

REIVINDICACIONES:

1. Un agente de ARN de hebra doble (ARNhd), CARACTERIZADO PORQUE inhibe la expresión de un gen de un inhibidor de serina peptidasa, clado a, miembro 1 (Serpina1), que comprende una hebra sentido y una hebra antisentido que forman una región de hebra doble,

en donde la hebra sentido comprende por lo menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N°: 1, y la hebra antisentido comprende por lo menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N°: 15,

en donde dicha hebra antisentido comprende por lo menos una modificación térmicamente desestabilizante de la región de hebra doble en las primeras 9 posiciones de nucleótidos de la región 5' o un precursor de la misma,

en donde dicha hebra sentido comprende un ligando del ASGPR y

en donde cada una entre la hebra sentido y la hebra antisentido son, de manera independiente, de entre 14 y 40 nucleótidos de longitud.

2. Un agente de ARN de hebra doble (ARNhd) que inhibe la expresión de un gen de un inhibidor de serina peptidasa, clado a, miembro 1 (Serpina1), CARACTERIZADO PORQUE comprende una hebra sentido y una hebra antisentido que forman una región de hebra doble, dicha hebra antisentido comprende una región de complementariedad con un ARNm que codifica Serpina1, en donde la región de complementariedad comprende por lo menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N°: 15,

en donde dicha hebra antisentido comprende por lo menos una

modificación térmicamente desestabilizante en las primeras 9 posiciones de nucleótidos de la región 5' o un precursor de la misma,

en donde dicha hebra sentido comprende un ligando del ASGPR,

en donde cada una entre la hebra sentido y la hebra antisentido son, de manera independiente, de entre 14 y 40 nucleótidos de longitud.

3. El agente de ARNhd de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, CARACTERIZADO PORQUE el agente de ARNhd comprende por lo menos cuatro nucleótidos que comprenden una modificación 2'-fluoro.

4. El agente de ARNhd de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, CARACTERIZADO PORQUE presenta las siguientes características:

a) la modificación térmicamente desestabilizante se ubica en la posición 4-8 de la región 5' de la hebra antisentido;

b) cada una de las hebras sentido y antisentido comprenden de manera independiente por lo menos dos nucleótidos que comprenden una modificación 2'-fluoro; y

c) un ligando del ASGPR unido a cualquiera de los extremos de la hebra sentido.

5. El agente de ARNhd de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, CARACTERIZADO PORQUE la hebra antisentido presenta por lo menos dos de las siguientes características:

a) la modificación térmicamente desestabilizante se ubica en las posiciones 4 a 8 de la hebra antisentido;

b) por lo menos dos nucleótidos comprenden una modificación 2'-fluoro;

c) Un enlace internucleótidos de fosforotioato entre las posiciones de

nucleótido 1 y 2 (contando desde el extremo 5');

d) una longitud de 18 a 35 nucleótidos.

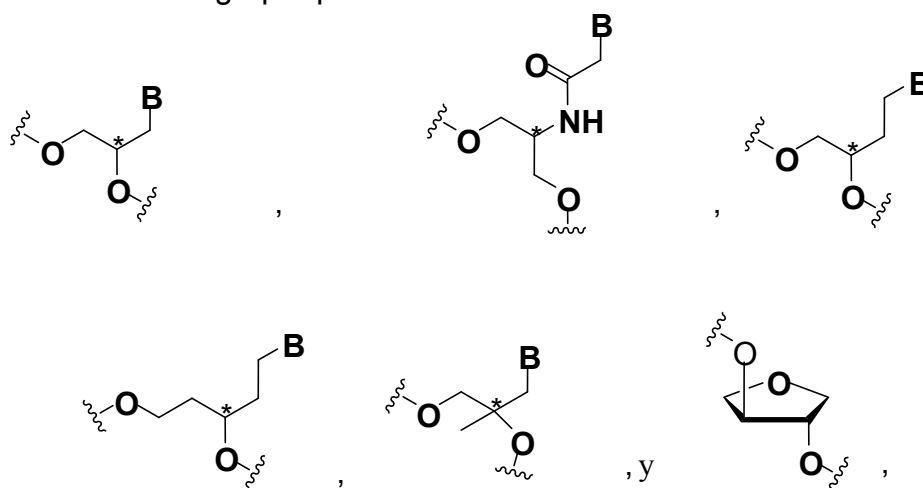
6. El agente de ARNhd de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, CARACTERIZADO PORQUE la hebra sentido presenta por lo menos una de las siguientes características:

a) el ligando del ASGPR está unido a cualquiera de los extremos de la hebra sentido;

b) por lo menos dos nucleótidos comprenden una modificación 2'-fluoro;

c) la región de hebra doble abarca por lo menos 19 posiciones de nucleótido y en donde la modificación térmicamente desestabilizante está ubicada en dicha región de hebra doble.

7. El agente de ARNhd de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, CARACTERIZADO PORQUE la modificación térmicamente desestabilizante se selecciona del grupo que consiste en



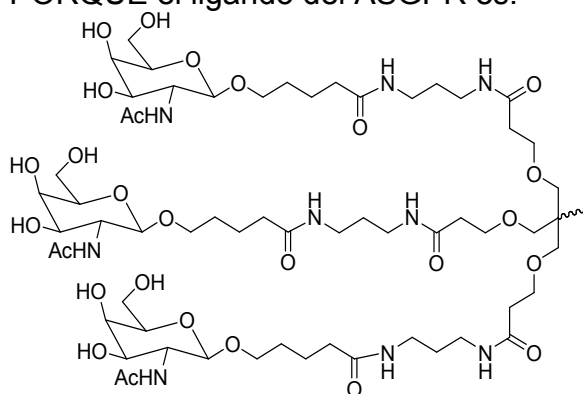
en donde B es una nucleobase.

8. El agente de ARNhd de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2,

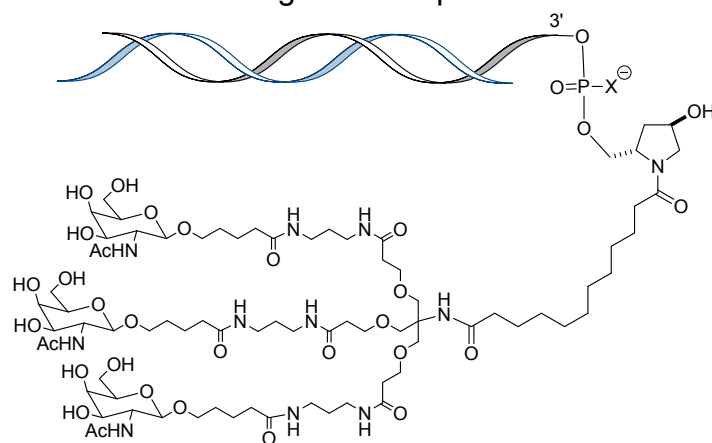
CARACTERIZADO PORQUE la modificación desestabilizante se ubica en la posición 7 de la hebra antisentido.

9. El agente de ARNhd de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, CARACTERIZADO PORQUE el ligando ASGPR comprende uno o más derivados de GalNAc unidos mediante un conector ramificado bivalente o trivalente.

10. El agente de ARNhd de la reivindicación 9, CARACTERIZADO PORQUE el ligando del ASGPR es:



11. El agente de ARNi de hebra doble de la reivindicación 10, CARACTERIZADO PORQUE el agente de ARNi está conjugado al ligando como se muestra en el siguiente esquema:



en donde X es O o S;

12. Una molécula de ARN de hebra doble, CARACTERIZADA PORQUE inhibe la expresión de una secuencia genética blanco de un inhibidor de serina peptidasa, clado A, miembro 1 (Serpina1), que comprende una hebra sentido y una hebra antisentido,

en donde la hebra sentido comprende por lo menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N°: 1, y la hebra antisentido comprende por lo menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N°: 15,

en donde la hebra antisentido comprende por lo menos una modificación térmicamente desestabilizante en las primeras 9 posiciones de nucleótido de la región 5',

en donde cada una entre la hebra sentido y la hebra antisentido son, de manera independiente, de entre 14 y 40 nucleótidos de longitud, y

en donde el ARNhd tiene una temperatura de fusión de entre aproximadamente 40 °C y aproximadamente 80 °C.

13. Una molécula de ARN de hebra doble, CARACTERIZADA PORQUE inhibe la expresión de una secuencia genética blanco de un inhibidor de serina peptidasa, clado A, miembro 1 (Serpina1), que comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, dicha hebra antisentido comprende una región de complementariedad con un ARNm que codifica Serpina1, en donde la región de complementariedad comprende por lo menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N°: 15,

en donde la hebra antisentido comprende por lo menos una modificación

térmicamente desestabilizante en las primeras 9 posiciones de nucleótido de la región 5',

en donde cada una entre la hebra sentido y la hebra antisentido son, de manera independiente, de entre 14 y 40 nucleótidos de longitud, y

en donde el ARNhd tiene una temperatura de fusión de entre aproximadamente 40 °C y aproximadamente 80 °C.

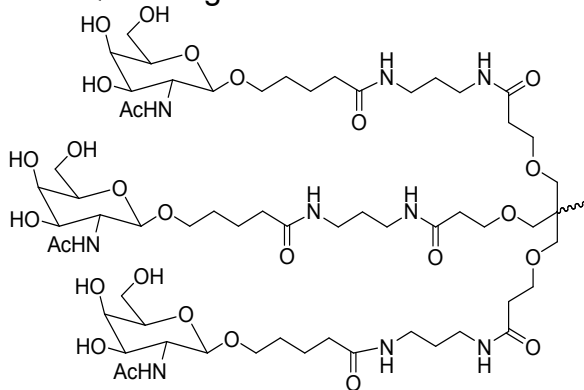
14. El agente de ARNhd de la reivindicación 12 ó 13, CARACTERIZADO PORQUE el ARNhd tiene una temperatura de fusión de entre aproximadamente 55 °C y aproximadamente 67 °C.

15. El agente de ARNhd de la reivindicación 14, CARACTERIZADO PORQUE el ARNhd tiene una temperatura de fusión de entre aproximadamente 60 °C y aproximadamente 67 °C.

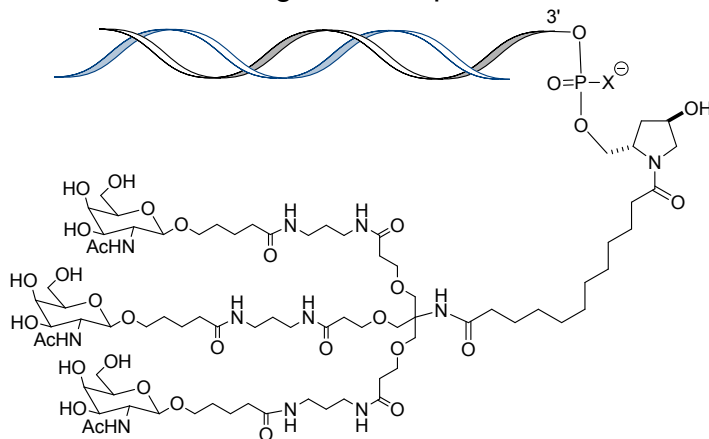
16. El agente de ARNhd de cualquiera de las reivindicaciones 12-14, CARACTERIZADO PORQUE además comprende un ligando del ASGPR.

17. El agente de ARNi de la reivindicación 16, CARACTERIZADO PORQUE el ligando del ASGPR es uno o más derivados de GalNAc unidos mediante un conector ramificado bivalente o trivalente.

18. El agente de ARNhd de la reivindicación 17, CARACTERIZADO PORQUE el ligando del ASGPR es:



19. El agente de ARNi de hebra doble de la reivindicación 18, CARACTERIZADO PORQUE el agente de ARNi está conjugado al ligando como se muestra en el siguiente esquema:



en donde X es O o S;

20. El ARNhd de cualquiera de las reivindicaciones 1-19, CARACTERIZADO PORQUE el ARNhd presenta además por lo menos una de las siguientes características:

- (i) la hebra antisentido comprende 2, 3, 4, 5 ó 6 nucleótidos que comprenden modificaciones 2'-fluoro;
- (ii) la hebra antisentido comprende 1, 2, 3 ó 4 enlaces internucleótidos de fosforotioato;
- (iii) la hebra sentido está conjugada con un ligando;
- (iv) la hebra sentido comprende 2, 3, 4 ó 5 nucleótidos que comprenden una modificación 2'-fluoro;
- (v) la hebra sentido comprende 1, 2, 3 ó 4 enlaces internucleótidos de fosforotioato;
- (vi) el ARNhd comprende por lo menos cuatro nucleótidos que comprenden una modificación 2'-fluoro;

(vii) el ARNhd comprende una región de hebra doble de 12-40 pares de nucleótidos de longitud; y

(viii) un extremo romo en el extremo 5' de la hebra antisentido.

21. El agente de ARNhd de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 ó 7-20, CARACTERIZADO PORQUE cada hebra comprende 15-30 nucleótidos.

22. El agente de ARNhd de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 ó 7-20, CARACTERIZADO PORQUE cada hebra comprende 19-30 nucleótidos.

23. El agente de ARNhd de cualquiera de las reivindicaciones 1-20, CARACTERIZADO PORQUE la hebra sentido comprende 21 nucleótidos, y la hebra antisentido comprende 23 nucleótidos.

24. El agente de ARNhd de la reivindicación 2, CARACTERIZADO PORQUE la hebra antisentido comprende una región de complementariedad que comprende por lo menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de los nucleótidos 1440-1480 de la SEQ ID N°: 1.

25. El agente de ARNhd de la reivindicación 2, CARACTERIZADO PORQUE la región de complementariedad comprende por lo menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos 5' – UUUUGUUCAAUCAUUAAGAAGAC – 3' (SEQ ID N°: 419).

26. El agente de ARNhd de la reivindicación 1 ó 2, CARACTERIZADO PORQUE la hebra sentido comprende la secuencia de nucleótidos 5' – CUUCUUA AUGAUUGAACAAAA – 3' (SEQ ID N°: 417) y la hebra antisentido comprende la secuencia de nucleótidos 5' – UUUUGUUCAAUCAUUAAGAAGAC – 3' (SEQ ID N°: 419).

27. El agente de ARNhd de la reivindicación 1 ó 2, CARACTERIZADO PORQUE la hebra sentido comprende la secuencia de nucleótidos 5' –

csusucuuAfaUfGfAfuugaacaaaa – 3' (SEQ ID N°: 33) y la hebra antisentido comprende la secuencia de nucleótidos 5' – usUfsuugu(Tgn)caaucaUfuAfagaagsasc – 3' (SEQ ID N°: 34).

en donde a, g, c, y u son A, G, C y U 2'-O-metilo (2'-OMe), respectivamente; Af, Gf, Cf y Uf son A, G, C y U 2'-fluoro, respectivamente; s es un enlace fosforotioato; y (Tgn) es un isómero S de ácido timidina-glicol nucleico (GNA).

28. Una molécula de ARN de hebra doble (ARNhd), CARACTERIZADA PORQUE inhibe la expresión de un gen de un inhibidor de serina peptidasa, clado a, miembro 1 (Serpina1), que comprende una hebra sentido y una hebra antisentido que forman una región de hebra doble, en donde la hebra sentido comprende la secuencia de nucleótidos 5' - csusucuuAfaUfGfAfuugaacaaaaL96 – 3' (SEQ ID N°: 35) y la hebra antisentido comprende la secuencia de nucleótidos 5' – usUfsuugu(Tgn)caaucaUfuAfagaagsasc – 3' (SEQ ID N°: 34),

en donde a, g, c y u son A, G, C y U 2'-O-metilo (2'-OMe), respectivamente; Af, Gf, Cf y Uf son A, G, C y U 2'-fluoro, respectivamente; s es un enlace fosforotioato; (Tgn) es un isómero S de ácido timidina-glicol nucleico (GNA); y L96 es N-[tris(GalNAc-alkuil)-amidodecanoíl]-4-hidroxiprolinol.

29. Un vector, CARACTERIZADO PORQUE contiene al agente de ARNhd de cualquiera de las reivindicaciones 1-28.

30. Una célula, CARACTERIZADA PORQUE contiene el agente de ARNhd de cualquiera de las reivindicaciones 1-28.

31. Una composición farmacéutica, CARACTERIZADA PORQUE comprende el agente de ARNhd de cualquiera de las reivindicaciones 1-28.

32. La composición farmacéutica de la reivindicación 31,

CARACTERIZADA PORQUE el agente de ARNi se administra en una solución no amortiguada.

33. La composición farmacéutica de la reivindicación 32, CARACTERIZADA PORQUE dicha solución no amortiguada es salina o agua.

34. La composición farmacéutica de la reivindicación 31, CARACTERIZADA PORQUE dicho ARNi se administra con una solución amortiguadora.

35. La composición farmacéutica de la reivindicación 34, CARACTERIZADO PORQUE dicha solución amortiguadora comprende acetato, citrato, prolamina, carbonato o fosfato o cualquier combinación de los mismos.

36. La composición farmacéutica de la reivindicación 34, CARACTERIZADO PORQUE dicha solución amortiguadora es una solución amortiguadora de salina con fosfato (PBS).

37. Un método para inhibir la expresión de Serpina1 en una célula, CARACTERIZADO PORQUE dicho método comprende poner la célula en contacto con el agente de ARNhd de cualquiera de las reivindicaciones 1-28, el vector de la reivindicación 29 o la composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 31-36, para así inhibir la expresión del gen de Serpina1 en la célula.

38. El método de la reivindicación 37, CARACTERIZADO PORQUE dicha célula se encuentra en un sujeto.

39. El método de la reivindicación 38, CARACTERIZADO PORQUE el sujeto es un ser humano.

40. El método de cualquiera de las reivindicaciones 37-39, CARACTERIZADO PORQUE la expresión de Serpina1 es inhibida en por lo

menos aproximadamente un 30%, aproximadamente un 40%, aproximadamente un 50%, aproximadamente un 60%, aproximadamente un 70%, aproximadamente un 80%, aproximadamente un 90%, aproximadamente un 95%, aproximadamente un 98% o aproximadamente un 100%.

41. Un método de tratamiento de un sujeto que padece una enfermedad asociada a Serpina1, CARACTERIZADO PORQUE comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del agente de ARNhd de cualquiera de las reivindicaciones 1-28, el vector de la reivindicación 29 o la composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 31-36, para así tratar a dicho sujeto.

42. El método de la reivindicación 41, CARACTERIZADO PORQUE el sujeto es un ser humano.

43. El método de la reivindicación 41, CARACTERIZADO PORQUE la enfermedad asociada a Serpina1 es un trastorno hepático.

44. El método de la reivindicación 43, CARACTERIZADO PORQUE el trastorno hepático se selecciona del grupo que consiste en una enfermedad hepática crónica, inflamación del hígado, cirrosis, fibrosis hepática y/o carcinoma hepatocelular.

45. El método de la reivindicación 41, CARACTERIZADO PORQUE el agente de ARNi de hebra doble se administra a una dosis de entre aproximadamente 0,01 mg/kg y aproximadamente 10 mg/kg o de entre aproximadamente 0,5 mg/kg y aproximadamente 50 mg/kg.

46. El método de la reivindicación 45, CARACTERIZADO PORQUE el agente de ARNi de hebra doble se administra a una dosis de entre aproximadamente 10 mg/kg y aproximadamente 30 mg/kg.

47. El método de la reivindicación 41, CARACTERIZADO PORQUE el agente de ARNi de hebra doble se administra por vía subcutánea.

48. El método de la reivindicación 41, CARACTERIZADO PORQUE el agente de ARNi de hebra doble se administra por vía intravenosa.

49. El método de la reivindicación 41, CARACTERIZADO PORQUE dicho agente de ARNi se administra en dos o más dosis.

50. Un método para inhibir el desarrollo de carcinoma hepatocelular en un sujeto que tiene una variante de deficiencia de Serpina1, CARACTERIZADO PORQUE comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del agente de ARNhd de cualquiera de las reivindicaciones 1-28, el vector de la reivindicación 29 o la composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 31-36, para así inhibir el desarrollo de carcinoma hepatocelular en el sujeto.

51. El método de la reivindicación 50, CARACTERIZADO PORQUE el sujeto es un primate o un roedor.

52. El método de la reivindicación 50, CARACTERIZADO PORQUE el sujeto es un ser humano.

53. El método de la reivindicación 50, CARACTERIZADO PORQUE el agente de ARNi de hebra doble se administra a una dosis de entre aproximadamente 0,01 mg/kg y aproximadamente 10 mg/kg o de entre aproximadamente 0,5 mg/kg y aproximadamente 50 mg/kg.

54. El método de la reivindicación 53, CARACTERIZADO PORQUE el agente de ARNi de hebra doble se administra a una dosis de entre aproximadamente 10 mg/kg y aproximadamente 30 mg/kg.

55. El método de la reivindicación 50, CARACTERIZADO PORQUE

dicho agente de ARNi se administra en dos o más dosis.

56. El método de la reivindicación 50, CARACTERIZADO PORQUE el agente de ARNi de hebra doble se administra por vía subcutánea.

57. El método de la reivindicación 50, CARACTERIZADO PORQUE el agente de ARNi de hebra doble se administra por vía intravenosa.

58. Un método para reducir la acumulación de Serpina1 mal plegada en el hígado de un sujeto que tiene una variante de deficiencia de Serpina1, CARACTERIZADO PORQUE comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del agente de ARNhd de cualquiera de las reivindicaciones 1-28, el vector de la reivindicación 29 o la composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 31-36, reduciendo de esa manera la acumulación de la Serpina1 mal plegada en el hígado del sujeto.

59. El método de la reivindicación 58, CARACTERIZADO PORQUE el sujeto es un primate o un roedor.

60. El método de la reivindicación 58, CARACTERIZADO PORQUE el sujeto es un ser humano.

61. El método de la reivindicación 58, CARACTERIZADO PORQUE el agente de ARNi de hebra doble se administra a una dosis de entre aproximadamente 0,01 mg/kg y aproximadamente 10 mg/kg o de entre aproximadamente 0,5 mg/kg y aproximadamente 50 mg/kg.

62. El método de la reivindicación 61, CARACTERIZADO PORQUE el agente de ARNi de hebra doble se administra a una dosis de entre aproximadamente 10 mg/kg y aproximadamente 30 mg/kg.

63. El método de la reivindicación 58, CARACTERIZADO PORQUE dicho agente de ARNi se administra en dos o más dosis.

64. El método de la reivindicación 58, CARACTERIZADO PORQUE el agente de ARNi de hebra doble se administra por vía subcutánea.

65. El método de la reivindicación 58, CARACTERIZADO PORQUE el agente de ARNi de hebra doble se administra por vía intravenosa.

p.p. ALNYLAM PHARMACEUTICALS, INC.

Miguel N. Armando (2246)

REIVINDICACIÓN COMPLEMENTARIA

Un agente de ARN de hebra doble (ARNhd), CARACTERIZADO PORQUE inhibe la expresión de un gen de un inhibidor de serina peptidasa, clado a, miembro 1 (Serpina1), que comprende una hebra sentido y una hebra antisentido que forman una región de hebra doble,

en donde la hebra sentido comprende por lo menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N°: 1, y la hebra antisentido comprende por lo menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N°: 15,

en donde dicha hebra antisentido comprende por lo menos una modificación térmicamente desestabilizante de la región de hebra doble en las primeras 9 posiciones de nucleótidos de la región 5' o un precursor de la misma,

en donde dicha hebra sentido comprende un ligando del ASGPR y

en donde cada una entre la hebra sentido y la hebra antisentido son, de manera independiente, de entre 14 y 40 nucleótidos de longitud.

COMPOSICIONES DE ARNi DE SERPINA1 Y SUS MÉTODOS DE USO