, ácido mirístico, ácido O3-(oleoil) litocólico, ácido O3-(oleoil) colénico, dimetoxitritilo o fenoxazina) y conjugados peptídicos (e.g., péptido antenapedia, péptido Tat), agentes alquilantes, fosfato, amino, mercapto, PEG (e.g., PEG- 40K), MPEG, [MPEG]2, poliamino, alquilo, alquilo sustituido, marcadores radiomarcados, enzimas, haptenos (e.g., Biotina), facilitadores de transporte/absorción (e.g., Aspirina, vitamina E, ácido fólico), ribonucleasas sintéticas (e.g., imidazol, bisimidazol, histamina, grupos (clusters) de imidazol, conjugados de acridina-imidazol, complejos Eu3 + de tetraazamacrociclos), dinitrofenilo, HRP o AP.

Los ligandos pueden ser proteínas, e.g., glicoproteínas, o péptidos, e.g., moléculas que tienen una afinidad específica por un co-ligando, o anticuerpos, e.g., un anticuerpo, que se une a un tipo celular específico, como una célula cancerosa, una célula endotelial o una célula ósea. Los ligandos también pueden

incluir hormonas y receptores de hormonas. También pueden incluir especies no peptídicas, tales como lípidos, lectinas, carbohidratos, vitaminas, cofactores, lactosa multivalente, galactosa multivalente, N-acetil-galactosamina, manosa multivalente N-acetil-gulucosamina, fucosa multivalente o aptámeros. El ligando puede ser, por ejemplo, un lipopolisacárido, un activador de p38 MAP quinasa o un activador de NF-κB.

El ligando puede ser una sustancia, e.g., un fármaco, que puede aumentar la captación del agente iRNA en la célula, e.g., al alterar el citoesqueleto de la célula, e.g., al alterar los microtúbulos, microfilamentos y/o filamentos intermedios de la célula. El medicamento puede ser, por ejemplo, taxón, vincristina, vinblastina, citocalasina, nocodazol, japlaquinolida, latrunculina A, faloidina, swinholide A, indanocina o mioservina.

El ligando puede aumentar la absorción del oligonucleótido en la célula, por ejemplo, activando una respuesta inflamatoria. Los ligandos de ejemplo que tendrían tal efecto incluyen el factor de necrosis tumoral alfa (TNFalfa), la interleuquina-1 beta o el interferón gamma.

En un aspecto, el ligando es un lípido o una molécula basada en lípidos. Dicho lípido o molécula basada en lípidos se une preferentemente a una proteína sérica, e.g., albúmina sérica humana (HSA). Un ligando de unión a HSA permite la distribución del conjugado a un tejido objetivo, e.g., un tejido objetivo no renal del

cuerpo. Por ejemplo, el tejido objetivo puede ser el hígado, incluidas las células parenquimatosas del hígado. Otras moléculas que se pueden unir a HSA también se pueden usar como ligandos. Por ejemplo, se puede usar naproxeno o aspirina. Un ligando lípido o basado en lípidos puede (a) aumentar la resistencia a la degradación del conjugado, (b) aumentar el objetivo o transporte a una membrana celular o célula objetivo, y/o (c) se puede usar para ajustar la unión a una proteína sérica e.g., HSA.

Se puede usar un ligando basado en lípidos para modular, e.g., controlar la unión del conjugado a un tejido objetivo. Por ejemplo, un ligando lípido o basado en lípidos que se une a HSA con mayor fuerza tendrá menos probabilidades de dirigirse al riñón y, por lo tanto, es menos probable que sea eliminado del cuerpo. Un ligando lípido o basado en lípidos que se une a HSA con menos fuerza se puede usar para dirigir el conjugado al riñón.

En una implementación preferida, el ligando basado en lípidos se une a HSA. Preferiblemente, se une a HSA con una afinidad suficiente para que el conjugado se distribuya preferiblemente a un tejido no renal. Sin embargo, se prefiere que la afinidad no sea tan fuerte como para que la unión de HSA-ligando no se pueda revertir.

En otra implementación preferida, el ligando basado en lípidos se une a HSA débilmente o no lo hace en absoluto, de modo que el conjugado se distribuirá

preferiblemente al riñón. Otros restos que se dirigen a las células renales también se pueden usar en lugar de o en adicion a el ligando basado en lípidos.

En otro aspecto, el ligando es un resto, e.g., una vitamina, que es absorbida por una célula objetivo, e.g., una célula en proliferación. Estos son particularmente útiles para tratar trastornos caracterizados por proliferación celular no deseada, e.g., del tipo maligno o no maligno, e.g., Células cancerígenas. Las vitaminas a modo de ejemplo incluyen vitamina A, E y K. Otras vitaminas de ejemplo incluyen vitaminas B, e.g., ácido fólico, B12, riboflavina, biotina, piridoxal u otras vitaminas o nutrientes absorbidos por las células cancerosas. También se incluyen HAS, lipoproteína de baja densidad (LDL) y lipoproteína de alta densidad (HDL).

En otro aspecto, el ligando es un agente de permeación celular, preferiblemente un agente de permeación celular helicoidal. Preferiblemente, el agente es anfipático. Un agente de ejemplo es un péptido tal como tat o antennopedia. Si el agente es un péptido, se puede modificar, incluyendo un enlace peptidilimimético, invertómero, no péptido o pseudopéptido, y el uso de D-aminoácidos. El agente helicoidal es preferiblemente un agente alfa-helicoidal, que preferiblemente tiene una fase lipofílica y una lipofóbica.

El ligando puede ser un péptido o peptidomimético. Un peptidomimético (también referido aquí como un oligopeptidomimético) es una molécula capaz de plegarse en una estructura tridimensional definida similar a un péptido natural. El

péptido o resto peptidomimético puede tener aproximadamente 5-50 aminoácidos de longitud, e.g., aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 aminoácidos de longitud. Un péptido o peptidomimético puede ser, por ejemplo, un péptido de permeación celular, péptido catiónico, péptido anfipático o péptido hidrófobo (e.g., que consiste principalmente en Tyr, Trp o Phe). El resto peptídico puede ser un péptido dendrímero, un péptido restringido o un péptido reticulado. En otra alternativa, el resto peptídico puede incluir una secuencia de translocación de membrana hidrófoba (MTS). Un péptido hidrofóbico de ejemplo que contiene MTS es RFGF que tiene la secuencia de aminoácidos AAVALLPAVLLALLAP (SEQ ID NO: 9). Un análogo de RFGF (*e.g.* secuencia de aminoácidos AALLPVLLAAP (SEQ ID NO: 10)) que contiene un MTS hidrofóbico también puede ser un resto de direccionamiento. El resto peptídico puede ser un péptido de "entrega", que puede transportar moléculas polares grandes que incluyen péptidos, oligonucleótidos y proteínas a través de las membranas celulares. Por ejemplo, se ha encontrado que, las secuencias de la proteína Tat de HIV (GRKKRRQRRRPPQ (SEQ ID NO: 11)) y la proteína Drosophila Antennapedia (RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO: 12)) son capaces de funcionar como péptidos de administración. Un péptido o peptidomimético se puede codificar mediante una secuencia aleatoria de DNA, tal como un péptido identificado a partir de una biblioteca de presentación en fago, o una biblioteca combinatoria de un solo glóbulo (OBOC) (Lam *et al., Nature*, 354: 82-84, 1991). Preferiblemente, el péptido o peptidomimético unido a un agente iRNA a través de una unidad monomérica incorporada es un péptido dirigido a células tal como un péptido de

arginina-glicina-ácido aspártico (RGD)-péptido, o RGD imitador. Un resto peptídico puede variar en longitud desde aproximadamente 5 aminoácidos hasta aproximadamente 40 aminoácidos. Los restos peptídicos pueden tener una modificación estructural, tal como para aumentar la estabilidad o las propiedades conformacionales directas. Se puede utilizar cualquiera de las modificaciones estructurales descritas a continuación. Se puede usar un resto peptídico RGD para dirigirse a una célula tumoral, tal como una célula tumoral endotelial o una célula tumoral de cáncer de mama (Zitzmann *et al., Cancer Res*., 62: 5139-43, 2002). Un péptido RGD puede facilitar el direccionamiento de un agente iRNA a tumores de una variedad de otros tejidos, incluyendo el pulmón, el riñón, el bazo o el hígado (Aoki *et al., Cancer Gene Therapy* 8: 783-787, 2001). Preferiblemente, el péptido RGD facilitará el direccionamiento de un agente iRNA al riñón. El péptido RGD puede ser lineal o cíclico, y se puede modificar, e.g., glicosilado o metilado para facilitar la orientación a tejidos específicos. Por ejemplo, un péptido RGD glicosilado puede administrar un agente iRNA a un tumor que expresa una célula de $\alpha_V\beta_3$ (Haubner *et al., Jour. Nucl. Med.,* 42: 326-336, 2001). Se pueden usar péptidos que se dirigen a marcadores enriquecidos en células en proliferación. Por ejemplo, los péptidos y peptidomiméticos que contienen RGD se pueden dirigir a las células cancerosas, en particular las células que exhiben una integrina. Por lo tanto, se podrían usar péptidos RGD, péptidos cíclicos que contienen RGD, péptidos RGD que incluyen D-aminoácidos, así como imitaciones de RGD sintéticas. Además de RGD, se pueden usar otros restos que se dirigen al ligando de integrina. En general, dichos ligandos se pueden usar para controlar células

proliferativas y angiogenesis. Los conjugados preferidos de este tipo de ligando se dirigen a PECAM-1, VEGF u otro gen de cáncer, e.g., un gen de cáncer descrito en este documento.

Un "péptido de permeación celular" es capaz de atravesar una célula, e.g., una célula microbiana, tal como una célula bacteriana o fúngica, o una célula de mamífero, tal como una célula humana. Un péptido que permeabiliza las células microbianas puede ser, por ejemplo, un péptido lineal α-helicoidal (e.g., LL-37 o Ceropin P1), un péptido que contiene un enlace disulfuro (e.g., α-defensina, β-defensina o bactenecina) o un péptido que contiene solo uno o dos aminoácidos dominantes (e.g., PR-39 o indolicidina). Un péptido de permeación celular también puede incluir una señal de localización nuclear (NLS). Por ejemplo, un péptido de permeación celular puede ser un péptido anfipático biParteito, tal como MPG, que se deriva del dominio peptídico de fusión de HIV-1 gp41 y el NLS del antígeno T SV40 grande (Simeoni *et al., Nucl. Acids Res*. 31: 2717 - 2724, 2003).

En una implementación, un péptido de dirección puede ser un péptido α-helicoidal anfipático. Ejemplos de péptidos α-helicoidales anfipáticos incluyen, pero no se limitan a, cecropinas, licotoxinas, paradaxinas, buforina, CPF, péptido similar a bombinina (BLP), catelicidinas, ceratotoxinas, péptidos de S. clava, péptidos antimicrobianos intestinales de hagfish (HFIAP), magaininas, brevininas-2, dermaseptinas, melittinas, pleurocidina, péptidos H_2A, péptidos de Xenopus, esculentinis-1 y ceréninas. Preferentemente se considerarán varios factores para

mantener la integridad de la estabilidad de la hélice. Por ejemplo, se utilizará un número máximo de residuos de estabilización de hélice (e.g., leu, ala o lys) y se utilizarán un número mínimo de residuos de desestabilización de hélice (e.g., prolina o unidades monoméricas cíclicas. Se considerará el residuo de recubrimiento (e.g. Gly es un residuo de N-recubrimiento de ejemplo y/o se puede usar amidación C-terminal para proporcionar un enlace H adicional para estabilizar la hélice. La formación de puentes de sal entre residuos con cargas opuestas, separados por i ± 3, o i ± 4 posiciones pueden proporcionar estabilidad. Por ejemplo, residuos catiónicos tales como lisina, arginina, homoarginina, ornitina o histidina pueden formar puentes salinos con los residuos aniónicos glutamato o asParteato.

Los ligandos peptídicos y peptidomiméticos incluyen aquellos que tienen péptidos de ocurrencia natural o modificados, e.g., Péptidos D o L; péptidos α, β o γ; péptidos N-metilo; azapéptidos; péptidos que tienen uno o más amidas, i.e., péptido, reemplazados con uno o más enlaces de urea, tiourea, carbamato o sulfonilurea; o péptidos cíclicos.

El ligando de direccionamiento puede ser cualquier ligando que sea capaz de dirigirse a un receptor específico. Los ejemplos son: folato, GalNAc, galactosa, manosa, manosa-6P, grupos de azúcares tales como grupo GalNAc, grupo de manosa, grupo de galactosa o un aptamero. Un grupo es una combinación de dos o más unidades de azúcar. Los ligandos de direccionamiento también incluyen

ligandos de receptor de integrina, ligandos de receptor de quimiocina, transferrina, biotina, ligandos del receptor de serotonina, PSMA, endotelina, GCPII, somatostatina, ligandos de LDL y HDL. Los ligandos también pueden estar basados en ácido nucleico, e.g., un aptámero. El aptámero puede no estar modificado o tener cualquier combinación de modificaciones descritas en este documento.

Los agentes de liberación endosómica incluyen imidazoles, poli u oligoimidazoles, PEI, péptidos, péptidos fusogénicos, policaboxilatos, poliacaciones, oligo o poli cationes enmascarados o aniones, acetales, poliacetales, cetales/policetilos, ortoésteres, polímeros con cargas catiónicas o aniónicas enmascaradas o sin enmascarar, dendrímeros con cargas catiónicas o aniónicas enmascaradas o desenmascaradas.

El modulador PK significa modulador farmacocinético. Los moduladores PK incluyen lipófilos, ácidos biliares, esteroides, análogos de fosfolípidos, péptidos, agentes de unión a proteínas, PEG, vitaminas, etc. Los moduladores PK ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, colesterol, ácidos grasos, ácido cólico, ácido litocólico, dialquilglicéridos, diacilglicérido, fosfolípidos, esfingolípidos, naproxeno, ibuprofeno, vitamina E, biotina, etc. También se sabe que los oligonucleótidos que comprenden una serie de enlaces fosforotioato se unen a la proteína sérica, por lo tanto, los oligonucleótidos cortos, e.g., los oligonucleótidos de aproximadamente 5 bases, 10 bases, 15 bases o 20 bases, que comprenden

enlaces fosforotioato múltiples en la cadena también son aptos para la presente invención como ligandos (e.g., como ligandos moduladores PK).

Además, los aptámeros que se unen a los componentes del suero (e.g., las proteínas séricas) también son aptas para la presente invención como ligandos moduladores PK.

Otros conjugados de ligandos aptos para la invención se describen en las solicitudes de patente de los Estados Unidos, USSN: 10/916,185, presentada el 10 de agosto de 2004; USSN: 10/946,873, presentada el 21 de septiembre de 2004; USSN: 10/833,934, presentado el 3 de agosto de 2007; USSN: 11/115,989 presentada el 27 de abril de 2005 y USSN: 11/944,227 presentada el 21 de noviembre de 2007, que se incorporan por referencia en su totalidad para todos los efectos.

Cuando dos o más ligandos están presentes, todos los ligandos pueden tener las mismas propiedades, todos tienen diferentes propiedades o algunos ligandos tienen las mismas propiedades mientras que otros tienen propiedades diferentes. Por ejemplo, un ligando puede tener propiedades de direccionamiento, tener actividad endosomolítica o tener propiedades moduladoras PK. En una implementación preferida, todos los ligandos tienen propiedades diferentes.

Los ligandos se pueden acoplar a los oligonucleótidos en diversos lugares, por ejemplo, el extremo 3', el extremo 5' y/o en una posición interna. En implementaciones preferidas, el ligando se une a los oligonucleótidos a través de una atadura interpuesta, e.g., un vehículo descrito en este documento. El ligando o ligandos unidos pueden estar presentes en un monómero cuando el monómero se incorpora a la cadena en crecimiento. En algunas implementaciones, el ligando se puede incorporar por acoplamiento a un monómero "precursor" después de que el monómero "precursor" se haya incorporado a la cadena en crecimiento. Por ejemplo, un monómero que tiene, e.g., una atadura terminada en amino (i.e., que no tiene ligando asociado), e.g., TAP-$(CH_2)_nNH_2$ se puede incorporar en una cadena de oligonucleótido en crecimiento. En una operación posterior, i.e., después de la incorporación del monómero precursor en la cadena, un ligando que tiene un grupo electrófilo, e.g., un éster de pentafluorofenilo o un grupo aldehído, se puede unir posteriormente al monómero precursor mediante el acoplamiento del grupo electrófilo del ligando con el grupo nucleófilo terminal del anclaje del monómero precursor.

En otro ejemplo, se puede incorporar un monómero que tiene un grupo químico adecuado para tomar Parte en la reacción Click Chemistry, e.g., una atadura/ligador terminado en azida o alquino. En una operación posterior, i.e., después de la incorporación del monómero precursor en la cadena, un ligando que tiene un grupo químico complementario, e.g., un alquino o azida se puede unir al monómero precursor mediante el acoplamiento del alquino y la azida juntos.

Para los oligonucleótidos bicatenarios, los ligandos se pueden unir a una o a ambas cadenas. En algunas implementaciones, un agente iRNA bicatenario contiene un ligando conjugado con la cadena sentido. En otras implementaciones, un agente iRNA bicatenario contiene un ligando conjugado con la cadena antisentido.

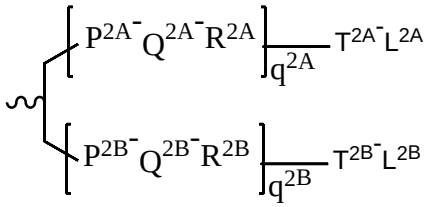
En algunas implementaciones, el ligando se puede conjugar con nucleobases, restos de azúcar o enlaces internucleosídicos de moléculas de ácido nucleico. La conjugación con nucleobases de purina o sus derivados puede ocurrir en cualquier posición, incluyendo los átomos endocíclicos y exocíclicos. En algunas implementaciones, las posiciones 2-, 6-, 7- u 8- de una nucleobase de purina están unidas a un resto conjugado. La conjugación a nucleobases de pirimidina o sus derivados también puede ocurrir en cualquier posición. En algunas implementaciones, las posiciones 2-, 5- y 6- de una nucleobase de pirimidina se pueden sustituir con un resto conjugado. La conjugación para restos de azúcar de nucleósidos puede ocurrir en cualquier átomo de carbono. Ejemplo, átomos de carbono de un resto de azúcar que pueden unirse a un resto conjugado incluyen los átomos de carbono 2', 3' y 5'. La posición 1' también se puede unir a un resto conjugado, tal como en un residuo abásico. Los enlaces internucleosídicos también pueden tener restos conjugados. Para enlaces que contienen fósforo (e.g., fosfodiéster, fosforotioato, fosforoditiotato, fosforoamidato y similares), el resto conjugado se puede unir directamente al átomo de fósforo o a un átomo de O, N o S unido al átomo de fósforo. Para enlaces internucleosídicos que contienen

amina o amida (e.g., PNA), el resto conjugado se puede unir al átomo de nitrógeno de la amina o amida o a un átomo de carbono adyacente.

Se puede usar cualquier ligando adecuado en el campo de la interferencia de RNA, aunque el ligando es típicamente un carbohidrato, e.g., monosacárido (tal como GalNAc), disacárido, trisacárido, tetrasacárido, polisacárido.

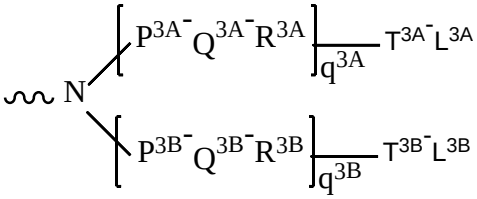
Los enlazadores que conjugan el ligando con el ácido nucleico incluyen los discutidos anteriormente. Por ejemplo, el ligando puede ser uno o más derivados GalNAc (N-acetilglucosamina) unidos a través de un enlazador ramificado monovalente, bivalente o trivalente.

En una implementación, el dsRNA de la invención se conjugan con un enlazador bivalente y los enlazadores trivalentes ramificados incluyen las estructuras que se muestran en cualquiera de las fórmulas (IV) – (VII):

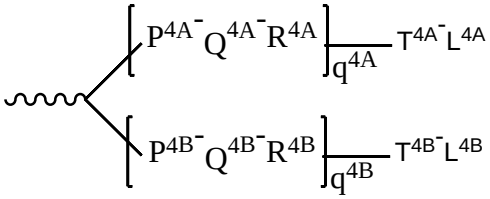


Formula (IV)

,

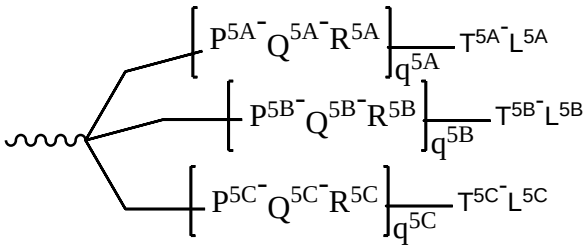


Fórmula (V)



Fórmula (VI)

, o,



Fórmula (VII)

;

donde:

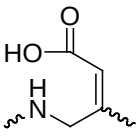
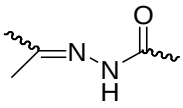
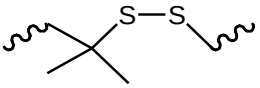
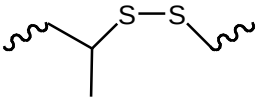
q^{2A}, q^{2B}, q^{3A}, q^{3B}, q^{4A}, q^{4B}, q^{5A}, q^{5B} y q^{5C} representan independientemente para cada ocurrencia 0-20 y en donde la unidad repetitiva puede ser la misma o diferente;

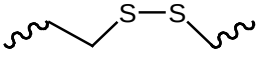
P^{2A}, P^{2B}, P^{3A}, P^{3B}, P^{4A}, P^{4B}, P^{5A}, P^{5B}, P^{5C}, T^{2A}, T^{2B}, T^{3A}, T^{3B}, T^{4A}, T^{4B}, T^{4A}, T^{5B}, T^{5C} están cada uno independientemente ausentes para cada ocurrencia, CO, NH, O, S, OC(O), NHC(O), CH_2, CH_2NH o CH_2O;

Q^{2A}, Q^{2B}, Q^{3A}, Q^{3B}, Q^{4A}, Q^{4B}, Q^{5A}, Q^{5B}, Q^{5C} están cada uno independientemente ausentes para cada ocurrencia, alquileno, alquileno sustituido

en el que uno o más metilenos pueden ser interrumpidos o finalizados por uno o más de O, S, S(O), SO_2, $N(R^N)$, C(R')=C(R''), C≡C o C(O);

R^{2A}, R^{2B}, R^{3A}, R^{3B}, R^{4A}, R^{4B}, R^{5A}, R^{5B}, R^{5C} están cada uno independientemente ausentes para cada ocurrencia, NH, O, S, CH_2, C(O)O, C(O)NH, $NHCH(R^a)C(O)$, -C(O)-$CH(R^a)$-NH-, CO, CH=N-O,

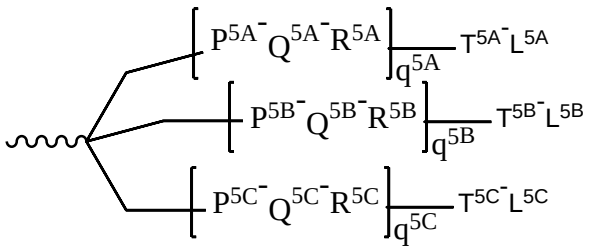

,

,

,

,


o heterociclilo;

L^{2A}, L^{2B}, L^{3A}, L^{3B}, L^{4A}, L^{4B}, L^{5A}, L^{5B} y L^{5C} representan el ligando; i.e., cada uno independientemente para cada ocurrencia, un monosacárido (tal como GalNAc), disacárido, trisacárido, tetrasacárido, oligosacárido o polisacárido; y

R^{ac} es H o una cadena lateral de aminoácido.

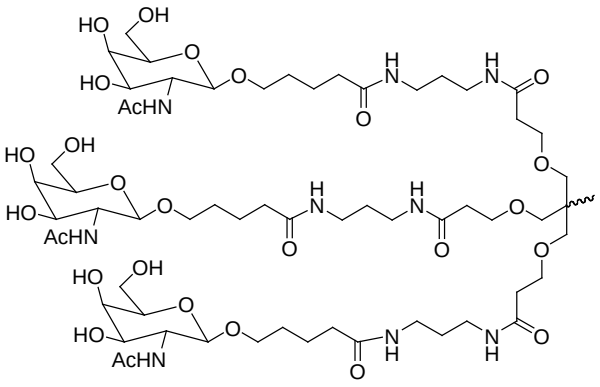
Los derivados GalNAc de conjugación trivalente son particularmente útiles para uso con agentes iRNA para inhibir la expresión de un gen objetivo, tales como los de fórmula (VII):



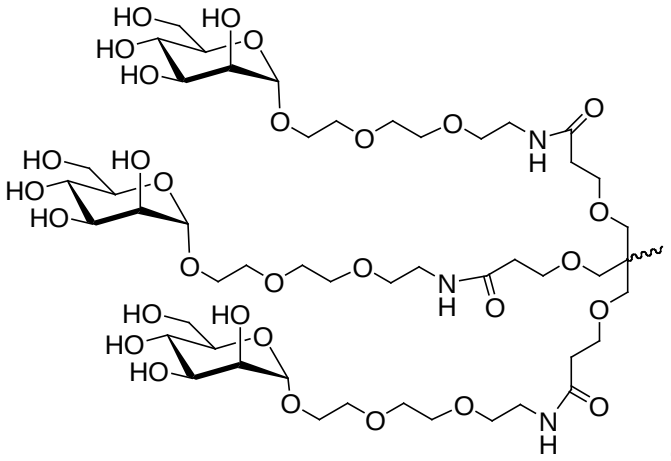
Formula (VII)

,

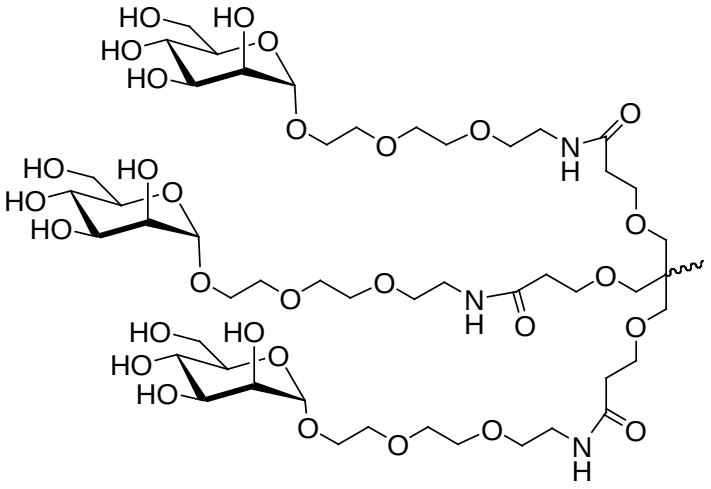
Donde L^{5A}, L^{5B} y L^{5C} representan un monosacárido, como el derivado GalNAc. Los ejemplos de grupos enlazadores ramificados bivalentes y trivalentes adecuados que conjugan derivados GalNAc incluyen, pero no se limitan a, los siguientes compuestos:



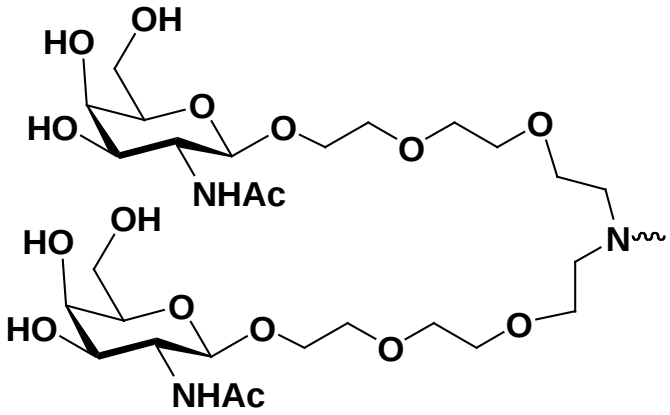
,



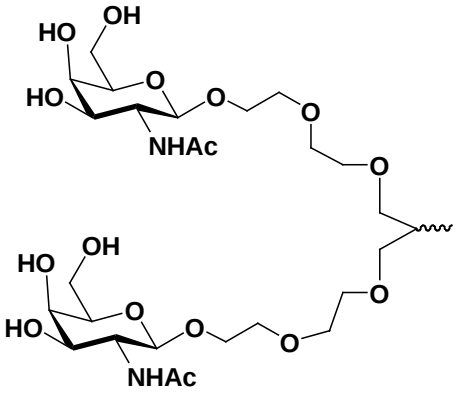
,



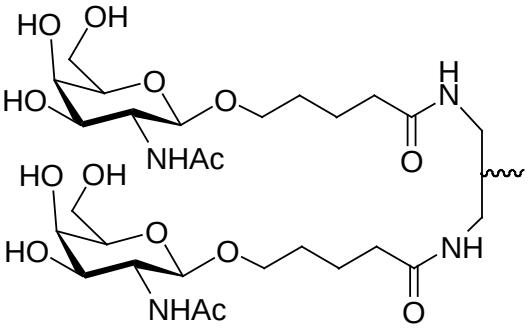
,



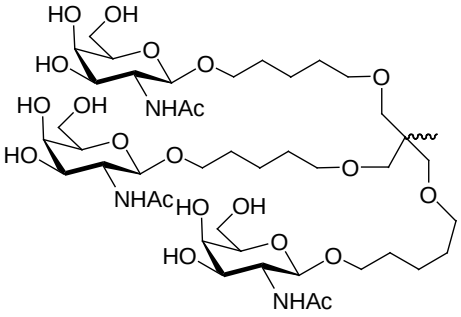
,

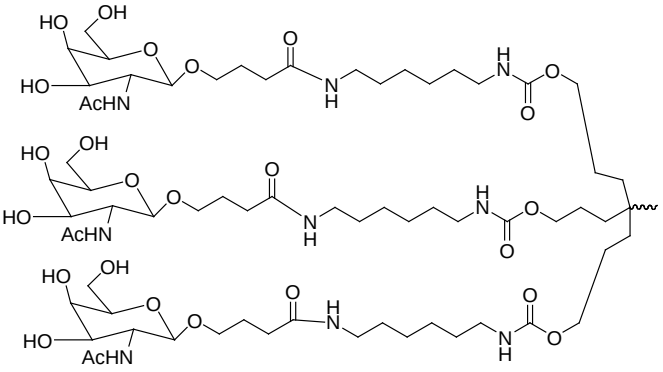


,

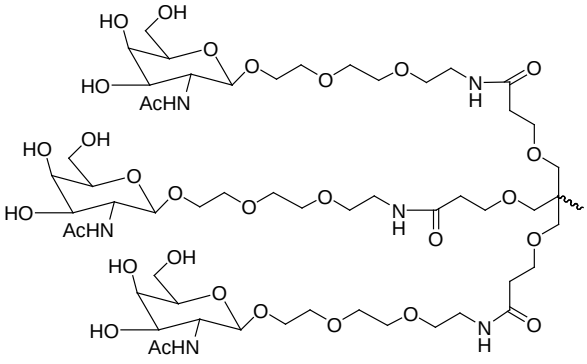


,

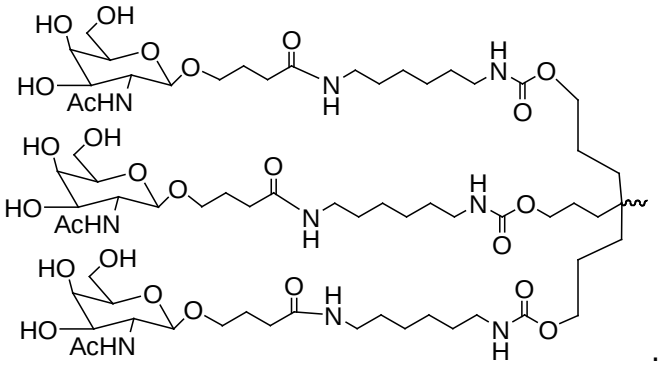




,



, o



.

Las patentes representativas de Estados Unidos que enseñan la preparación de conjugados de RNA incluyen, pero no se limitan a, Patentes de los Estados Unidos Nos. 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 y 5,688,941; 6,294,664; 6,320,017; 6,576,752; 6,783,931; 6,900,297; 7,037,646; 8,106,022, los contenidos completos de cada una de las cuales se incorporan aquí como referencia.

No es necesario que todas las posiciones en un compuesto dado se modifiquen uniformemente, y de hecho, más de una de las modificaciones mencionadas anteriormente se pueden incorporar en un único compuesto o incluso en un único nucleósido dentro de un iRNA. La presente invención también incluye compuestos de iRNA que son compuestos quiméricos.

Los compuestos iRNA "quiméricos" o "quimeras" en el contexto de esta invención, son compuestos iRNA, preferiblemente dsRNA, que contienen dos o más regiones químicamente distintas, cada una compuesta por al menos una unidad monomérica, i.e., un nucleótido en el caso de un compuesto dsRNA. Estos iRNA contienen típicamente al menos una región en la que el RNA se modifica para conferir al iRNA una resistencia incrementada a la degradación de la nucleasa, una captación celular incrementada, y/o una afinidad de unión incrementada por el ácido nucleico objetivo. Una región adicional del iRNA puede servir como sustrato para enzimas capaces de escindir hibridos RNA: DNA o RNA: RNA. A modo de ejemplo, la RNasa H es una endonucleasa celular que escinde la cadena RNA de un dúplex de RNA: DNA. La activación de la RNasa H, por lo tanto, da como resultado la escisión del objetivo de RNA, lo que mejora en gran medida la eficacia de la inhibición de iRNA de la expresión génica.

Consecuentemente, a menudo se pueden obtener resultados comparables con iRNA más cortos cuando se usan dsRNA quiméricos, en comparación con fosforotioatodesoxi dsRNA que se hibridan con la misma región objetivo. La escisión del objetivo de RNA se puede detectar rutinariamente mediante electroforesis en gel y, si es necesario, técnicas de hibridación de ácido nucleico asociadas conocidas en el arte.

En ciertos casos, el RNA de un iRNA se puede modificar por un grupo no ligando. Varias moléculas no ligando se han conjugado con iRNA para potenciar la actividad, la distribución celular o la captación celular del iRNA, y los procedimientos para realizar tales conjugaciones están disponibles en la literatura científica. Dichos restos no ligandos han incluido restos lipídicos, tales como colesterol (Kubo, T. *et al., Biochem. Biophys. Res. Comm*., 2007, 365(1):54-61; Letsinger *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86:6553), ácido cólico (Manoharan *et al., Bioorg. Med. Chem. Lett*., 1994, 4:1053), un tioéter, *e.g*., hexil-S-tritiltiol (Manoharan *et al., Ann. N.Y. Acad. Sci*., 1992, 660:306; Manoharan *et al., Bioorg. Med. Chem. Let*., 1993, 3:2765), un tiocolesterol (Oberhauser *et al., Nucl. Acids Res*., 1992, 20:533), una cadena alifatica, *e.g*., dodecandiol o residuos undecilo (Saison-Behmoaras *et al., EMBO J*., 1991, 10:111; Kabanov *et al., FEBS Lett*., 1990, 259:327; Svinarchuk *et al., Biochimie*, 1993, 75:49),un fosfolipido *e.g*., di-hexadecil-rac-glicerol o trietilamonio 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato (Manoharan *et al., Tetrahedron Lett*., 1995, 36:3651; Shea *et al., Nucl. Acids Res*., 1990, 18:3777), una poliamina o una cadena de polietilenglicol

(Manoharan *et al., Nucleosides & Nucleotides*, 1995, 14:969), o ácido acetico adamantano (Manoharan *et al., Tetrahedron Lett*., 1995, 36:3651), un resto palmitilo (Mishra *et al., Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264:229), o un resto ctadecilamino o hexilamino-carbonilo-oxicolesterol (Crooke *et al., J. Pharmacol. Exp. Ther*., 1996, 277:923). Las patentes representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de tales conjugados de RNA se han enumerado anteriormente. Los protocolos de conjugación típicos implican la síntesis de un RNA que lleva un aminoenlazador en una o más posiciones de la secuencia. El grupo amino se hace reaccionar luego con la molécula que se conjuga usando un agente de acoplamiento o reactivos de activación. La reacción de conjugación se puede realizar con el RNA aún unido al soporte sólido o después de la escisión del RNA, en fase de solución. La purificación del conjugado de RNA por HPLC típicamente proporciona el conjugado puro.

En algunas implementaciones, un agente iRNA bicatenario de la invención es AD-57213.

VI. Entrega de un iRNA de la Invención

La administración de un iRNA de la invención a una célula, e.g., una Célula dentro de un sujeto, tal como un sujeto humano (e.g., un sujeto que lo necesita, tal como un sujeto, que tiene un trastorno, hemorrágico) se puede lograr de varias maneras diferentes. Por ejemplo, la administración se puede realizar poniendo en

contacto una Célula con un iRNA de la invención, ya sea *in vitro* o *in vivo*. La administración *in vivo* se puede realizar directamente administrando una composición que comprende un iRNA, e.g., un dsRNA, a un sujeto. Alternativamente, la administración *in vivo* se puede realizar indirectamente administrando uno o más vectores que codifican y dirigen la expresión del iRNA. Estas alternativas se discuten más abajo.

En general, cualquier método de suministro de una molécula de ácido nucleico (*in vitro* o *in vivo*) se puede adaptar para uso con un iRNA de la invención (ver, e.g., Akhtar S. y Julian RL. (1992) *Trends Cell. Biol.* 2 (5): 139-144 y WO94/02595, que se incorporan aquí como referencia en su totalidad). Para la administración *in vivo*, los factores a considerar para administrar una molécula de iRNA incluyen, por ejemplo, la estabilidad biológica de la molécula liberada, la prevención de efectos no específicos y la acumulación de la molécula administrada en el tejido objetivo. Los efectos no específicos de un iRNA se pueden minimizar mediante administración local, por ejemplo, mediante inyección directa o implantación en un tejido o administración tópica de la preparación. La administración local a un sitio de tratamiento maximiza la concentración local del agente, limita la exposición del agente a tejidos sistémicos que de otro modo podrían ser perjudicados por el agente o que pueden degradar el agente, y permite administrar una menor dosis total de la molécula de iRNA. Varios estudios han demostrado la eliminación exitosa de productos genéticos cuando un iRNA se administra localmente. Por ejemplo, la administración intraocular de un dsRNA de

VEGF mediante inyección intravítrea en monos cynomolgus (Tolentino, MJ., *et al.,* (2004) *Retina* 24: 132-138) y las inyecciones subretinales en ratones (Reich, SJ., *et al.,* (2003) *Mol. Vis.* 9: 210-216) se demostró que evitaban la neovascularización en un modelo experimental de degeneración macular relacionada con la edad. Además, la inyección intratumoral directa de un dsRNA en ratones reduce el volumen tumoral (Pille, J., *et al.,* (2005) *Mol. Ther*. 11: 267-274) y puede prolongar la supervivencia de ratones vehículo de tumores (Kim, WJ*., et al.,* (2006) *Mol. Ther*. 14: 343-350; *Li, S., et al.,* (2007) *Mol. Ther*. 15: 515 - 523). La interferencia del RNA también ha tenido éxito con la administración local al SNC mediante inyección directa (Dorn, G., *et al.,* (2004) *Nucleic Acids* 32: e49; Tan, PH., *et al.,* (2005) *Gene Ther.* 12: 59- 66; Makimura, H., *et al.,* (2002) *BMC Neurosci*. 3:18; Shishkina, GT., *et al.,* (2004*) Neuroscience* 129: 521 - 528; Thakker, ER., *et al.,* (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 17270-17275; Akaneya, Y., *et al.,* (2005) *J. Neurophysiol.* 93: 594-602) y para los pulmones mediante administración intranasal (Howard, KA., *et al.,* (2006) *Mol. Ther* 14: 476 - 484; Zhang, X., *et al.,* (2004) *J. Biol. Chem*. 279: 10677 - 10684; Bitko, V., *et al.,* (2005) *Nat. Med.* 11: 50 - 55) Para administrar un iRNA sistémicamente para el tratamiento de una enfermedad, el RNA se puede modificar o administrar alternativamente usando un sistema de suministro de fármaco; ambos métodos actúan para evitar la rápida degradación del dsRNA por endo y exo-nucleasas *in vivo*. La modificación del RNA o del vehículo farmacéutico también puede permitir dirigir la composición de iRNA al tejido objetivo y evitar efectos no deseables fuera del objetivo. Las moléculas de iRNA se pueden modificar por conjugación química con grupos

lipófilos, como el colesterol, para potenciar la captación celular y evitar la degradación. Por ejemplo, un iRNA dirigido contra ApoB conjugado con un resto de colesterol lipófilo se inyectó sistémicamente en ratones y dio como resultado la destrucción del mRNA de apoB tanto en el hígado como en el yeyuno (Soutschek, J., *et al.,* (2004) *Nature* 432: 173-178).

Se ha demostrado que la conjugación de un iRNA a un aptámero inhibe el crecimiento tumoral y media la regresión tumoral en un modelo de cáncer de próstata en ratón (McNamara, JO., *et al.,* (2006) *Nat. Biotechnol*., 24: 1005 - 1015). En una implementación alternativa, el iRNA se puede administrar usando sistemas de administración de fármacos tales como una nanoParteícula, un dendrímero, un polímero, liposomas o un sistema de suministro catiónico. Los sistemas de administración catiónica cargados positivamente facilitan la unión de una molécula de iRNA (cargada negativamente) y también potencian las interacciones en la membrana celular cargada negativamente para permitir la absorción eficiente de un iRNA por la célula. Los lípidos catiónicos, dendrímeros o polímeros se pueden unir a un iRNA o inducir a formar una vesícula o micela (ver, e.g., Kim SH., *et al.,* (2008) *Journal of Controlled Release* 129 (2): 107-116) que encapsula un iRNA. La formación de vesículas o micelas previene además la degradación del iRNA cuando se administra sistémicamente. Los métodos para preparar y administrar complejos catiónicos-iRNA están dentro de las capacidades de un versado versado en el arte (ver, e.g., Sorensen, DR., *et al.,* (2003) *J. Mol. Biol* 327: 761-766; Verma, UN., *et. al* (2003) *Clin. Cancer Res*. 9: 1291 - 1300;

Arnold, AS *et al.,* (2007) *J. Hypertens*. 25: 197 - 205, que se incorporan aquí como referencia en su totalidad). Algunos ejemplos no limitantes de sistemas de administración de fármacos útiles para la administración sistémica de iRNA incluyen DOTAP (Sorensen, DR., *et al.,* (2003), supra; Verma, UN., *et al.,* (2003), *supra*), Oligofectamina, "Parteículas lipídicas de ácido nucleico solido" (Zimmermann, TS., *et al.,* (2006) *Nature* 441: 111-114), cardiolipina (Chien, PY., *et al.,* (2005) *Cancer Gene Ther*. 12: 321 - 328; Pal, A., *et al.,* (2005) *Int. J. Oncol*., 26: 1087 - 1091), polietilenimina (Bonnet ME., *et al.,* (2008) *Pharm. Res.* Agosto 16 Epub antes de imprimir; Aigner, A. (2006) *J. Biomed. Biotechnol.,* 71659), péptidos Arg-Gly-Asp (RGD) (Liu, S. (2006) *Mol. Pharm*., 3: 472-487) y poliamidoaminas (Tomalia, DA, *et al.,* (2007) *Biochem. Soc. Trans.* 35: 61 - 67; Yoo, H., *et al.,* (1999) *Pharm. Res*. 16: 1799 - 1804). En algunas implementaciones, un iRNA forma un complejo con ciclodextrina para administración sistémica. Los métodos para la administración y las composiciones farmacéuticas de iRNA y ciclodextrinas se pueden encontrar en la patente de Estados Unidos Nº. 7,427,605, que se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

A. Vectores iRNA codificados de la Invencion.

El iRNA que se dirige al gen Serpinc1 se puede expresar a partir de unidades de transcripción insertadas en vectores de DNA o RNA (ver, e.g., Couture, A, *et. al., TIG.* (1996), 12: 5 - 10; Skillern, A., *et al.,* Publicación PCT

Internacional No. WO 00/22113, Conrad, Publicación Internacional PCT No. WO 00/22114, y Conrad, Patente de los Estados Unidos No. 6,054, 299). La expresión puede ser transitoria (del orden de horas a semanas) o sostenida (semanas a meses o más), dependiendo de la construcción específica utilizada y del tejido o tipo de célula objetivo. Estos transgenes se pueden introducir como una construcción lineal, un plásmido circular o un vector viral, que puede ser un vector integrante o no integrante. El transgén también se puede construir para permitir que se herede como un plásmido extracromosómico (Gassmann, *et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1995) 92: 1292).

La cadena o cadenas individuales de un iRNA se pueden transcribir a partir de un promotor en un vector de expresión. Cuando se deben expresar dos cadenas separadas para generar, por ejemplo, un dsRNA, se pueden co-introducir dos vectores de expresión separados (e.g., mediante transfección o infección) en una célula objetivo. Alternativamente, cada cadena individual de un dsRNA se puede transcribir mediante ambos promotores, los cuales están ubicados en el mismo plásmido de expresión. En una implementación, un dsRNA se expresa como polinucleótidos de repetición invertida unidos por una secuencia de polinucleótido de unión tal que el dsRNA tiene una estructura de tallo y bucle.

Los vectores de expresión de iRNA son generalmente plásmidos de DNA o vectores virales. Los vectores de expresión compatibles con células eucariotas, preferiblemente aquellos compatibles con células de vertebrados, se pueden usar

para producir construcciones recombinantes para la expresión de un iRNA como se describe en este documento. Los vectores de expresión de células eucarióticas son bien conocidos en el arte y están disponibles a partir de varias fuentes comerciales. Típicamente, tales vectores se proporcionan con sitios de restricción convenientes para la inserción del segmento de ácido nucleico deseado. La administración de vectores que expresan iRNA puede ser sistémica, tal como mediante administración intravenosa o intramuscular, mediante administración a células objetivo ex plantadas del paciente seguido de reintroducción en el paciente, o mediante cualquier otro promedio que permita la introducción en una célula objetivo deseada.

Los plásmidos de expresión de iRNA se pueden transfectar en células objetivo como un complejo con vehículo de lípidos catiónicos (e.g., oligofectamina) o vehículo basados en lípidos no catiónicos (e.g., Transit-TKOTM). La invención también contempla múltiples transfecciones de lípidos para reduccións mediadas por iRNA dirigidas a diferentes regiones de un RNA objetivo durante un período de una semana o más. La introducción exitosa de vectores en las células huésped se puede controlar usando varios métodos conocidos. Por ejemplo, la transfección transitoria se puede señalizar con un informador, tal como un marcador fluorescente, tal como proteína fluorescente verde (GFP). La transfección estable de células *ex vivo* se puede asegurar usando marcadores que proporcionan a la célula transfectada resistencia a factores ambientales específicos (e.g., antibióticos y fármacos), tales como resistencia a la higromicina B.

Los sistemas de vectores virales que se pueden utilizar con los métodos y composiciones descritos en este documento incluyen, pero no se limitan a, (a) vectores de adenovirus; (b) vectores de retrovirus, que incluyen pero no se limitan a vectores lentivirales, virus de la leucemia múrida moloney, etc.; (c) vectores de virus adenoasociados; (d) vectores del virus del herpes simple; (e) vectores SV40; (f) vectores de virus de polioma; (g) vectores del virus del papiloma; (h) vectores de picornavirus; (i) vectores de virus de viruela tales como un ortopox, e.g., vectores de virus vaccinia o avipox, e.g., viruela de canario o viruela aviar; y (j) un adenovirus ayudante dependiente o sin intestinos. Los virus defectuosos de replicación también pueden ser ventajosos. Diferentes vectores se incorporarán o no se incorporarán en el genoma de las células. Las construcciones pueden incluir secuencias virales para la transfección, si se desea. Alternativamente, la construcción se puede incorporar en vectores capaces de replicación episomal, e.g., Vectores EPV y EBV. Las construcciones para la expresión recombinante de un iRNA generalmente requerirán elementos reguladores, e.g., promotores, potenciadores, etc., para garantizar la expresión del iRNA en las células objetivo. Otros aspectos a considerar para los vectores y construcciones se describen con más detalle a continuación.

Los vectores útiles para la administración de un iRNA incluirán elementos reguladores (promotor, potenciador, etc.) suficientes para la expresión del iRNA en

la célula o tejido objetivo deseado. Los elementos reguladores se pueden elegir para proporcionar expresión constitutiva o regulada/inducible.

La expresión del iRNA se puede regular con precisión, por ejemplo, usando una secuencia regulable inducible que es sensible a ciertos reguladores fisiológicos, e.g., niveles circulantes de glucosa u hormonas (Docherty *et al.,* 1994, *FASEB J.* 8: 20-24). Dichos sistemas de expresión inducibles, adecuados para el control de la expresión de dsRNA en células o en mamíferos incluyen, por ejemplo, regulación por ecdisona, por estrógenos, progesterona, tetraciclina, inductores químicos de dimerización e isopropil-beta-D1-tiogalactopiranósido (IPTG). Una persona versada en el arte podría elegir la secuencia reguladora/promotora apropiada en función del uso previsto del transgén de iRNA.

Se pueden usar vectores virales que contienen secuencias de ácido nucleico que codifican un iRNA. Por ejemplo, se puede usar un vector retroviral (ver Miller *et. al., Meth. Enzymol*., 217: 581-599 (1993)). Estos vectores retrovirales contienen los componentes necesarios para el empaquetamiento correcto del genoma viral y la integración en el DNA de la célula huésped. Las secuencias de ácido nucleico que codifican un iRNA se clonan en uno o más vectores, que facilitan la administración del ácido nucleico a un paciente. Se pueden encontrar más detalles sobre vectores retrovirales, por ejemplo, en Boesen *et al., Biotherapy* 6: 291-302 (1994), que describe el uso de un vector retroviral para administrar el gen mdr1 a células madre hematopoyéticas para

hacer las células madre más resistentes a la quimioterapia. Otras referencias que ilustran el uso de vectores retrovirales en terapia génica son: : Clowes *et al.*, *J. Clin. Invest*. 93:644-651 (1994); Kiem *et al.*, *Blood* 83:1467-1473 (1994); Salmons and Gunzberg, *Human Gene Therapy* 4:129-141 (1993); y Grossman and Wilson, *Curr. Opin. in Genetics and Devel*. 3:110-114 (1993). Los vectores lentivirales contemplados para uso incluyen, por ejemplo, los vectores basados en HIV descritos en las patentes de Estados Unidos Nos. 6,143,520; 5,665,557; y 5,981,276, que se incorporan aquí como referencia.

Los adenovirus también se contemplan para uso en la administración de iRNA de la invención. Los adenovirus son vehículos especialmente atractivos, e.g., para administrar genes al epitelio respiratorio. Los adenovirus infectan naturalmente el epitelio respiratorio donde causan una enfermedad leve. Otros objetivos para los sistemas de administración basados en adenovirus son el hígado, el sistema nervioso central, las células endoteliales y el músculo. Los adenovirus tienen la ventaja de ser capaces de infectar células que no se dividen. Kozarsky and Wilson, *Current Opinion in Genetics and Development* 3:499-503 (1993) presentan una revisión de la terapia génica basada en adenovirus. Bout *et al.*, *Human Gene Therapy* 5:3-10 (1994) demostraron el uso de vectores de adenovirus para transferir genes al epitelio respiratorio de monos rhesus. Se pueden encontrar otros ejemplos del uso de adenovirus en la terapia génica en Rosenfeld *et al.*, *Cell* 68:143-155 (1992); Mastrangeli *et al.*, *J. Clin. Invest*. 91:225-234 (1993); Publicación PCT WO94/12649; y Wang, *et al.*, *Gene Therapy* 2:775-

783 (1995). En Xia H *et al.,* (2002), *Nat. Biotech*. 20: 1006-1010 se describe un vector AV recombinante adecuado para expresar un iRNA presentado en la invención, un método para construir el vector AV recombinante, y un método para administrar el vector en células objetivo.

Los vectores de virus adenoasociados (AAV) también se pueden usar para administrar un iRNA de la invención (Walsh *et. al., Proc. Soc. Exp. Biol. Med*. 204: 289-300 (1993); patente de los Estados Unidos No. 5,436,146). En una implementación, el iRNA puede expresarse como dos moléculas de RNA monocatenarias, complementarias, separadas de un vector de AAV recombinante que tiene, por ejemplo, los promotores de RNA U6 o H1, o el promotor de citomegalovirus (CMV). Los vectores de AAV adecuados para expresar el dsRNA presentado en la invención, los métodos para construir el vector AV recombinante, y los métodos para administrar los vectores en células objetivo se describen en Samulski R *et al*. (1987), *J. Virol.* 61: 3096-3101; Fisher K J *et al*. (1996), *J. Virol*, 70: 520-532; Samulski R *et al*. (1989), *J. Virol.* 63: 3822-3826; Patente de Estados Unidos No. 5,252,479; Patente de Estados Unidos No.5,139,941; Solicitud de patente Internacional No. WO 94/13788; y la Solicitud de Patente Internacional No. WO 93/24641, cuyas descripciones completas se incorporan aquí como referencia.

Otro vector viral adecuado para la administración de un iRNA es un virus de la viruela, tal como un virus vaccinia, por ejemplo, una vacuna atenuada tal como

Modified Virus Ankara (MVA) o NYVAC, una avipox tal como la viruela aviar o la viruela canaria.

El tropismo de los vectores virales se puede modificar por pseudotipado de los vectores con proteínas de la envoltura u otros antígenos de superficie de otros virus, o sustituyendo proteínas de la cápside viral diferentes, según corresponda. Por ejemplo, los vectores lentivirales se pueden pseudotipar con proteínas de superficie del virus de la estomatitis vesicular (VSV), la rabia, el Ébola, Mokola y similares. Los vectores AAV se pueden preparar para dirigirse a células diferentes diseñando los vectores para expresar diferentes serotipos de proteína de la cápside; ver, e.g., Rabinowitz J E *et al.,* (2002), *J Virol* 76: 791 - 801, cuya descripción completa se incorpora aquí como referencia.

La preparación farmacéutica de un vector puede incluir el vector en un diluyente aceptable, o puede incluir una matriz de liberación lenta en la que está incrustado el vehículo de administración del gen. Alternativamente, cuando el vector de suministro génico completo se puede producir intacto a partir de células recombinantes, e.g., vectores retrovirales, la preparación farmacéutica puede incluir una o más células que producen el sistema de administración de genes.

V. Composiciones farmacéuticas de la invención-

La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas y formulaciones que incluyen los iRNA de la invención. En una implementación, se proporcionan aquí composiciones farmacéuticas que contienen un iRNA, como se describe en este documento, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas que contienen el iRNA son útiles para tratar una enfermedad o trastorno asociado con la expresión o actividad de un gen Serpinc1, e.g., una enfermedad asociada a Serpinc1. Tales composiciones farmacéuticas se formulan en base al modo de administración. Un ejemplo es el de las composiciones que se formulan para administración sistémica mediante administración parenteral, e.g., por administración subcutánea (SC) o intravenosa (IV). Otro ejemplo es el de las composiciones que están formuladas para administración directa en el parénquima cerebral, e.g., por infusión en el cerebro, como por infusión continua de bomba. Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden administrar en dosis suficientes para inhibir la expresión de un gen Serpinc1.

En ciertas implementaciones de la invención, por ejemplo, cuando una composición farmacéutica comprende un agente iRNA bicatenario incluye uno o más motivos de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos, incluido uno de dichos motivos en o cerca del sitio de escisión del agente, seis enlaces fosforotioato, y un ligando de GalNAc, tal composición se administra en una dosis de 0,200 a aproximadamente 1,825 mg/kg, de 0,200 a aproximadamente 1,800 mg/kg, de aproximadamente 0,200 a aproximadamente

1,700 mg/kg, de aproximadamente 0,200 a aproximadamente 1,600 mg/kg, de aproximadamente 0,200 a aproximadamente 1,500 mg/kg, de aproximadamente 0,200 a aproximadamente 1,400 mg/kg, de aproximadamente 0,200 a aproximadamente 1,400 mg/kg, de aproximadamente 0,200 a aproximadamente 1,200 mg/kg, de aproximadamente 0,200 a aproximadamente 1,100 mg/kg, de aproximadamente 0,200 a aproximadamente 1,000 mg/kg, de aproximadamente 0,200 a aproximadamente 0,900 mg/kg, de aproximadamente 0,200 a aproximadamente 0,800 mg/kg, de aproximadamente 0,200 a aproximadamente 0,700 mg/kg, de aproximadamente 0,200 a aproximadamente 0,600 mg/kg, de aproximadamente 0,200 a aproximadamente 0,500 mg/kg, de aproximadamente 0,200 a aproximadamente 0,400 mg/kg, de aproximadamente 0,225 a aproximadamente 1,825 mg/kg, de aproximadamente 0,225 a aproximadamente 1,800 mg/kg, de aproximadamente 0,225 a aproximadamente 1.700 mg/kg, de aproximadamente 0,225 a aproximadamente 1,600 mg/kg, de aproximadamente 0,225 a aproximadamente 1,500 mg/kg, de aproximadamente 0,225 a aproximadamente 1.400 mg/kg, de aproximadamente 0,225 a aproximadamente 1.400 mg/kg, de aproximadamente 0,225 a aproximadamente 1.200 mg/kg, de aproximadamente 0,225 a aproximadamente 1,100 mg/kg, de aproximadamente 0,225 a aproximadamente 1,000 mg/kg, de aproximadamente 0,225 a aproximadamente 0,900 mg/kg, de aproximadamente 0,225 a aproximadamente 0,800 mg/kg, de aproximadamente 0,225 a aproximadamente 0,700 mg/kg, de aproximadamente 0,225 a aproximadamente 0,600 mg/kg, de aproximadamente 0,225 a aproximadamente 0,500 mg/kg, de aproximadamente 0,225 a

aproximadamente 0,400 mg/kg, de aproximadamente 0,250 a aproximadamente 1,825 mg/kg, de aproximadamente 0,250 a aproximadamente 1,800 mg/kg, de aproximadamente 0,250 a aproximadamente 1,700 mg/kg, de aproximadamente 0,250 a aproximadamente 1,600 mg/kg, de aproximadamente 0,250 a aproximadamente 1,500 mg/kg, de aproximadamente 0,250 a aproximadamente 1,400 mg/kg, de aproximadamente 0,250 a aproximadamente 1,400 mg/kg, de aproximadamente 0,250 a aproximadamente 1,200 mg/kg, de aproximadamente 0,250 a aproximadamente 1.100 mg/kg, de aproximadamente 0,250 a aproximadamente 1.000 mg/kg, de aproximadamente 0,250 a aproximadamente 0,900 mg/kg, de aproximadamente 0,250 a aproximadamente 0,800 mg/kg, de aproximadamente 0,250 a aproximadamente 0,700 mg/kg, de aproximadamente 0,250 a aproximadamente 0,600 mg/kg, de aproximadamente 0,250 a aproximadamente 0,500 mg/kg, de aproximadamente 0,250 a aproximadamente 0,400 mg/kg, de aproximadamente 0,425 a aproximadamente 1,825 mg/kg, de aproximadamente 0,425 a aproximadamente 1,800 mg/kg, de aproximadamente 0,425 a aproximadamente 1,700 mg/kg, de aproximadamente 0,425 a aproximadamente 1,600 mg/kg, de aproximadamente 0,425 a aproximadamente 1,500 mg/kg, de aproximadamente 0,425 a aproximadamente 1,400 mg/kg, de aproximadamente 0,425 a aproximadamente 1,400 mg/kg, de aproximadamente 0,425 a aproximadamente 1,200 mg/kg, de aproximadamente 0,425 a aproximadamente 1,100 mg/kg, de aproximadamente 0,425 a aproximadamente 1,000 mg/kg, de aproximadamente 0,425 a aproximadamente 0,900 mg/kg, de aproximadamente 0,425 a aproximadamente 0,800 mg/kg, de aproximadamente

0,425 a aproximadamente 0,700 mg/kg, de aproximadamente 0,425 a aproximadamente 0,600 mg/kg, de aproximadamente 0,425 a aproximadamente 0,500 mg/kg, de aproximadamente 0,450 a aproximadamente 1,825 mg/kg, de aproximadamente 0,450 a aproximadamente 1,800 mg/kg, de aproximadamente 0,450 a aproximadamente 1,700 mg/kg, de aproximadamente 0,450 a aproximadamente 1,600 mg/kg, de aproximadamente 0,450 a aproximadamente 1,500 mg/kg, de aproximadamente 0,450 a aproximadamente 1,400 mg/kg, de aproximadamente 0,450 a aproximadamente 1,400 mg/kg, de aproximadamente 0,450 a aproximadamente 1,200 mg/kg, de aproximadamente 0,450 a aproximadamente 1,100 mg/kg, de aproximadamente 0,450 a aproximadamente 1,000 mg/kg, de aproximadamente 0,450 a aproximadamente 0,900 mg/kg, de aproximadamente 0,450 a aproximadamente 0,800 mg/kg, de aproximadamente 0,450 a aproximadamente 0,700 mg/kg, de aproximadamente 0,450 a aproximadamente 0,600 mg/kg, de aproximadamente 0,450 a aproximadamente 0,500 mg/kg, de aproximadamente 0,475 a aproximadamente 1,825 mg/kg, de aproximadamente 0,475 a aproximadamente 1,800 mg/kg, de aproximadamente 0,475 a aproximadamente 1,700 mg/kg, de aproximadamente 0,475 a aproximadamente 1,600 mg/kg, de aproximadamente 0,475 a aproximadamente 1,500 mg/kg, de aproximadamente 0,475 a aproximadamente 1,400 mg/kg, de aproximadamente 0,475 a aproximadamente 1,400 mg/kg, de aproximadamente 0,475 a aproximadamente 1,200 mg/kg, de aproximadamente 0,475 a aproximadamente 1,100 mg/kg, de aproximadamente 0,475 a aproximadamente 1,000 mg/kg, de aproximadamente 0,475 a aproximadamente 0,900 mg/kg, de

aproximadamente 0,475 a aproximadamente 0,800 mg/kg, de aproximadamente 0,475 a aproximadamente 0,700 mg/kg, de aproximadamente 0,475 a aproximadamente 0,600 mg/kg, de aproximadamente 0,475 a aproximadamente 0,500 mg/kg, de aproximadamente 0,875 a aproximadamente 1,825 mg/kg, de aproximadamente 0,875 a aproximadamente 1,800 mg/kg, de aproximadamente 0,875 a aproximadamente 1,700 mg/kg, de aproximadamente 0,875 a aproximadamente 1,600 mg/kg, de aproximadamente 0,875 a aproximadamente 1,500 mg/kg, de aproximadamente 0,875 a aproximadamente 1,400 mg/kg, de aproximadamente 0,875 a aproximadamente 1,400 mg/kg, de aproximadamente 0,875 a aproximadamente 1,200 mg/kg, de aproximadamente 0,875 a aproximadamente 1,100 mg/kg, de aproximadamente 0,875 a aproximadamente 1,000 mg/kg, de aproximadamente 0,875 a aproximadamente 0,900 mg/kg, de aproximadamente 0,900 a aproximadamente 1,825 mg/kg, de aproximadamente 0,900 a aproximadamente 1,800 mg/kg, de aproximadamente 0,900 a aproximadamente 1,700 mg/kg, de aproximadamente 0,900 a aproximadamente 1,600 mg/kg, de aproximadamente 0,900 a aproximadamente 1,500 mg/kg, de aproximadamente 0,900 a aproximadamente 1,400 mg/kg, de aproximadamente 0,900 a aproximadamente 1,400 mg/kg, de aproximadamente 0,900 a aproximadamente 1,200 mg/kg, de aproximadamente 0,900 a aproximadamente 1,100 mg/kg, de aproximadamente 0,900 a aproximadamente 1,000 mg/kg, de aproximadamente 0,925 a aproximadamente 1,825 mg/kg, de aproximadamente 0,925 a aproximadamente 1,800 mg/kg, de aproximadamente 0,925 a aproximadamente 1,700 mg/kg, de aproximadamente 0,925 a aproximadamente

1,600 mg/kg, de aproximadamente 0,925 a aproximadamente 1,500 mg/kg, de aproximadamente 0,925 a aproximadamente 1,400 mg/kg, de aproximadamente 0,925 a aproximadamente 1,400 mg/kg, de aproximadamente 0,925 a aproximadamente 1,200 mg/kg, de aproximadamente 0,925 a aproximadamente 1,100 mg/kg, or de aproximadamente 0,925 a aproximadamente 1,000 mg/kg. Los valores e intervalos intermedios a los valores citados anteriormente también están destinados a ser Parte de esta invención, e.g., el agente iRNA se puede administrar al sujeto en una dosis de aproximadamente 0,015 mg/kg a aproximadamente 0,45 mg/Kg.

Por ejemplo, el agente de iRNA, e.g., el agente iRNA en una composición farmacéutica, se puede administrar en una dosis de aproximadamente 0,2 mg/kg, 0,225 mg/kg, 0,25 mg/kg, 0,275 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,325 mg/kg, 0,35 mg/kg, 0,375 mg/kg, ,.4 mg/kg, 0,425 mg/kg, 0,45 mg/kg, 0,475 mg/kg, aproximadamente 0,5 mg/kg, 0,525 mg/kg, 0,55 mg/kg, 0,575 mg/kg, de aproximadamente 0,6 mg/kg, 0,625 mg/kg, 0,65 mg/kg, 0,675 mg/kg, aproximadamente 0,7 mg/kg, 0,725 mg/kg, 0,75 mg/kg, 0,775 mg/kg, aproximadamente 0,8 mg/kg, 0,925 mg/kg, 0,95 mg/kg, 0.975 mg/kg, aproximadamente 1,0 mg/kg, 1,025 mg/kg, 1,05 mg/kg, 1,075 mg/kg, aproximadamente 1,1 mg/kg, 1,125 mg/kg, 1,15 mg/kg, 1,175 mg/kg, aproximadamente 1,2 mg/kg, 1,225 mg/kg, 1,25 mg/kg, 1,275 mg/kg, aproximadamente 1,3 mg/kg, 1,325 mg/kg, 1,35 mg/kg, 1,375 mg/kg, aproximadamente 1,4 mg/kg, 1,425 mg/kg, 1,45 mg/kg, 1,475 mg/kg, aproximadamente 1,5 mg/kg, 1,525 mg/kg, 1,55 mg/kg, 1,575 mg/kg,

aproximadamente 1,6 mg/kg, 1,625 mg/kg, 1,65 mg/kg, 1,675 mg/kg, aproximadamente 1,7 mg/kg, 1,725 mg/kg, 1,75 mg/kg, 1,775 mg/kg, o aproximadamente 1,8 mg/kg. Los valores intermedios a los valores citados anteriormente también estan destinados a ser Parte de esta invención.

En algunas implementaciones de la invención, por ejemplo, cuando un agente iRNA bicatenario comprende una cadena sentido y una cadena antisentido, la cadena antisentido comprende una región de complementariedad que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos 5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3' (SEQ ID NO: 15), en donde sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena sentido y sustancialmente todos los nucleótidos de la cadena antisentido son nucleótidos modificados, y en donde la cadena sentido está conjugada a una ligando unido en el extremo 3', dicho agente en una composición farmacéutica se administra en una dosis de aproximadamente 0,200 a aproximadamente 1,825 mg/kg, 0,200 a aproximadamente 1,800 mg/kg, de aproximadamente 0,200 a aproximadamente 1,700 mg/kg, de aproximadamente 0,200. a aproximadamente 1,600 mg/kg, de aproximadamente 0,200 a aproximadamente 1,500 mg/kg, de aproximadamente 0,200 a aproximadamente 1,400 mg/kg, de aproximadamente 0,200 a aproximadamente 1,400 mg/kg, de aproximadamente 0,200 a aproximadamente 1,200 mg/kg, de aproximadamente 0,200 a aproximadamente 1,100 mg/kg, de aproximadamente 0,200 a aproximadamente 1,000 mg/kg, de aproximadamente

0,200 a aproximadamente 0,900 mg/kg, de aproximadamente 0,200 a aproximadamente 0,800 mg/kg, de aproximadamente 0,200 a aproximadamente 0,700 mg/kg, de aproximadamente 0,200 a aproximadamente 0,600 mg/kg, de aproximadamente 0,200 a aproximadamente 0,500 mg/kg, de aproximadamente 0,200 a aproximadamente 0,400 mg/kg, de aproximadamente 0,225 a aproximadamente 1,825 mg/kg, de aproximadamente 0,225 a aproximadamente 1,800 mg/kg, de aproximadamente 0,225 a aproximadamente 1,700 mg/kg, de aproximadamente 0,225 a aproximadamente 1,600 mg/kg, de aproximadamente 0,225 a aproximadamente 1,500 mg/kg, de aproximadamente 0,225 a aproximadamente 1,400 mg/kg, de aproximadamente 0,225 a aproximadamente 1,400 mg/kg, de aproximadamente 0,225 a aproximadamente 1,200 mg/kg, de aproximadamente 0,225 a aproximadamente 1,100 mg/kg, de aproximadamente 0,225 a aproximadamente 1,000 mg/kg, de aproximadamente 0,225 a aproximadamente 0,900 mg/kg, de aproximadamente 0,225 a aproximadamente 0,800 mg/kg, de aproximadamente 0,225 a aproximadamente 0,700 mg/kg, de aproximadamente 0,225 a aproximadamente 0,600 mg/kg, de aproximadamente 0,225 a aproximadamente 0,500 mg/kg, de aproximadamente 0,225 a aproximadamente 0,400 mg/kg, de aproximadamente 0,250 a aproximadamente 1,825 mg/kg, de aproximadamente 0,250 a aproximadamente 1,800 mg/kg, de aproximadamente 0,250 a aproximadamente 1,700 mg/kg, de aproximadamente 0,250 a aproximadamente 1,600 mg/kg, de aproximadamente 0,250 a aproximadamente 1,500 mg/kg, de aproximadamente 0,250 a aproximadamente 1.400 mg/kg, de aproximadamente 0,250 a aproximadamente 1,400 mg/kg, de

aproximadamente 0,250 a aproximadamente 1,200 mg/kg, de aproximadamente 0,250 a aproximadamente 1,100 mg/kg, de aproximadamente 0,250 a aproximadamente 1,000 mg/kg, de aproximadamente 0,250 a aproximadamente 0,900 mg/kg, de aproximadamente 0,250 a aproximadamente 0,800 mg/kg, de aproximadamente 0,250 a aproximadamente 0,700 mg/kg, de aproximadamente 0,250 a aproximadamente 0,600 mg/kg, de aproximadamente 0,250 a aproximadamente 0,500 mg/kg, de aproximadamente 0,250 a aproximadamente 0,400 mg/kg, de aproximadamente 0,425 a aproximadamente 1,825 mg/kg, de aproximadamente 0,425 a aproximadamente 1,800 mg/kg, de aproximadamente 0,425 a aproximadamente 1,700 mg/kg, de aproximadamente 0,425 a aproximadamente 1,600 mg/kg, de aproximadamente 0,425 a aproximadamente 1,500 mg/kg, de aproximadamente 0,425 a aproximadamente 1,400 mg/kg, de aproximadamente 0,425 a aproximadamente 1,400 mg/kg kg, aproximadamente 0,425 a aproximadamente 1,200 mg/kg, de aproximadamente 0,425 a aproximadamente 1,100 mg/kg, de aproximadamente 0,425 a aproximadamente 1,000 mg/kg, de aproximadamente 0,425 a aproximadamente 0,900 mg/kg, de aproximadamente 0,425 a aproximadamente 0,800 mg/kg, de aproximadamente 0,425 a aproximadamente 0,700 mg/kg, de aproximadamente 0,425 a aproximadamente 0,600 mg/kg, de aproximadamente 0,425 a aproximadamente 0,500 mg/kg, de aproximadamente 0,450 a aproximadamente 1,825 mg/kg, de aproximadamente 0,450 a aproximadamente 1,800 mg/kg, de aproximadamente 0,450 a aproximadamente 1,700 mg/kg, de aproximadamente 0,450 a aproximadamente 1,600 mg/kg, de aproximadamente 0,450 a aproximadamente

1,500 mg/kg, de aproximadamente 0,450 a aproximadamente 1,400 mg/kg, de aproximadamente 0,450 a aproximadamente 1,400 mg/kg, de aproximadamente 0,450 a aproximadamente 1,200 mg/kg, de aproximadamente 0,450 a aproximadamente 1,100 mg/kg, de aproximadamente 0,450 a aproximadamente 1,000 mg/kg , aproximadamente 0,450 a aproximadamente 0,900 mg/kg, de aproximadamente 0,450 a aproximadamente 0,800 mg/kg, de aproximadamente 0,450 a aproximadamente 0,700 mg/kg, de aproximadamente 0,450 a aproximadamente 0,600 mg/kg, de aproximadamente 0,450 a aproximadamente 0,500 mg/kg, de aproximadamente 0,475 a aproximadamente 1,825 mg/kg, de aproximadamente 0,475 a aproximadamente 1,800 mg/kg, de aproximadamente 0,475 a aproximadamente 1,700 mg/kg, de aproximadamente 0,475 a aproximadamente 1,600 mg/kg, de aproximadamente 0,475 a aproximadamente 1,500 mg/kg, de aproximadamente 0,475 a aproximadamente 1,400 mg/kg, de aproximadamente 0,475 a aproximadamente 1,400 mg/kg, de aproximadamente 0,475 a aproximadamente 1,200 mg/kg, de aproximadamente 0,475 a aproximadamente 1,100 mg/kg, de aproximadamente 0,475 a aproximadamente 1,000 mg/kg, de aproximadamente 0,475 a aproximadamente 0,900 mg/kg, de aproximadamente 0,475 a aproximadamente 0,800 mg/kg, de aproximadamente 0,475 a aproximadamente 0,700 mg/kg, de aproximadamente 0,475 a aproximadamente 0,600 mg/kg, de aproximadamente 0,475 a aproximadamente 0,500 mg/kg, de aproximadamente 0,875 a aproximadamente 1,825 mg/kg, de aproximadamente 0,875 a aproximadamente 1,800 mg/kg, de aproximadamente 0,875 a aproximadamente 1,700 mg/kg, de aproximadamente 0,875 a

aproximadamente 1,600 mg/kg, de aproximadamente 0,875 a aproximadamente 1,500 mg/kg, de aproximadamente 0,875 a aproximadamente 1,400 mg/kg, de aproximadamente 0,875 a aproximadamente 1,400 mg/kg, de aproximadamente 0,875 a aproximadamente 1,200 mg/kg, de aproximadamente 0,875 a aproximadamente 1,100 mg/kg, de aproximadamente 0,875 a aproximadamente 1,000 mg/kg, de aproximadamente 0,875 a aproximadamente 0,900 mg/kg, de aproximadamente 0,900 a aproximadamente 1,825 mg/kg, de aproximadamente 0,900 a aproximadamente 1,800 mg/kg, de aproximadamente 0,900 a aproximadamente 1,700 mg/kg, de aproximadamente 0,900 a aproximadamente 1,600 mg/kg, de aproximadamente 0,900 a aproximadamente 1,500 mg/kg, de aproximadamente 0,900 a aproximadamente 1,400 mg/kg, de aproximadamente 0,900 a aproximadamente 1,400 mg/kg, de aproximadamente 0,900 a aproximadamente 1,200 mg/kg, de aproximadamente 0,900 a aproximadamente 1,100 mg/kg, de aproximadamente 0,900 a aproximadamente 1,000 mg/kg, de aproximadamente 0,925 a aproximadamente 1,825 mg/kg, de aproximadamente 0,925 a aproximadamente 1,800 mg/kg, de aproximadamente 0,925 a aproximadamente 1,700 mg/kg, de aproximadamente 0,925 a aproximadamente 1,600 mg/kg, de aproximadamente 0,925 a aproximadamente 1,500 mg/kg, de aproximadamente 0,925 a aproximadamente 1.400 mg/kg, de aproximadamente 0,925 a aproximadamente 1.400 mg/kg, de aproximadamente 0,925 a aproximadamente 1.200 mg/kg, de aproximadamente 0,925 a aproximadamente 1.100 mg/kg o aproximadamente 0,925 a aproximadamente 1.000 mg /kg. Los valores e intervalos intermedios a los valores citados anteriormente también

pretenden ser Parte de esta invención, por ejemplo, el agente iRNA se puede administrar al sujeto en una dosis de aproximadamente 0,015 mg/kg a aproximadamente 0,45 mg/kg.

Por ejemplo, el agente iRNA, e.g., el agente iRNA en una composición farmacéutica, se puede administrar en una dosis de aproximadamente 0,2 mg/kg, 0,225 mg/kg, 0,25 mg/kg, 0,275 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,325 mg/kg, 0,35 mg/kg, 0,375 mg/kg, 0,4 mg/kg, 0,425 mg/kg, 0,45 mg/kg, 0,475 mg/kg, de aproximadamente 0,5 mg/kg, 0,525 mg/kg, 0,55 mg/kg, 0,575 mg/kg, de aproximadamente 0,6 mg/kg, 0,625 mg/kg, 0,65 mg/kg, 0,675 mg/kg, de aproximadamente 0,7 mg/kg, 0,725 mg/kg, 0,75 mg/kg, 0,775 mg/kg, de aproximadamente 0,8 mg/kg, 0,925 mg/kg, 0,95 mg/kg, 0.975 mg/kg, de aproximadamente 1,0 mg/kg, 1,025 mg/kg, 1,05 mg/kg, 1,075 mg/kg, de aproximadamente 1,1 mg/kg, 1,125 mg/kg, 1,15 mg/kg, 1,175 mg/kg, de aproximadamente 1,2 mg/kg, 1,225 mg/kg, 1,25 mg/kg, 1,275 mg/kg, de aproximadamente 1,3 mg/kg, 1,325 mg/kg, 1,35 mg/kg, 1,375 mg/kg, de aproximadamente 1,4 mg/kg, 1,425 mg/kg, 1,45 mg/kg, 1,475 mg/kg, de aproximadamente 1,5 mg/kg, 1,525 mg/kg, 1,55 mg/kg, 1,575 mg/kg, de aproximadamente 1,6 mg/kg, 1,625 mg/kg, 1,65 mg/kg, 1,675 mg/kg, de aproximadamente 1,7 mg/kg, 1,725 mg/kg, 1,75 mg/kg, 1,775 mg/kg, o aproximadamente 1,8 mg/kg. Los valores intermedios a los valores citados anteriormente también pretenden ser Parte de esta invención.

En alguna implementación, una composición farmacéutica que comprende el agente iRNA se administra a un sujeto como una dosis fija. Una "dosis fija" (e.g., una dosis en mg) significa que se usa una dosis de un agente iRNA para todos los sujetos independientemente de cualquier factor específico relacionado con el sujeto, como el peso. En una implementación particular, una dosis fija de un agente iRNA de la invención se basa en un peso o edad predeterminados.

En algunas implementaciones, la composición farmacéutica que comprende el agente iRNA se administra como una dosis fija de entre aproximadamente 25 mg a aproximadamente 100 mg, e.g., entre aproximadamente 25 mg a aproximadamente 95 mg, entre aproximadamente 25 mg a aproximadamente 90 mg, entre aproximadamente 25 mg a aproximadamente 85 mg, entre aproximadamente 25 mg a aproximadamente 80 mg, entre aproximadamente 25 mg a aproximadamente 75 mg, entre aproximadamente 25 mg a aproximadamente 70 mg, entre aproximadamente 25 mg a aproximadamente 65 mg, entre aproximadamente 25 mg a aproximadamente 60 mg, entre aproximadamente 25 mg a aproximadamente 50 mg, entre aproximadamente 50 mg a aproximadamente 100 mg, entre aproximadamente 50 mg a aproximadamente 95 mg, entre aproximadamente 50 mg a aproximadamente 90 mg, entre aproximadamente 50 mg a aproximadamente 85 mg, entre aproximadamente 50 mg a aproximadamente 80 mg, entre aproximadamente 30 mg a aproximadamente 100 mg, entre aproximadamente 30 mg a aproximadamente 90 mg, entre aproximadamente 30 mg a aproximadamente 80

mg, entre aproximadamente 40 mg a aproximadamente 100 mg, entre aproximadamente 40 mg a aproximadamente 90 mg, entre aproximadamente 40 mg a aproximadamente 80 mg, entre aproximadamente 60 mg a aproximadamente 100 mg, entre aproximadamente 60 mg a aproximadamente 90 mg, entre aproximadamente 25 mg a aproximadamente 55 mg, entre aproximadamente 30 mg a aproximadamente 95 mg, entre aproximadamente 30 mg a aproximadamente 85 mg, entre aproximadamente 30 mg a aproximadamente 75 mg, entre aproximadamente 30 mg a aproximadamente 65 mg, entre aproximadamente 30 mg a aproximadamente 55 mg, entre aproximadamente 40 mg a aproximadamente 95 mg, entre aproximadamente 40 mg a aproximadamente 85 mg, entre aproximadamente 40 mg a aproximadamente 75 mg, entre aproximadamente 40 mg a aproximadamente 65 mg, entre aproximadamente 40 mg a aproximadamente 55 mg, o entre aproximadamente 45 mg a aproximadamente 95 mg.

En algunas implementaciones, la composición farmacéutica que comprende el agente iRNA se administra como una dosis fija aproximadamente 25 mg, aproximadamente 30 mg, aproximadamente 35 mg, aproximadamente 40 mg, aproximadamente 45 mg, aproximadamente 50 mg, aproximadamente 55 mg, aproximadamente 60 mg, aproximadamente 65 mg, aproximadamente 70 mg, aproximadamente 75 mg, aproximadamente 80 mg, aproximadamente 85 mg, aproximadamente 90 mg, aproximadamente 95 mg, o aproximadamente 100 mg.

Una composición farmacéutica que comprende el iRNA se puede administrar al sujeto aproximadamente una vez al mes, aproximadamente una vez cada cinco semanas, aproximadamente una vez cada seis semanas, aproximadamente una vez cada 2 meses, o una vez por trimestre.

Una composición farmacéutica que comprende el agente iRNA se puede administrar a un sujeto en una o más dosis. En algunas implementaciones, las composiciones farmacéuticas que comprenden el agente iRNA bicatenario se pueden administrar a un sujeto como una dosis mensual de aproximadamente 0,200 mg/kg a aproximadamente 0,250 mg/kg, una dosis mensual de aproximadamente 0,425 mg/kg a aproximadamente 0,475 mg/kg, una dosis mensual de aproximadamente 0,875 mg/kg a aproximadamente 0,925 mg/kg, o como una dosis mensual de aproximadamente 1,775 mg/kg a aproximadamente 1,825 mg/kg. En algunas implementaciones, las composiciones farmacéuticas que comprenden el agente iRNA bicatenario se pueden administrar a un sujeto como una dosis fija de aproximadamente 25 mg a aproximadamente 100 mg, e.g., aproximadamente 25 mg, aproximadamente 50 mg, aproximadamente 80 mg, o aproximadamente 100 mg.

La composición farmacéutica se puede administrar por infusión intravenosa durante un período de tiempo, tal como más de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, y 21, 22, 23, 24, o aproximadamente un período de 25 minutos.

La administración se puede repetir, por ejemplo, de forma regular, como semanal, quincenal (i.e., cada dos semanas), mensual, cada dos meses, cada tres meses, cada cuatro meses o más. Después de un régimen de tratamiento inicial, los tratamientos se pueden administrar con menos frecuencia. Por ejemplo, después de la administración semanal o quincenal durante tres meses, la administración se puede repetir una vez al mes, durante seis meses o un año o más.

La composición farmacéutica se puede administrar una vez al día, o el iRNA se puede administrar en dos, tres o más subdosis a intervalos apropiados a lo largo del día o incluso usando infusión o administración continua a través de una formulación de liberación controlada. En ese caso, el iRNA contenido en cada subdosis debe ser correspondientemente más pequeño para alcanzar la dosis diaria total. La unidad de dosificación también se puede componer para la administración durante varios días, e.g., utilizando una formulación de liberación sostenida convencional que proporciona una liberación sostenida del iRNA durante un período de varios días. Las formulaciones de liberación sostenida son bien conocidas en el arte y son particularmente útiles para la administración de agentes en un sitio particular, tal como se podría usar con los agentes de la presente invención. En esta implementación, la unidad de dosificación contiene un múltiplo correspondiente de la dosis diaria.

En otras implementaciones, una sola dosis de las composiciones farmacéuticas puede ser de larga duración, de manera que las dosis posteriores se administran a intervalos de no más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 semanas. En algunas implementaciones de la invención, una sola dosis de las composiciones farmacéuticas de la invención se administra una vez al mes.

El versado en el arte apreciará que ciertos factores pueden influir en la dosificación y el tiempo requeridos para tratar efectivamente a un sujeto, incluyendo, pero sin limitarse a, la gravedad de la enfermedad o trastorno, tratamientos previos, la salud general y/o la edad del sujeto, y otras enfermedades presentes. Además, el tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición puede incluir un único tratamiento o una serie de tratamientos. Los estimados de las dosificaciones efectivas y el tiempo de vida media *in vivo* para los iRNA individuales abarcados por la invención se pueden realizar usando metodologías convencionales o sobre la base de pruebas *in vivo* usando un modelo animal apropiado, como se describe en otra Parte de este documento.

Los avances en la genética del ratón han generado una serie de modelos de ratón para el estudio de diversas enfermedades humanas, como un trastorno hemorrágico que se beneficiaría de la reducción en la expresión de Serpinc1. Dichos modelos se pueden usar para pruebas *in vivo* de iRNA, así como para determinar una dosis terapéuticamente efectiva. Los modelos de ratón adecuados

son conocidos en el arte e incluyen, por ejemplo, modelos de ratón para Hemofilia A y modelos de ratón para Hemofilia B, e.g., ratones que contienen una inactivación de un gen del factor de coagulación, tales como los descritos en Bolliger, *et al.* (2010) *Thromb Haemost* 103:1233-1238, Bi L, *et al.* (1995) *Nat Genet* 10: 119–21, Lin *et al.* (1997) *Blood* 90: 3962–6, Kundu *et al.* (1998) *Blood* 92: 168–74, Wang *et al.* (1997) *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 11563–6, y Jin, *et al.* (2004) *Blood* 104:1733.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar de varias maneras dependiendo de si se desea un tratamiento local o sistémico y de la zona a tratar. La administración puede ser tópica (e.g., mediante un parche transdérmico), pulmonar, e.g., por inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, que incluye por nebulizador; intratraqueal, intranasal, epidérmico y transdérmico, oral o parenteral. La administración parenteral incluye inyección o infusión intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular; subdérmico, e.g., a través de un dispositivo implantado; o intracraneal, e.g., por administración intraparenquimatosa, intratecal o intraventricular.

El iRNA se puede administrar de una manera para dirigirse a un tejido particular, tal como el hígado (e.g., los hepatocitos del hígado).

Las composiciones y formulaciones farmacéuticas para administración tópica pueden incluir parches transdérmicos, ungüentos, lociones, cremas, geles,

gotas, supositorios, aerosoles, líquidos y polvos. Los vehículos farmacéuticos convencionales, bases acuosas, en polvo o aceitosas, espesantes y similares pueden ser necesarios o deseables. Los condones recubiertos, guantes y similares también pueden ser útiles. Las formulaciones tópicas adecuadas incluyen aquellas en las que los iRNA presentados en la invención están mezclados con un agente de suministro tópico tal como lípidos, liposomas, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, esteroides, agentes quelantes y surfactantes. Las formulaciones tópicas se describen en detalle en la patente de los Estados Unidos Nº. 6,747,014, que se incorpora aquí como referencia.

A. Formulaciones adicionales

i. Emulsiones

Las composiciones de la presente invención se pueden preparar y formular como emulsiones. Las emulsiones son típicamente sistemas heterogéneos de un líquido dispersado en otro en forma de gotitas que usualmente exceden 0,1µm de diámetro (ver, e.g., Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199; Rosoff, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Volume 1, p. 245;

Block in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 2, p. 335; Higuchi *et al*., in Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 301). Las emulsiones a menudo son sistemas bifásicos que comprenden dos fases líquidas inmiscibles íntimamente mezcladas y dispersas entre sí. En general, las emulsiones pueden ser de agua en aceite (w/o) de aceite en agua (o/w). Cuando una fase acuosa se divide finamente y se dispersa en pequeñas gotas en una fase oleosa masiva, la composición resultante se denomina emulsión de agua en aceite (w/o). Alternativamente, cuando una fase oleosa se divide finamente y se dispersa en forma de gotas diminutas en una fase acuosa masiva, la composición resultante se denomina emulsión de aceite en agua (o/w). Las emulsiones pueden contener componentes adicionales además de las fases dispersas, y el fármaco activo que puede estar presente como una solución en la fase acuosa, la fase oleosa o en sí misma como una fase separada. Los excipientes farmacéuticos tales como emulsionantes, estabilizantes, colorantes y antioxidantes también pueden estar presentes en las emulsiones según sea necesario. Las emulsiones farmacéuticas también pueden ser emulsiones múltiples que se componen de más de dos fases, como, por ejemplo, en el caso del aceite en agua en aceite (o/w/o) y el agua en aceite en emulsiones de agua (w/o/w). Tales formulaciones complejas a menudo proporcionan ciertas ventajas que las emulsiones binarias simples no tienen. Las emulsiones múltiples en las que las gotitas de aceite individuales de una emulsión o/w encierran pequeñas gotas de agua constituyen una emulsión

w/o/w. Asimismo, un sistema de gotitas de aceite encerrado en glóbulos de agua estabilizada en una fase continua oleosa proporciona una emulsión o/w/o.

Las emulsiones se caracterizan por poca o ninguna estabilidad termodinámica. A menudo, la fase dispersa o discontinua de la emulsión se dispersa bien en la fase externa o continua y se mantiene en esta forma a través de los emulsionantes o la viscosidad de la formulación. Cualquiera de las fases de la emulsión puede ser semisólida o sólida, como es el caso de las bases y cremas de ungüentos de tipo emulsión. Otros medios de estabilización de emulsiones implican el uso de emulsionantes que pueden incorporarse en cualquiera de las fases de la emulsión. Los emulsionantes se pueden clasificar en cuatro categorías: surfactantes sintéticos, emulsionantes naturales, bases de absorción y sólidos finamente dispersos (ver, e.g., Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199).

Los surfactantes sintéticos, también conocidos como agentes activos de superficie, han encontrado amplia aplicabilidad en la formulación de emulsiones y han sido revisados en la bibliografía (ver, e.g., Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rieger, in

Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 285; Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, volume 1, p. 199). Los surfactantes son típicamente anfifílicos y comprenden una Parte hidrófila y una Parte hidrofóbica. La relación de la naturaleza hidrófila a la hidrófoba del surfactante se ha denominado equilibrio hidrófilo/lipófilo (HLB) y es una herramienta valiosa para categorizar y seleccionar surfactantes en la preparación de formulaciones. Los surfactantes se pueden clasificar en diferentes clases con base en la naturaleza del grupo hidrofílico: no iónico, aniónico, catiónico y anfótero (ver, e.g.,, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY Rieger, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 285).

Los emulsionantes de origen natural utilizados en formulaciones en emulsión incluyen lanolina, cera de abejas, fosfátidos, lecitina y acacia. Las bases de absorción poseen propiedades hidrofílicas tales que pueden absorber agua para formar emulsiones w/o y retener aún su consistencia semisólida, tal como lanolina anhidra y vaselina hidrofílica. Los sólidos finamente divididos también se han usado como buenos emulsionantes especialmente en combinación con agentes surfactantes y en preparaciones viscosas. Estos incluyen sólidos inorgánicos polares, tales como hidróxidos de metales pesados, arcillas no

inchables tales como bentonita, atapulgita, hectorita, caolín, montmorillonita, silicato de aluminio coloidal y silicato de aluminio magnésico coloidal, pigmentos y sólidos no polares tales como carbón o triestearato de glicerilo.

También se incluyen en formulaciones en emulsión una gran variedad de materiales no emulsionantes y contribuyen a las propiedades de las emulsiones. Estos incluyen grasas, aceites, ceras, ácidos grasos, alcoholes grasos, ésteres grasos, humectantes, coloides hidrófilos, conservantes y antioxidantes (Block, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 335; Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199).

Los coloides hidrófilos o hidrocoloides incluyen gomas naturales y polímeros sintéticos como polisacáridos (e.g., goma arábiga, agar, ácido algínico, carragenina, goma guar, goma karaya y tragacanto), derivados de celulosa (e.g., carboximetilcelulosa y carboxipropilcelulosa) y polímeros sintéticos (e.g., carbómeros, éteres de celulosa y polímeros de carboxivinilo). Estos se dispersan o se hinchan en agua para formar soluciones coloidales que estabilizan las emulsiones formando fuertes películas interfaciales de aproximadamente las gotitas de fase dispersa y aumentando la viscosidad de la fase externa.

Dado que las emulsiones a menudo contienen varios ingredientes, tales como carbohidratos, proteínas, esteroles y fosfátidos, que pueden favorecer fácilmente el crecimiento de microbios, estas formulaciones a menudo incorporan conservantes. Los conservantes comúnmente usados incluidos en las formulaciones en emulsión incluyen metilparabeno, propilparabeno, sales de amonio cuaternario, cloruro de benzalconio, ésteres de ácido p-hidroxibenzoico y ácido bórico. Los antioxidantes también se añaden comúnmente a las formulaciones en emulsión para evitar el deterioro de la formulación. Los antioxidantes utilizados pueden ser eliminadores de radicales libres como tocoferoles, galatos de alquilo, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado o agentes reductores como ácido ascórbico y metabisulfito de sodio, y sinergistas antioxidantes como ácido cítrico, ácido tartárico y lecitina.

La aplicación de formulaciones en emulsión a través de rutas dermatológicas, orales y parenterales y métodos para su fabricación se han revisado en la literatura (ver, e.g., Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199). Las formulaciones de emulsión para administración oral se han usado ampliamente debido a la facilidad de formulación, así como a la eficacia desde un punto de vista de absorción y biodisponibilidad (ver, e.g., Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich

NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245; Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199). Los laxantes a base de aceite mineral, vitaminas solubles en aceite y preparaciones nutritivas con alto contenido de grasa se encuentran entre los materiales que comúnmente se han administrado por vía oral como emulsiones o/w.

ii. Microemulsiones

En una implementación de la presente invención, las composiciones iRNA y ácidos nucleicos se formulan como microemulsiones. Una microemulsión se puede definir como un sistema de agua, aceite y anfífilo que es una única solución líquida ópticamente isotrópica y termodinámicamente estable (ver, e.g., Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245). Típicamente, las microemulsiones son sistemas que se preparan dispersando primero un aceite en una solución acuosa surfactante y luego añadiendo una cantidad suficiente de un cuarto componente, generalmente un alcohol de longitud de cadena intermedia para formar un sistema transparente. Por lo tanto, las microemulsiones también se

han descrito como dispersiones termodinámicamente estables, isotrópicamente claras de dos líquidos inmiscibles que se estabilizan mediante películas interfaciales de moléculas de superficie activa (Leung and Shah, in: Controlled Release of Drugs: Polymers and Aggregate Systems, Rosoff, M., Ed., 1989, VCH Publishers, New York, pages 185-215). Las microemulsiones comúnmente se preparan mediante una combinación de tres a cinco componentes que incluyen aceite, agua, surfactante, cosurfactante y electrolito. Si la microemulsión es del tipo agua en aceite (w/o) o de aceite en agua (o/w) depende de las propiedades del aceite y del agente surfactante utilizado y de la estructura y el empaquetamiento geométrico de las cabezas polares y las colas hidrocarbonadas de las moléculas surfactantes (Schott, in Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 271).

El enfoque fenomenológico que utiliza diagramas de fase se ha estudiado extensamente y ha proporcionado un conocimiento exhaustivo, para un versado en el arte, de cómo formular microemulsiones (ver, e.g., Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245; Block, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 335). En comparación con las emulsiones convencionales, las microemulsiones ofrecen la ventaja de solubilizar fármacos

insolubles en agua en una formulación de gotitas termodinámicamente estables que se forman espontáneamente.

Los surfactantes usados en la preparación de microemulsiones incluyen, pero no se limitan a, surfactantes iónicos, surfactantes no iónicos, Brij 96, polioxietilen oleil éteres, ésteres de ácidos grasos de poliglicerol, monolaurato de tetraglicerol (ML310), monooleato de tetraglicerol (MO310), monooleato de hexaglicerol (PO310), pentaoleato de hexaglicerol (PO500), monocaprato de decaglicerol (MCA750), monooleato de decaglicerol (MO750), sesquioleato de decaglicerol (SO750), decaoleato de decaglicerol (DAO750), solo o en combinación con co-surfactantes- El cosurfactante, usualmente un alcohol de cadena corta tal como etanol, 1-propanol y 1-butanol, sirve para aumentar la fluidez interfacial al penetrar en la película de surfactante y consecuentemente crear una película desordenada debido al espacio vacío generado entre las moléculas de surfactante. Sin embargo, las microemulsiones se pueden preparar sin el uso de cosurfactantes y los sistemas de microemulsión autoemulsionante exentos de alcohol son conocidos en el arte. La fase acuosa puede ser típicamente, pero no se limitan a, a, agua, una solución acuosa del fármaco, glicerol, PEG300, PEG400, poligliceroles, propilenglicoles y derivados de etilenglicol. La fase oleosa puede incluir, pero no se limita a, materiales tales como Captex 300, Captex 355, Capmul MCM, ésteres de ácidos grasos, mono, di y triglicéridos de cadena media (C8-C12), ésteres de ácidos grasos de glicerilo

polioxietilados, alcoholes grasos, glicéridos poliglicolizados, glicéridos C8-C10 poliglicolizados saturados, aceites vegetales y aceite de silicona.

Las microemulsiones son particularmente interesantes desde el punto de vista de la solubilización del fármaco y la absorción mejorada de fármacos. Se han propuesto microemulsiones con base en lípidos (tanto o/w como w/o) para potenciar la biodisponibilidad oral de fármacos, incluidos péptidos (ver, e.g., Patentes de los Estados Unidos Nos. 6,191,105; 7,063,860; 7,070,802; 7,157,099; Constantinides *et al*., *Pharmaceutical Research*, 1994, 11, 1385-1390; Ritschel, *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol*., 1993, 13, 205). Las microemulsiones proporcionan ventajas de solubilización mejorada del fármaco, protección del fármaco de la hidrólisis enzimática, posible mejora de la absorción del fármaco debido a alteraciones inducidas por surfactante en la fluidez y permeabilidad de la membrana, facilidad de preparación, facilidad de administración oral sobre las formas de dosificación sólidas, potencia clínica mejorada y disminución de la toxicidad ver, e.g., Patentes de los Estados Unidos Nos. 6,191,105; 7,063,860; 7,070,802; 7,157,099; Constantinides *et al*., *Pharmaceutical Research*, 1994, 11, 1385; Ho *et al*., *J. Pharm. Sci.,* 1996, 85, 138-143). A menudo, las microemulsiones se pueden formar espontáneamente cuando sus componentes se juntan a temperatura ambiente. Esto puede ser particularmente ventajoso cuando se formulan fármacos termolábiles, péptidos o los iRNA. Las microemulsiones también han sido efectivas en la administración transdérmica de componentes activos tanto en aplicaciones cosméticas como farmacéuticas. Se

espera que las composiciones de microemulsión y las formulaciones de la presente invención faciliten la absorción sistémica incrementada de los iRNA y ácidos nucleicos del tracto gastrointestinal, así como también mejoren la captación celular local de los iRNA y ácidos nucleicos.

Las microemulsiones de la presente invención también pueden contener componentes y aditivos adicionales tales como monoestearato de sorbitán (Grill 3), Labrasol y potenciadores de la penetración para mejorar las propiedades de la formulación y potenciar la absorción de los iRNA y ácidos nucleicos de la presente invención. Los potenciadores de la penetración usados en las microemulsiones de la presente invención se pueden clasificar como pertenecientes a una de cinco categorías amplias: surfactantes, ácidos grasos, sales biliares, agentes quelantes y no surfactantes no quelantes (Lee *et al*., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p. 92). Cada una de estas clases se ha discutido anteriormente.

iii. MicroParteículas

Un agente iRNA de la invención se puede incorporar en una Parteícula, e.g., una microParteícula. Las microParteículas se pueden producir por secado por pulverización, pero también se pueden producir por otros métodos que incluyen liofilización, evaporación, secado en lecho fluido, secado al vacío o una combinación de estas técnicas.

iv. Potenciadores de penetración

En una implementación, la presente invención emplea diversos potenciadores de penetración para efectuar la administración eficiente de ácidos nucleicos, particularmente los Irna, a la piel de animales. La mayoría de los fármacos están presentes en solución en formas ionizadas y no ionizadas. Sin embargo, habitualmente solo los fármacos lípidosoluble o lipófilicos cruzan fácilmente las membranas celulares. Se ha descubierto que incluso los fármacos no lipófilicos pueden atravesar las membranas celulares si la membrana que se va a cruzar se trata con un potenciador de la penetración. Además de ayudar a la difusión de fármacos no lipófilicos a través de las membranas celulares, los potenciadores de la penetración también mejoran la permeabilidad de los fármacos lipofílicos.

Los potenciadores de la penetración se pueden clasificar como pertenecientes a una de cinco categorías amplias, i.e., surfactantes, ácidos grasos, sales biliares, agentes quelantes y no surfactantes no quelantes (ver, e.g., Malmsten, M. Surfactants and polymers in drug delivery, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee *et al*., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p.92). Cada una de las clases de potenciadores de la penetración mencionadas anteriormente se describe a continuación con mayor detalle.

Los surfactantes (o "agentes activos de superficie") son entidades químicas que, cuando se disuelven en una solución acuosa, reducen la tensión superficial

de la solución o la tensión interfacial entre la solución acuosa y otro líquido, con el resultado que se mejora la absorción de los iRNA a través del la mucosa. Además de sales biliares y ácidos grasos, estos potenciadores de la penetración incluyen, por ejemplo, lauril sulfato de sodio, polioxietileno-9-lauril éter y polioxietileno-20-cetil éter) (ver, e.g., Malmsten, M. Surfactants and polymers in drug delivery, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee *et al*., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p.92); and perfluorochemical emulsions, such as FC-43. Takahashi *et al*., *J. Pharm. Pharmacol.*, 1988, 40, 252).

Diversos ácidos grasos y sus derivados que actúan como potenciadores de la penetración incluyen, por ejemplo, ácido oleico, ácido láurico, ácido cáprico (ácido n-decanoico), ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoleico, ácido linolénico, dicaprato, tricaprato, monooleína (1-monooleoil-rac-glicerol), dilaurina, ácido caprílico, ácido araquidónico, glicerol 1-monocaprato, 1-dodecilazacicloheptan-2-ona, acilcarnitinas, acilcolinas, ésteres alquílicos C_{1-20} de los mismos (e.g., metilo, isopropilo y t- butilo), y mono y diglicéridos de los mismos (i.e., oleato, laurato, caprato, miristato, palmitato, estearato, linoleato, etc.) (ver, e.g., Touitou, E., *et al.* Enhancement in Drug Delivery, CRC Press, Danvers, MA, 2006; Lee *et al*., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p.92; Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33; El Hariri *et al*., *J. Pharm. Pharmacol*., 1992, 44, 651-654).

El papel fisiológico de la bilis incluye la facilitación de la dispersión y absorción de lípidos y vitaminas liposolubles (ver, e.g., ., Malmsten, M. Surfactants and polymers in drug delivery, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Brunton, Chapter 38 in: Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9th Ed., Hardman *et al*. Eds., McGraw-Hill, New York, 1996, pp. 934-935). Diversas sales biliares naturales y sus derivados sintéticos actúan como potenciadores de la penetración. Por lo tanto, el término "sales biliares" incluye cualquiera de los componentes naturales de la bilis así como cualquiera de sus derivados sintéticos. Las sales biliares adecuadas incluyen, por ejemplo, ácido cólico (o su sal de sodio farmacéuticamente aceptable, colato de sodio), ácido dehidrocólico (dehidrocolato de sodio), ácido deoxicólico (desoxicolato de sodio), ácido glucólico (glucolato de sodio), ácido glicolico (glicocolato de sodio), ácido glicodesoxicólico (glicodesoxicolato de sodio), ácido taurocólico (taurocolato de sodio), ácido taurodesoxicólico (taurodesoxicolato de sodio), ácido quenodesoxicólico (quenodesoxicolato de sodio), ácido ursodesoxicólico (UDCA), sodio tauro-24, 25-dihidro-fusidato (STDHF), glicodihidrofusidato de sodio y polioxietileno-9-lauril éter (POE) (ver, e.g., Malmsten, M. Surfactants and polymers in drug delivery, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee *et al*., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, page 92; Swinyard, Chapter 39 In: Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990, pages 782-783; Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33; Yamamoto *et al*., *J.*

Pharm. Exp. Ther., 1992, 263, 25; Yamashita *et al*., *J. Pharm. Sci*., 1990, 79, 579-583).

Los agentes quelantes, como se usan en conexión con la presente invención, se pueden definir como compuestos que eliminan iones metálicos de la solución formando complejos con los mismos, con el resultado que se mejora la absorción de los iRNA a través de la mucosa. Con respecto a su uso como potenciadores de penetración en la presente invención, los agentes quelantes tienen la ventaja adicional de servir también como inhibidores de DNasa, ya que la mayoría de las DNA nucleasas se caracterizan por requerir un ion metálico divalente para catálisis y son inhibidas por los agentes quelantes (Jarrett, *J. Chromatogr.*, 1993, 618, 315-339). Los agentes quelantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, etilendiaminotetraacetato disódico (EDTA), ácido cítrico, salicilatos (e.g., salicilato de sodio, 5-metoxisalicilato y homovanilato), derivados de N-acilo de colágeno, laureth-9 y derivados de N-amino acilo de beta- dicetonas (enaminas) (ver, e.g., Katdare, A. *et al.*, Excipient development for pharmaceutical, biotechnology, and drug delivery, CRC Press, Danvers, MA, 2006; Lee *et al*., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, page 92; Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33; Buur *et al*., *J. Control Rel.*, 1990, 14, 43-51).

Como se usa en el presente documento, los compuestos potenciadores de la penetración no quelantes no surfactantes se pueden definir como compuestos

que demuestran actividad insignificante como agentes quelantes o como surfactantes, pero que sin embargo mejoran la absorción de los iRNA a través de la mucosa alimentaria (ver, e.g., Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33). Esta clase de potenciadores de la penetración incluye, por ejemplo, ureas cíclicas insaturadas, derivados de 1-alquil- y 1-alquenilazacicloalcanona (Lee *et al*., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, page 92); y agentes antiinflamatorios no esteroideos tales como diclofenaco sódico, indometacina y fenilbutazona (Yamashita *et al*., *J. Pharm. Pharmacol*., 1987, 39, 621-626).

Los agentes que potencian la captación de los iRNA a nivel celular también se pueden añadir a las composiciones farmacéuticas y de otro tipo de la presente invención. Por ejemplo, lípidos catiónicos, tales como lipofectina (Junichi et al., Patente de los Estados Unidos No. 5,705,188), derivados de glicerol catiónicos y moléculas policatiónicas, tales como polilisina (Lollo *et al.,* Solicitud PCT WO 97/30731) , también se sabe que potencian la captación celular de los dsRNA. Los ejemplos de reactivos de transfección disponibles comercialmente incluyen, por ejemplo, Lipofectamine™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), Lipofectamine 2000™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), 293fectin™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), Cellfectin™ (Invitrogen; Carlsbad, CA) , DMRIE-C™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), FreeStyle™ MAX (Invitrogen; Carlsbad, CA), Lipofectamine™ 2000 CD (Invitrogen; Carlsbad, CA), Lipofectamine™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), iRNAMAX (Invitrogen; Carlsbad, CA), Oligofectamine™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), Optifect™ (Invitrogen; Carlsbad,

CA), Reactivo de transfección X-tremeGENE Q2 (Roche; Grenzacherstrasse, Suiza), Reactivo de transfección Liposomal DOTAP (Grenzacherstrasse, Suiza), Reactivo de transfección Liposomal DOSPER (Grenzacherstrasse, Suiza), o Fugene (Grenzacherstrasse, Suiza), reactivo Transfectam® (Promega; Madison, WI), reactivo de transfección TransFast™ (Promega; Madison, WI), reactivo Tfx™ -20 (Promega; Madison, WI), reactivo Tfx™-50 (Promega; Ma dison, WI), DreamFect™ (OZ Biosciences; Marsella, Francia), EcoTransfect (OZ Biosciences, Marsella, Francia), Reactivo de transfección TransPassª D1 (New England Biolabs; Ipswich, MA, USA.), LyoVec™/LipoGen™ (Invitrogen, San Diego, CA, USA),Reactivo de transfección PerFectin (Genlantis, San Diego, CA, USA), reactivo de transfección NeuroPORTER (Genlantis, San Diego, CA, USA), reactivo de transfección GenePORTER (Genlantis, San Diego, CA, USA), reactivo de transfección GenePORTER 2 (Genlantis, San Diego, CA , USA), reactivo de transfección Cytofectin (Genlantis, San Diego, CA, USA), reactivo de transfección BaculoPORTER (Genlantis, San Diego, CA, USA), reactivo de transfección TroganPORTER™ (Genlantis, San Diego, CA, USA), RiboFect (Bioline Taunton, MA, USA), PlasFect (Bioline, Taunton, MA, USA), UniFECTOR (B-Bridge International, Mountain View, CA, USA), SureFECTOR (B-Bridge International, Mountain View, CA, USA) O HiFect™ (B-Bridge International, Mountain View, CA, USA), entre otros. Se pueden utilizar otros agentes para mejorar la penetración de los ácidos nucleicos administrados, que incluyen glicoles tales como etilenglicol y propilenglicol, pirroles tales como 2-pirrol, azonas y terpenos tales como limoneno y mentona.

v. Vehículo

Ciertas composiciones de la presente invención también incorporan compuestos vehículo en la formulación. Como se usa en el presente documento, "compuesto vehúlo" o "vehículo" se puede referir a un ácido nucleico, o análogo del mismo, que es inerte (i.e., no posee actividad biológica *per se*) pero se reconoce como un ácido nucleico por procesos *in vivo* que reducen la biodisponibilidad de un ácido nucleico que tiene actividad biológica, por ejemplo, degradando el ácido nucleico biológicamente activo o promoviendo su eliminación de la circulación. La co-administración de un ácido nucleico y un compuesto vehículo, típicamente con un exceso de la última sustancia, puede dar como resultado una reducción sustancial de la cantidad de ácido nucleico recuperado en el hígado, el riñón u otros depósitos extracirculatorios, presumiblemente debido a la competencia entre el compuesto vehiculo y el ácido nucleico por un receptor común. Por ejemplo, la recuperación de un dsRNA parcialmente fosforotioato en el tejido hepático se puede reducir cuando se codministra con ácido polinosínico, sulfato de dextrano, ácido policitidico o ácido 4-acetamido-4'isotiociano-estilbeno-2,2'-disulfónico (Miyao *et al*., DsRNA Res. Dev., 1995, 5, 115-121; Takakura *et al*., DsRNA & Nucl. Acid Drug Dev., 1996, 6, 177-183.

vi. Excipientes

En contraste con un compuesto vehículo, un "vehículo farmacéutico" o "excipiente" es un solvente farmacéuticamente aceptable, un agente de suspensión o cualquier otro vehículo farmacológicamente inerte para administrar

uno o más ácidos nucleicos a un animal. El excipiente puede ser líquido o sólido y se selecciona teniendo en cuenta la forma de administración planificada, para proporcionar el volumen, la consistencia, etc. deseados, cuando se combina con un ácido nucleico y los otros componentes de una composición farmacéutica dada. Los vehículos farmacéuticos típicos incluyen, pero no se limitan a,, agentes de unión (e.g., almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa, etc.); rellenos (e.g., lactosa y otros azúcares, celulosa microcristalina, pectina, gelatina, sulfato de calcio, etilcelulosa, poliacrilatos o hidrogenofosfato de calcio, etc.); lubricantes (e.g., estearato de magnesio, talco, sílice, dióxido de silicio coloidal, ácido esteárico, estearatos metálicos, aceites vegetales hidrogenados, almidón de maíz, polietilenglicoles, benzoato de sodio, acetato de sodio, etc.); disgregantes (e.g., almidón, almidón glicolato sódico, etc.); y agentes humectantes (e.g., laurilsulfato de sodio, etc.).

Tambien se pueden usar los excipientes orgánicos o inorgánicos adecuados farmacéuticamente aceptables para administración no parenteral que no reaccionan perjudicialmente con ácidos nucleicos para formular las composiciones de la presente invención. Los vehículos adecuadis farmacéuticamente aceptable incluyen, pero no se limitan a, agua, soluciones salinas, alcoholes, polietilenglicoles, gelatina, lactosa, amilosa, estearato de magnesio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona y similares.

Las formulaciones para la administración tópica de ácidos nucleicos pueden incluir soluciones acuosas estériles y no estériles, soluciones no acuosas en solventes comunes tales como alcoholes, o soluciones de ácidos nucleicos en bases de aceite líquido o sólido. Las soluciones también pueden contener tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados. Se pueden usar excipientes orgánicos o inorgánicos adecuados farmacéuticamente aceptables para administración no parenteral que no reaccionen perjudicialmente con ácidos nucleicos.

Los excipientes adecuados farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, agua, soluciones salinas, alcohol, polietilenglicoles, gelatina, lactosa, amilosa, estearato de magnesio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona y similares.

vi. Otros componentes

Las composiciones de la presente invención pueden contener adicionalmente otros componentes adjuntos encontrados convencionalmente en composiciones farmacéuticas, en sus niveles de uso establecidos en el arte. Así, por ejemplo, las composiciones pueden contener materiales farmacéuticamente activos adicionales compatibles, tales como, por ejemplo, antipruriginosos, astringentes, anestésicos locales o agentes antiinflamatorios, o pueden contener materiales adicionales útiles en la formulación física de diversas formas de dosificación de las composiciones de la presente invención, tales como colorantes,

agentes aromatizantes, conservantes, antioxidantes, opacificantes, agentes espesantes y estabilizantes. Sin embargo, tales materiales, cuando se añaden, no deberían interferir indebidamente con las actividades biológicas de los componentes de las composiciones de la presente invención. Las formulaciones se pueden esterilizar y, si se desea, mezclar con agentes auxiliares, e.g., lubricantes, conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, sales para influir en la presión osmótica, tampones, colorantes, aromatizantes y/o sustancias aromáticas y similares que no interaccionen perjudicialmente con el (los) ácido (s) nucleico (s) de la formulación.

Las suspensiones acuosas pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión incluyendo, por ejemplo, carboximetilcelulosa sódica, sorbitol y/o dextrano. La suspensión también puede contener estabilizantes.

En algunas implementaciones, las composiciones farmacéuticas presentadas en la invención incluyen (a) uno o más compuestos de iRNA y (b) uno o más agentes que funcionan por un mecanismo que no es iRNA y que son útiles en el tratamiento de un trastorno hemolítico. Los ejemplos de tales agentes incluyen, pero no se limitan a, un agente antiinflamatorio, agente antiesteatosis, agente antiviral y/o antifibrosis. Además, también se pueden usar, otras sustancias comúnmente usadas para proteger el hígado, como la silimarina junto con los iRNA *descritos en este documento*. Otros agentes útiles para tratar enfermedades hepáticas incluyen telbivudina, entecavir e inhibidores de proteasa tales como

telaprevir y otros descritos, por ejemplo, en Tung *et al.*, Solicitudes de patente de los Estados Unidos Nos. 2005/0148548, 2004/0167116, y 2003/0144217; y en la Publicacion de la solicitud de Patente No. 2004/0127488 Hale *et al.*

La toxicidad y la eficacia terapéutica de tales compuestos se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos de células o animales de experimentación, e.g., oara determinar la LD50 (la dosis letal para el 50% de la población) y la ED50 (la dosis terapéuticamente efectiva en el 50% de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y se puede expresar como la relación LD50/ED50. Se prefieren los compuestos que exhiben altos índices terapéuticos.

Los datos obtenidos de ensayos de cultivos celulares y estudios en animales se pueden usar para formular un rango de dosificación para uso en humanos. La dosificación de las composiciones presentadas aquí en la invención se encuentra generalmente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen ED50 con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la vía de administración utilizada. Para cualquier compuesto usado en los métodos presentados en la invención, la dosis terapéuticamente efectiva se puede estimar inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Se puede formular una dosis en modelos animales para lograr un intervalo de concentración en plasma circulante del compuesto o, cuando sea apropiado, del producto polipeptídico de una

secuencia objetivo (e-g-. lograr una concentración disminuida del polipéptido) que incluya el ISERPINC10 (i.e., la concentración del compuesto de prueba que logra una inhibición semimáxima de los síntomas) según se determina en cultivo celular. Tal información se puede usar para determinar con mayor precisión las dosis útiles en humanos. Los niveles en plasma se pueden medir, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alta resolución.

Además de su administración, como se discutió anteriormente, los iRNA presentados en la invención se pueden administrar en combinación con otros agentes conocidos efectivos en el tratamiento de procesos patológicos mediados por la expresión de SERPINC1. En cualquier caso, el médico encargado de la administración puede ajustar la cantidad y el momento de la administración del iRNA sobre la base de los resultados observados usando medidas estándar de eficacia conocidas en el arte o descritas en este documento.

VI. Kits

La presente invención también proporciona kits para realizar cualquiera de los métodos de la invención. Dichos kits incluyen uno o más agentes iRNA e instrucciones para uso, e.g., instrucciones para administrar una cantidad profiláctica o terapéuticamente efectiva de un(o) agente(s) iRNA. Los kits pueden comprender adicionalmente medios para administrar el agente iRNA (e.g., un dispositivo de inyección), o medios para medir la inhibición de Serpinc1 (e.g.,

medios para medir la inhibición del Serpinc1 mRNA, Serpinc1 proteína y/o Serpinc1 actividad). Tales medios para medir la inhibición de Serpinc1 pueden comprender un promedio para obtener una muestra de un sujeto, tal como, e.g., una muestra de plasma. Los kits de la invención pueden comprender adicionalmente medios para determinar la cantidad terapéuticamente efectiva o profilácticamente efectiva.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un versado habitual en el arte al que pertenece esta invención. Aunque los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento se pueden usar en la práctica o prueba de los iRNA y métodos presentados en la invención, los métodos y materiales adecuados se describen a continuación. Todas las publicaciones, solicitudes de patentes, patentes y otras referencias mencionadas en este documento se incorporan por referencia en su totalidad. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

EJEMPLOS

Tabla 1: abreviaturas de monómeros de nucleótidos utilizados en la representación de secuencias de ácidos nucleicos. Se entenderá que estos

monómeros, cuando están presentes en un oligonucleótido, están mutuamente unidos por enlaces 5'-3'-fosfodiéster.

Abreviatura	**Nucleotido(s)**
A	Adenosina-3’-Fosfato
Af	2’-fluoroadenosina-3’-Fosfato
Afs	2’-fluoroadenosina-3’-fosforotioato
As	Adenosina-3’-fosforotioato
C	Citidina-3’-Fosfato
Cf	2’-Fluorocitidina-3’-Fosfato
Cfs	2’-Fluorocitidina-3’-fosforotioato
Cs	Citidina-3’-fosforotioato
G	Guanosina-3’-Fosfato
Gf	2’-Fluoroguanosina-3’-Fosfato
Gfs	2’- Fluoroguanosina -3’-fosforotioato
Gs	Guanosina -3’-fosforotioato
T	5’-metiluridina-3’-Fosfato
Tf	2’-fluoro-5-metiluridina-3’-Fosfato
Tfs	2’-fluoro-5-metiluridina-3’-fosforotioato
Ts	5-metiluridina-3’-fosforotioato
U	Uridina-3’-Fosfato
Uf	2’-fluorouridina-3’-Fosfato
Ufs	2’-fluorouridina -3’-fosforotioato
Us	uridina-3’-fosforotioato
N	Cualquier nucleotido (G, A, C, T o U)
a	2'-O-metiladenosina-3’-Fosfato
as	2'-O-metiladenosina-3’-fosforotioato

Abreviatura	Nucleotido(s)
c	2'-O-metilcitidina-3’-Fosfato
cs	2'-O-metilcitidina-3’-fosforotioato
g	2'-O-metilguanosina-3’-Fosfato
gs	2'-O-metilguanosina-3’-fosforotioato
t	2’-O-metil-5-metiluridina-3’-Fosfato
ts	2’-O-metil-5-metiluridina-3’-fosforotioato
u	2'-O-metiluridina-3’-Fosfato
us	2'-O-metiluridina-3’-fosforotioato
s	Enlace fosforotioato
L96	N-[tris(GalNAc-alkil)-amidodecanoil)]-4-hidroxiprolinol Hip-(GalNAc-alkil)3

Ejemplo 1: administración de una dosis única de AD-57213 a sujetos humanos sanos.

Veinticuatro voluntarios humanos sanos, en cohortes de 3:1 (activo: placebo), recibieron una dosis única de 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,6 mg/kg o 1,0 mg/kg de AD-57213 (Sentido (5’ a 3'): GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAfL96 (SEC ID Nº: 13); antisentido (5’ a 3 '): usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg (SEQ ID NO: 14)). Se recogieron muestras de plasma los días 0, 1, 2, 3, 7, 10, 14, 21, 28, 42, 56 y 70 después de la administración para controlar los niveles de proteína AT, la actividad AT y la duración del silenciamiento de la proteína AT. Los niveles de proteína AT se controlaron usando ELISA y los niveles de actividad AT se controlaron mediante

generación de curvas de generación de trombina usando un trombinoscopio automatizado calibrado (factor de tejido = 1 pM). El cambio doble en el pico de trombina se calculó en relación con el promedio del valor pico de trombina para dos valores de dosis previa para cada sujeto.

No hubo eventos adversos serios, 3 eventos adversos leves que probablemente no estaban relacionados con la administración del agente y 1 evento adverso leve (dolor de cabeza) potencialmente relacionado con la administración del agente. Tampoco hubo reacciones en el sitio de inyección y los exámenes físicos, los signos vitales y los electrocardiogramas de todos los sujetos estuvieron dentro de los límites normales. Además, todas las pruebas de función hepática, niveles de bilirrubina total, relación internacional normalizada de tiempos de protrombina (PT/INR), recuentos de plaquetas, niveles de hemoglobina y pruebas de coagulación (i.e., tiempos de tromboplastina parcial activada (APTT), tiempos de protrombina (PT) niveles de fibrinógeno y niveles de dímero-D de fibrina) de todos los sujetos no cambiaron durante el transcurso del estudio y estuvieron dentro de los límites normales.

Las Figuras 1A - D y 2A - B muestran que una dosis única de 0,03 mg/kg de AD - 57213 produce aproximadamente un 20% y hasta un 33% de reducción en los niveles de proteína AT (Figuras 2A y 2B) y una reducción correspondiente en la actividad AT (Figuras 1A - D) con una durabilidad de descenso de más de 60 días.

La Figura 3 demuestra además que existe una asociación significativa entre la disminución de AT y la generación pico de trombina. Específicamente, se observó un aumento de hasta 152% en la generación pico de trombina, con un aumento promedio máximo del pico de trombina de 138% ± 8,9% (promedio ± SEM). Además, y en consonancia con una mayor generación de trombina con un aumento de la inhibición de la AT, los niveles de Factor VIII o IX fueron normales.

Ejemplo 2: Administracion de dosis multiples de AD-57213 a pacientes humanos que tienen Hemofilia A o B.

Ensayo Clínicos Fase I – Partes B, C, y D

En la Parte B de un ensayo clinico Fase I de AD-57213 (Sentido (5’ a 3’): GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAfL96 (SEQ ID NO:13); antisentido (5’ a 3’): usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg (SEQ ID NO:14)), se administro a tres pacientes con Hemofilia A (n=2) o B (n=1) de manera subcutanea 0,015 mg/kg semanalmente durtante tres semanas (15 microgramos/kg qw x 3; 15 mcg/kg) de AD-57213; a seis pacientes con Hemofilia A se les administró de manera subcutanea 0,045 mg/kg semanalmente durante tres semanas(45 microgramos/kg qw x 3; 45 mcg/kg) de AD-57213; y a tres pacientes con Hemofilia A (n=2) o B (n=1) se les administró de manera subcutanea 0,075 mg/kg semanalmente durante tres semanas (75 microgramos/kg qw x 3; 75 mcg/kg) de AD-57213.

En la Parte C de un ensayo clinico Fase I de AD-57213 (Sentido (5' a 3'): GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAfL96 (SEQ ID NO:13); antisentido (5' a 3'): usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg (SEQ ID NO:14)), a tres pacientes con Hemofilia A (n=2) o B (n=1) se les administró de manera subcutanea mensualmente una dosis de 0,225 mg/kg de AD-57213 por tres meses(225 microgramos/kg qm x 3; 225 mcg/kg); a tres pacientes con Hemofilia A (n=2) o B (n=1) se les administró de manera subcutanea mensualmente una dosis de 0,450 mg/kg de AD-57213 por tres meses (450 microgramos/kg qm x 3; 450 mcg/kg); a tres pacientes con Hemofilia A se les administró de manera subcutanea mensualmente una dosis de 0,900 mg/kg de AD-57213 por tres meses (900 microgramos/kg qm x 3; 900 mcg/kg); a tres pacientes con Hemofilia A se les administró de manera subcutanea mensualmente una dosis de 1,800 mg/kg de AD-57213 por tres meses (1800 microgramos/kg qm x 3; 1800 mcg/kg); y a seis pacientes con Hemofilia A (n=3) o B (n=3) se les administró de manera subcutanea mensualmente una dosis fija de 80 mg de AD-57213 por tres meses (80 mg qM x 3).

En la Parte D de un ensayo clinico Fase I de AD-57213 (Sentido (5' a 3'): GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAfL96 (SEQ ID NO:13); antisentido (5' a 3'): usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg (SEQ ID NO:14)), a seis pacientes inhibidores con Hemofilia A (n=5) o B (n=1) y que utilizan agentes de derivación (bypass) (BPAs) para el manejo de la hemorragia se les administró de manera subcutanea una dosis fija de 50 mg de AD-57213 mensualmente por tres meses

(50 mg qM x 3); y a 10 pacientes con Hemofilia A y que utilizan agentes de derivación (BPAs) para el manejo de la hemorragia se les administró de manera subcutanea una dosis fija de 80 mg de AD-57213 mensualmente por tres meses (80 mg qM x 3).

Se recogieron muestras de plasma despues de la administracion de AD-57213 para minitorear los niveles de proteina AT, la actividad AT y la duracion del silenciamiento de la proteina AT. Los niveles de proteína AT se controlaron usando ELISA y los niveles de actividad AT se controlaron mediante generación de curvas de generación de trombina usando un trombinoscopio automatizado calibrado (factor de tejido = 1 pM). El cambio doble en el pico de trombina se calculó en relación con el promedio del valor pico de trombina para dos valores de dosis previa para cada sujeto.

Las caracteristicas demograficas y la linea base de los pacientes que Parteiciparon en las Partes B, C, y D del estudio se suministran en la Tabla 2

Tabla 2. Caracteristicas demográficas y línea base de los Parteicipantes en el estudio

	Parte B Subcutaneo Semanalmente × 3			**Parte C Subcutaneo Mensualmente × 3**					**Parte D Subcutaneo Mensualmente × 3**	
	15 mcg/kg N=3	**45 mcg/kg N=6**	**75 mcg/kg N=3**	**225 mcg/kg N=3**	**450 mcg/kg N=3**	**900 mcg/kg N=3**	**1800 mcg/kg N=3**	**80 mg N=6**	**50 mg N=6**	**80 mg N=10**
Edad, Promedio (SD)	28 (9)	42 (14)	40 (4)	37 (21)	37 (15)	38 (16)	46 (12)	32 (12)	32 (7)	37
Hemofilia A Hemofilia B	2 1	6 0	2 1	2 1	2 1	3 0	3 0	3 3	5 1	10 0
Severo Moderado	3 0	6 0	3 0	2 1	3 0	2 1	3 0	5 1	6 0	10 0
Peso (kg), Promedio (SD)	76 (10)	80 (22)	82 (8)	85 (12)	76 (16)	76 (2)	71 (12)	74 (10)	73 (17)	73
Historia medica de Hepatitis C									3	9

Para las Parte B, C y D del estudio, no hubo eventos adversos graves, ni interrupciones, ni reacciones en el lugar de la inyección, y los exámenes físicos, los signos vitales y los electrocardiogramas de todos los pacientes se encontraron dentro de los límites normales. Además, todas las pruebas de función hepática y los recuentos sanguíneos completos de todos los pacientes no cambiaron durante el transcurso del estudio y estuvieron dentro de los límites normales. Tampoco hubo eventos tromboembólicos durante el transcurso de este estudio y ningún nivel de dímero D de fibrina clínicamente significativo aumenta en ninguno de los pacientes. Todos los eventos de sangrado se manejaron exitosamente con la administración del factor de reemplazo estándar o el bypass. Además, no hubo casos de formación de anticuerpos antifarmaco (ADA).

La reducción de los niveles de AT en las cohortes de 15 mcg/kg, 45 mcg/kg y 75 mcg/kg, se muestra como una reducción del AT promedio con respecto a la línea base, se representa en la Figura 4. La Figura 4 muestra que las dosis semanales de 0,015 mg/kg durante tres semanas de AD-57213 dan como resultado una reducción del AT máximo promedio de 29% ± 12% (promedio ± SEM). La reducción del AT máximo fue de hasta 53%. La Figura 4 también demuestra que las dosis semanales de 0,045 mg/kg durante tres semanas de AD-57213 dan como resultado una reducción del AT máximo promedio de 55 ± 9% (promedio ± SEM) y una reducción del AT máximo de 86%. Además, la Figura 4 también demuestra que las dosis semanales de 0,075 mg/kg durante tres semanas de AD-57213 resultan en una reducción del AT máximo promedio de 61 ± 8% (promedio ± SEM) y una reducción del AT máxima del 74%.

La reducción de los niveles de AT en las cohortes de 225 mcg/kg, 450 mcg/kg, 900 mcg/kg, 1800 mcg/kg y 80 mg, que se muestra como una relación de la reducción del AT promedio con respecto a la línea base, se representa en la Figura 5A. La Figura 5A demuestra que las dosis mensuales de 0,225 mg/kg durante tres meses de AD-57213 dan como resultado una reducción del AT máximo promedio del 70% ± 9% (promedio ± SEM). La reducción del AT máximo fue de hasta 80%. La figura 5A también demuestra que las dosis mensuales de 0,450 mg/kg durante tres meses de AD-57213 dan como resultado una reducción del AT máximo promedio de 77 ± 5% (promedio ± SEM) y una reducción del AT máximo del 85%. Además, la Figura 5A también demuestra que las dosis mensuales de 0,900 mg/kg durante tres meses de AD-57213 resultan en una reducción del AT máximo promedio de 78 ± 7% (promedio ± SEM) y una reducción del AT máxima del 88%. Además, la Figura 5A demuestra que las dosis mensuales de 1,800 mg/kg durante tres meses de AD-57213 dan como resultado una reducción del AT máximo promedio de 79 ± 3% (promedio ± SEM) y una reducción del AT máximo del 84%. La Figura 5A también demuestra que las dosis mensuales de 80 mg durante tres meses de AD-57213 dan como resultado una reducción del AT máximo promedio de 87 ± 1% (promedio ± SEM).

Como se demuestra en la Figura 5B, que representa la dosis de AD-57213 frente al nadir relativo de los niveles de proteína AT, la administración de AD-57213 a pacientes humanos reduce los niveles de proteína AT de una manera dependiente de la dosis.

La evaluación de la generación de trombina en voluntarios humanos sanos (Ejemplo 1) y pacientes con hemofilia A o B demostró que las dosis semanales de AD-57213 produjeron un aumento de hasta 334% (con respecto a la línea base) en la generación de trombina en pacientes con hemofilia con un aumento promedio en la generación de trombina de 112 ± 38% ($p<0,05$), con relación a la línea base cuando la AT se redujo en ≥50% (Figura 6B). La Figura 6A demuestra que el pico maximo de la trombina alcanzado en pacientes con hemofilia A o B a los que se les administró dosis semanales de AD-57213 estuvo en el rango bajo de generación de trombina en sujetos normales.

El análisis de tromboelastometría ROTEM® (ver, e.g., Young, *et al.,* (2013) *Blood* 121: 1944) de sangre completa de un sujeto (sujeto 101-009) demuestra que la administración de AD-57213 de 0,045 mg/kg semanalmente durante tres semanas no solo da como resultado un aumento en la generación del pico de trombina, sino que también produce una mejora marcada y duradera en la formación de coágulos de sangre entera como lo demuestra una disminución en el tiempo de formación de coágulos y coagulación (Figura 7). El sujeto 101-009 no ha tenido eventos hemorrágicos desde el día 2 y actualmente tiene 47 días sin hemorragia.

Un análisis post-hoc de la generación de trombina por cuartiles bajos de AT (partes B y C) demuestra que, en el cuartil bajo de AT más alto (> 75% del AT bajo), hay un aumento del 289% en la generación media de trombina con respecto a la línea base (figura 9). Este nivel de generación de trombina está dentro del rango de generación de trombina observado en voluntarios sanos.

Un subestudio de tres pacientes exploró la equivalencia de la administración de AD-57213 y la administración del Factor VIII. Brevemente, se administró Factor VIII a cada uno de los tres pacientes y se recolectó plasma de los pacientes a -0,5, 1, 2, 6, 24 y 48 horas después de la administración. Las muestras de cada sujeto se analizaron para niveles de Factor VIII y niveles de generación de trombina y se usaron para establecer relaciones de generación de trombina pico-factor VIII individualizadas. Luego, estos datos se usaron para comparar con los niveles pico de generación de trombina alcanzados con la administración de AD-57213. Como se muestra en las Figuras 10A-10C, la administración de AD-57213 es suficiente para alcanzar niveles pico de generación de trombina en el sujeto hasta aproximadamente el mismo nivel alcanzado por administración del Factor VIII al sujeto y suficiente para alcanzar niveles pico de generación de trombina mayores que aproximadamente 40% en el tema.

Un análisis post-hoc de los eventos de hemorragia por el cuartil bajo AT (Partes B y C) demuestra que hay una tendencia reducida a la hemorragia con niveles aumentados de bajo AT, con una tasa de sangrado anual estimada promedio (ABR) de 5 ± 2 (mediana = 1) en el cuartil más bajo de AT más alto (Figura 11). Este análisis incluye más de 1100 días acumulativos con AT bajo > 75% en 16 pacientes.

También se realizó un análisis post-hoc de los eventos de sangrado en la cohorte de la Parte C. La Figura 12 proporciona los datos del paciente utilizados para este análisis. Como se demuestra en la Figura 13A, la mediana histórica de la ABR para todos los pacientes incluidos en la cohorte C y que recibieron factores de reemplazo profiláctico (PPx) fue de 2 y la mediana histórica para todos los pacientes

ABR inscritos en la cohorte C y que reciben factores de reemplazo en demanda (OD) fue 28. La administración de AD-57213 a estos pacientes dio como resultado una reducción significativa en la mediana de ABR. En particular, la administración de AD-57213 resultó en una mediana del 53% de los pacientes que no informaron hemorragias durante el período de observación (día 29 a la última visita del estudio o última dosis + 56 días, e incluso antes) y una mediana del 82% de los pacientes que no informaron hemorragias espontáneas durante el período de observación. La Figura 13B demuestra que, para los pacientes que recibieron dosis mensuales de 80 mg de AD-57213 en la Cohorte C y que recibieron factores de reemplazo profiláctico (PPx), la mediana de ABR histórica fue 6. Después de la administración de AD-57213, la mediana de ABR durante la observación del período fue 0.

La Parte D del estudio de Fase I evaluó el efecto de la administración de AD-57213 en pacientes que tienen Hemofilia A o B que han desarrollado anticuerpos (inhibidores) contra los factores de reemplazo que se les han administrado y se han vuelto refractarios al factor de coagulación de reemplazo. Por consiguiente, para evaluar la respuesta pico de trombina de estos pacientes, antes de la administración de AD-57213, a los pacientes inscritos en la cohorte de 50 mg se les administró su agente de derivación estándar (BPA) (e.g., concentrado de complejo de protrombina activada (APCC) y/o FVII activado recombinante (rFVIIa)), se recogieron muestras de plasma a -1, 2, 6 y 24 horas después de la administración de BPA, y las muestras se analizaron para determinar la generación de trombina. Como se muestra en las Figuras 14A-14F, la disminución de AT y la generación de trombina en pacientes inhibidores administrados con AD-57213 son comparables a la disminución de AT y la generación de trombina observada después de la administración de AD-57213

con dosis similares en pacientes no inhibidores. Además, las Figuras 14A-14F demuestran que la generación de trombina después de la administración de AD-57213 excede consistentemente los niveles transitorios logrados con la administración de BPA.

Como se demuestra en la Figura 15, la dosificación subcutánea una vez al mes de AD-57213 a 50 mg y 80 mg logra una disminución de AT dependiente de la dosis de aproximadamente 80% en pacientes con hemofilia con inhibidores. Además, como se demuestra en la Figura 16, el efecto reductor de AT logrado en pacientes a los que se administró AD-57213 está correlacionado con una mayor generación de trombina.

También se realizó un análisis exploratorio post-hoc de los eventos de sangrado en los pacientes en la Parte D del estudio. La figura 17A muestra que la administración de AD-57213 a pacientes inhibidores que tienen hemofilia A o B una vez al mes en una dosis de 50 mg u 80 mg da como resultado una reducción significativa en el ABR previo al estudio. Además, como se demuestra en la Figura 17B, la mediana de la tasa de sangrado anual (ABR) es cero para todos los pacientes inhibidores a los que se les administro AD-57213 en la Parte D de este estudio de Fase I, y 56% de los pacientesres están libres de sangrado y 69% de los pacientes experimentó cero sangrados espontáneos.

En resumen, AD-57213 es bien tolerado en pacientes con hemofilia A y B con y sin inhibidores. No hubo SAE relacionados con el fármaco del estudio ni eventos tromboembólicos. Los datos demuestran que existe actividad clínica y corrección del

fenotipo de hemofilia en pacientes no inhibidores. Los datos demuestran además que existe un descenso de la AT dependiente de la dosis y un aumento de la generación de trombina, con un régimen de dosis subcutánea mensual y que la administración de una dosis fija de 50 mg u 80 mg de AD-57213 proporciona una disminución de AT consistente de aproximadamente 80%.

Además, los datos demuestran que la administración de AD-57213 a pacientes inhibidores da como resultado una disminución de AT y un aumento de la generación de trombina consistente con pacientes no inhibidores y que la generación de trombina aumenta consistentemente por encima de los logrados transitoriamente con la administración de BPA.

Ejemplo 3: administración de dosis múltiples de AD-57213 a pacientes humanos con hemofilia A o B

Ensayo clínico de Fase II con extensión de etiqueta abierta (OLE)

En un estudio Fase II OLE de AD-57213 (Sentido (5’ a 3'): GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAfL96 (SEC ID Nº: 13); antisentido (5’ a 3'): usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg (SEC ID Nº: 14)), pacientes sin inhibidores previamente administrados con AD-57213 en los ensayos clínicos de fase I Parte B y C descritos anteriormente, fueron elegibles para ser inscritos en un estudio de extensión de etiqueta abierta Fase II (OLE). Doce pacientes del estudio de fase I Parte B con hemofilia A o B a los que se les había administrado por vía subcutánea 0,015 mg/kg semanalmente durante tres semanas (15 microgramos/kg

qw x 3; 15 mcg/kg) de AD-57213; o se había administrado por vía subcutánea 0,045 mg/kg semanalmente durante tres semanas (45 microgramos/kg qw x 3; 45 mcg/kg) de AD-57213; o se le había administrado por vía subcutánea 0,075 mg/kg semanalmente durante tres semanas (75 microgramos/kg qw x 3; 75 mcg/kg) de AD-57213; y 18 pacientes del estudio de fase I Parte C con hemofilia A o B a los que se les había administrado por vía subcutánea una dosis mensual de 0,225 mg/kg de AD-57213 durante tres meses (225 microgramos/kg qm x 3; 225 mcg/kg); o se le había administrado por vía subcutánea una dosis mensual de 0,450 mg/kg de AD-57213 durante tres meses (450 microgramos/kg qm x 3; 450 mcg/kg); o se le había administrado por vía subcutánea una dosis mensual de 0,900 mg/kg de AD-57213 durante tres meses (900 microgramos/kg qm x 3; 900 mcg/kg); o se le había administrado por vía subcutánea una dosis mensual de 1,800 mg/kg de AD-57213 durante tres meses (1800 microgramos/kg qm x 3; 1800 mcg/kg); o si se le había administrado por vía subcutánea una dosis fija mensual de 80 mg de AD-57213 durante tres meses (80 mg qM x 3) fueron elegibles para inscribirse en este estudio.

Se inscribieron dieciséis pacientes. A ocho pacientes con Hemofilia A (n = 6) o Hemofilia B (n = 2) se les administró por vía subcutánea a una dosis fija de 50 mg de AD-57213 mensualmente durante tres meses (50 mg qM x 3); y 8 pacientes con Hemofilia A (n = 7) o Hemofilia B (n = 1) recibieron una dosis fija de 80 mg de AD-57213 por vía subcutánea mensualmente durante tres meses (50 mg qM x 3). Las características demográficas y de línea base de los pacientes incluidos en este estudio se muestran en la Tabla 3 a continuación.

Tabla 3. Datos demográficos y características de línea base de los Parteicipantes en el estudio

	50 mg N=8	**80 mg N=8**
edad, años; promedio (rango)	35 (19-61)	41 (24-58)
peso, kg; promedio (rango)	80 (65-94)	74 (58-80)
Hemofilia A Hemofilia B	6 2	7 1
Severa Moderada	7 1	6 2
Historia medica de Hepatitis C[†]	6	6

El AD-57213 generalmente fue bien tolerado en pacientes sin inhibidores en la Fase II OLE, en el período de exposición más prolongado de hasta 14 meses de tratamiento continuo, y no hubo eventos adversos graves relacionados con el medicamento (SAE), sin interrupciones debido a eventos adversos y sin eventos tromboembólicos o evidencia de laboratorio de formación de coágulos patológicos. Todos los eventos adversos (AE) fueron de gravedad leve o moderada, con los eventos adversos más comunes que consisten en reacciones leves en el sitio de la inyección (ISR) en 4/16 (25 por ciento) de los pacientes. Se observó en 3 pacientes, una elevación en la alanina aminotransferasa (ALT) asintomática mayor de 3 veces el límite superior normal (ULN), sin elevaciones concurrentes de bilirrubina mayores de 2 veces el ULN, todos los cuales tienen un historial médico de infección por hepatitis C. Todos los eventos de hemorragia intercurrente se manejaron

exitosamente con el factor de reemplazo. Además, no hubo casos de formación de anticuerpos antifarmacos (ADA).

Las Figuras 19A y 19B demuestran adicionalmente la actividad clínica de la administración de AD-57213. Específicamente, como se demuestra en la Figura 19A, la dosificación subcutánea mensual de AD-57213 a 50 mg u 80 mg logra una disminución de la AT dependiente de la dosis de ~ 80% y como se muestra en la Figura 19B, la administración subcutánea una vez al mes de AD-57213 a 50 mg u 80 mg logra niveles de generación de trombina que se acercan al límite inferior del rango normal.

También se realizó un análisis exploratorio post-hoc de los eventos de sangrado en los pacientes no inhibidores en el estudio Fase II OLE. La Figura 20A muestra que la administración de AD-57213 a pacientes que tienen hemofilia A o B una vez al mes en una dosis de 50 mg u 80 mg da como resultado una reducción significativa en el ABR previo al estudio. Además, como se demuestra en la Figura 20B, la administración de AD-57213 a pacientes que tienen Hemofilia A o B una vez al mes en una dosis de 50 mg u 80 mg reduce la tasa de sangrado anual media (ABR) a 1 y reduce la mediana de la tasa de hemorragia espontánea anualizada (AsBR) a cero.

Además, durante la Fase II OLE, un paciente (sujeto C1-3) se sometió a un procedimiento quirúrgico electivo. Específicamente, un paciente con hemofilia A grave que recibió 50 mg mensuales de AD-57213 se sometió a una septoplastia electiva. El procedimiento se llevó a cabo con éxito sin eventos adversos asociados.

Además, según informa el investigador a través de comunicación personal, la utilización perioperatoria acumulativa del factor VIII recombinante fue aproximadamente 5 veces menor que la utilizada típicamente por el investigador para este tipo de cirugía en un paciente con hemofilia A grave. Con base en la puntuación de eficacia de la hemostasis de la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasis (ISTH), el investigador calificó el control de la hemostasis en los periodos intraoperatorio, 24 horas postoperatorio y 7 días postoperatorio, ya que todos son "excelentes".

En resumen, AD-57213 fue generalmente bien tolerado en pacientes con hemofilia A y B sin inhibidores. No hubo SAE ni eventos tromboembólicos relacionados con la administración de AD-57213. Además, los datos demuestran que AD-57213 tiene actividad clínica en que la dosificación subcutánea mensual a 50 mg y 80 mg logra una disminución de AT dependiente de la dosis de ~ 80% y los niveles de generación de trombina se acercan al límite inferior del rango normal. Además, el análisis exploratorio post-hoc de eventos hemorrágicos en pacientes que tienen hemofilia A o B sin inhibidores demuestra que la administración de AD-57213 redujo la mediana de ABR a 1 y la mediana de la tasa de sangrado espontáneo anualizado (AsBR) a cero. Ocho de dieciséis (50%) de los pacientes estaban libres de hemorragias y once de dieciséis (69%) de los pacientes no experimentaron ninguna hemorragia espontánea. Además, durante el primer caso quirúrgico de un sujeto que padecía Hemofilia A grave y se administro AD-57213, se utilizó una reducción significativa en el factor de reemplazo para mantener la hemostasis en el sujeto.