

MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA TRATAR UN EVENTO DE SANGRADO EN UN SUJETO QUE PADECE HEMOFILIA

Solicitudes relacionadas

Esta solicitud invoca el beneficio de prioridad de la Solicitud Provisional de Patente de los EEUU N°: 62/530.518, presentada el 10 de julio, 2017, la Solicitud Provisional de Patente de los EEUU N°: 62/599.223, presentada el 15 de diciembre, 2017, la Solicitud Provisional de Patente de los EEUU N°: 62/614.111, presentada el 5 de enero, 2018, y la Solicitud Provisional de Patente de los EEUU N°: 62/673,424, presentada el 18 de mayo, 2018. El contenido completo de cada una de las solicitudes de patente citadas precedentemente se incorpora en la presente a modo de referencia.

Esta solicitud también se relaciona con la Solicitud Internacional N°: PCT/US2016/065245, presentada el 7 de diciembre, 2016, la Solicitud Provisional de Patente de los EEUU N°: 62/264.013, presentada el 7 de diciembre, 2015, la Solicitud Provisional de Patente de los EEUU N°: 62/315.228, presentada el 30 de marzo, 2016, la Solicitud Provisional de Patente de los EEUU N°: 62/366.304, presentada el 25 de julio, 2016, y la Solicitud Provisional de Patente de los EEUU N°: 62/429.241, presentada el 2 de diciembre, 2016. El contenido completo de cada una de las solicitudes de patente citadas precedentemente se incorpora en la presente a modo de referencia.

Además, esta solicitud se relaciona con la Solicitud Provisional de Patente de los EEUU N°: 61/992.057, presentada el 12 de mayo, 2014, la Solicitud Provisional de Patente de los EEUU N°: 62/089.018, presentada el 8 de diciembre, 2014, la Solicitud Provisional de Patente de los EEUU N°:

62/102.281, presentada el 12 de enero, 2015, y la Solicitud Internacional N°: PCT/US2015/030337, presentada el 12 de mayo, 2015. El contenido completo de cada una de las solicitudes de patente citadas precedentemente se incorpora en la presente a modo de referencia.

Esta solicitud también se relaciona con la Solicitud Provisional de Patente de los EEUU N°: 61/638.952, presentada el 26 de abril, 2012, la Solicitud Provisional de Patente de los EEUU N°: 61/669.249, presentada el 9 de julio, 2012, la Solicitud Provisional de Patente de los EEUU N°: 61/734.573, presentada el 7 de diciembre, 2012, la Solicitud de Patente de los EEUU N°: 13/837.129, presentada el 15 de marzo, 2013, ahora Patente de los EEUU N°: 9.127.274, la Solicitud de Patente de los EEUU N°: 14/806.084, presentada el 22 de julio, 2015, ahora Patente de los EEUU N°: 9.376.680, la Patente de los EEUU N°: 15/070.358, presentada el 15 de marzo, 2016, y la Solicitud Internacional N°: PCT/US2013/038218, presentada el 25 de abril, 2013. Esta solicitud también se relaciona con la Solicitud Internacional N°: PCT/US2012/065601, presentada el 16 de noviembre, 2012. El contenido completo de cada una de las solicitudes de patente citadas precedentemente se incorpora en la presente a modo de referencia.

Listado de secuencias

La presente solicitud contiene un Listado de secuencias presentado en formato ASCII por vía electrónica y se incorpora por completo en la presente a modo de referencia. Dicha copia en ASCII fue creada el 2 de julio, 2018, se denomina 117811-02720_SL.TXT y su tamaño es de 21.147 bytes.

Antecedentes de la invención

Serpinc1 es un miembro de la superfamilia de inhibidores de serina proteinasa (*serpina*). Serpinc1 es un inhibidor de proteasas plasmáticas que inhibe la trombina así como otras serina proteasas activadas del sistema de coagulación, tales como los factores X, IX, XI, XII y VII, y, por consiguiente, regula la cascada de coagulación de la sangre. La actividad anticoagulante de Serpinc1 es mejorada gracias a la presencia de heparina y otros glucosaminoglucanos relacionados que catalizan la formación de complejos de trombina:antitrombina (TAT).

Los trastornos de sangrado, ya sean heredados o adquiridos, son condiciones en las cuales hay una coagulación sanguínea inadecuado. Por ejemplo, la hemofilia es un grupo de trastornos de sangrado genéticos hereditarios que afectan la capacidad del cuerpo para controlar la coagulación sanguínea. La hemofilia A es un trastorno genético recesivo ligado al cromosoma X que comprende la falta del Factor VIII de la coagulación funcional y representa el 80% de los casos de hemofilia. La hemofilia B es un trastorno genético recesivo ligado al cromosoma X que comprende la falta del Factor IX de la coagulación funcional. Comprende aproximadamente un 20% de los casos de hemofilia. La hemofilia C es un trastorno genético autosómico que comprende la falta del Factor XI de la coagulación funcional. La hemofilia C no es completamente recesiva, ya que los individuos heterocigotas también muestran un mayor sangrado.

Aunque actualmente no existe una cura para la hemofilia, es posible controlarla con infusiones regulares del factor de coagulación deficiente, por ejemplo, el factor VIII en la hemofilia A. Sin embargo, algunos hemofílicos desarrollan anticuerpos (inhibidores) contra los factores de reemplazo administrados y, por lo tanto, se vuelven refractarios al factor de coagulación de reemplazo. Por lo tanto, en dichos sujetos no es posible controlar los sangrados apropiadamente.

El desarrollo de inhibidores de título elevado, por ejemplo, del factor VIII y de otros factores de coagulación, es la complicación más severa de la terapia de hemofilia y vuelve al tratamiento de los sangrados muy desafiante. Actualmente, las únicas estrategias para detener el sangrado en dichos sujetos son el uso de “agentes de derivación” tal como un actividad de derivación del inhibidor del factor ocho (FEIBA) y el factor VII recombinante activado (rFVIIa), plasmaféresis, reemplazo continuo del factor y una terapia de tolerancia inmune, ninguno de los cuales son completamente efectivos. Por lo tanto, persiste la necesidad en el arte de tratamientos alternativos para los sujetos que sufren de un trastorno de sangrado, tal como la hemofilia.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se basa, por lo menos en parte, en el hallazgo sorprendente que, en los sujetos que padecen hemofilia, sin inhibidores, y a quienes se les administra una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de ARNi que efectúa el clivaje mediado por el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) de los transcritos de ARN de un gen *Serpinc1*, se puede tratar un evento de sangrado con una cantidad terapéuticamente eficaz de un factor de reemplazo, tal como el factor VIII o el Factor XI, que es menor que la cantidad eficaz recomendada de dicho factor de reemplazo, por ejemplo, recomendada por la *World Federation of Hemophilia* (véase, por ejemplo, Srivastava, *et al.*, “Guidelines for the Management of Hemophilia”, publicación electrónica de *Hemophilia* del 6 de julio de 2012; DOI: 10.1111/j.1365-2516,2012.02909.x) y/o por la Administración de Drogas y Alimentos; y que en los sujetos que padecen hemofilia, con inhibidores, y a quienes se les administra una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de ARNi que efectúa el clivaje mediado por el complejo de

silenciamiento inducido por ARN (RISC) de los transcriptos de ARN de un gen *Serpinc1*, se puede tratar un evento de sangrado con una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente de derivación, tal como un concentrado del complejo de protrombina activado (aPCC) o un Factor VIIa recombinante (rFVIIa) que es menor que la cantidad eficaz recomendada del agente de derivación, por ejemplo, recomendada por la *World Federation of Hemophilia* (véase, por ejemplo, Srivastava, *et al.*, “Guidelines for the Management of Hemophilia”, publicación electrónica de *Hemophilia* del 6 de julio de 2012; DOI: 10.1111/j.1365-2516.2012.02909.x) y/o por la Administración de Drogas y Alimentos. .

Por lo tanto, en un aspecto la presente invención provee un método de tratamiento de un evento de sangrado en un sujeto que sufre de un trastorno de sangrado, tal como una hemofilia sin inhibidores. El método incluye administrar al sujeto una dosis fija de entre aproximadamente 30 mg y aproximadamente 90 mg de un agente de ácido ribonucleico de hebra doble (ARNi) que inhibe la expresión de un *Serpinc1*, en donde dicho agente de ARNi de hebra doble comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, donde dicha hebra antisentido comprende una región de complementariedad con un ARNm que codifica *Serpinc1* que comprende por lo menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de 5' - UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG – 3' (SEQ ID N°: 15), en donde sustancialmente todos los nucleótidos de la hebra sentido y sustancialmente todos los nucleótidos de la hebra antisentido son nucleótidos modificados, y en donde la hebra sentido está conjugada con un ligando unido al extremo 3'-terminal; y administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente

eficaz de un factor de reemplazo, en donde la cantidad eficaz del factor de reemplazo está reducida en comparación con la cantidad eficaz recomendada del factor de reemplazo, tratando de esa manera un evento de sangrado en el sujeto que tiene una hemofilia sin inhibidores.

En otro aspecto la presente invención provee un método de tratamiento de un evento de sangrado en un sujeto que sufre de un trastorno de sangrado, tal como una hemofilia con inhibidores. Los métodos incluyen administrar al sujeto una dosis fija de entre aproximadamente 30 mg y aproximadamente 90 mg de un agente de ácido ribonucleico de hebra doble (ARNi) que inhibe la expresión de *Serpinc1*, en donde dicho agente de ARNi de hebra doble comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, donde la hebra antisentido comprende una región de complementariedad con un ARNm que codifica *Serpinc1* que comprende por lo menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de 5' - UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG - 3' (SEQ ID N°: 15), en donde sustancialmente todos los nucleótidos de la hebra sentido y sustancialmente todos los nucleótidos de la hebra antisentido son nucleótidos modificados, y en donde la hebra sentido está conjugada con un ligando unido al extremo 3'-terminal; y administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente de derivación, en donde la cantidad eficaz de dicho agente de derivación está reducida en comparación con la cantidad eficaz recomendada del agente de derivación, tratando de esa manera un evento de sangrado en el sujeto que tiene una hemofilia con inhibidores.

En un aspecto la presente invención provee un método de tratamiento de un evento de sangrado en un sujeto que sufre de un trastorno de sangrado,

tal como una hemofilia sin inhibidores. El método incluye administrar al sujeto una dosis fija de entre aproximadamente 40 mg y aproximadamente 90 mg de un agente de ácido ribonucleico de hebra doble (ARNi) que inhibe la expresión de un *Serpinc1*, en donde dicho agente de ARNi de hebra doble comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, donde dicha hebra antisentido comprende una región de complementariedad con un ARNm que codifica *Serpinc1* que comprende por lo menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de 5' - UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG - 3' (SEQ ID N°: 15), en donde sustancialmente todos los nucleótidos de la hebra sentido y sustancialmente todos los nucleótidos de la hebra antisentido son nucleótidos modificados, y en donde la hebra sentido está conjugada con un ligando unido al extremo 3'-terminal; y administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un factor de reemplazo, en donde la cantidad eficaz del factor de reemplazo está reducida en comparación con la cantidad eficaz recomendada del factor de reemplazo, tratando de esa manera un evento de sangrado en el sujeto que tiene una hemofilia sin inhibidores.

En otro aspecto la presente invención provee un método de tratamiento de un evento de sangrado en un sujeto que sufre de un trastorno de sangrado, tal como una hemofilia con inhibidores. Los métodos incluyen administrar al sujeto una dosis fija de entre aproximadamente 40 mg y aproximadamente 90 mg de un agente de ácido ribonucleico de hebra doble (ARNi) que inhibe la expresión de *Serpinc1*, en donde dicho agente de ARNi de hebra doble comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, donde la hebra antisentido comprende una región de complementariedad con un ARNm que

codifica Serpinc1 que comprende por lo menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de 5' - UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG - 3' (SEQ ID N°: 15), en donde sustancialmente todos los nucleótidos de la hebra sentido y sustancialmente todos los nucleótidos de la hebra antisentido son nucleótidos modificados, y en donde la hebra sentido está conjugada con un ligando unido al extremo 3'-terminal; y administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente de derivación, en donde la cantidad eficaz de dicho agente de derivación está reducida en comparación con la cantidad eficaz recomendada del agente de derivación, tratando de esa manera un evento de sangrado en el sujeto que tiene una hemofilia con inhibidores.

El agente de ARNi de hebra doble se puede administrar al sujeto en dos o más dosis.

En algunas formas de realización, el agente de ARNi de hebra doble se administra al sujeto una vez por 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 necesidad.

En una forma de realización, el agente de ARNi de hebra doble se administra al sujeto una vez por mes. En otra forma de realización, el agente de ARNi de hebra doble se administra al sujeto una vez cada seis semanas. En una forma de realización, el agente de ARNi de hebra doble se administra al sujeto una vez cada 2 meses. En aún otra forma de realización, el agente de ARNi de hebra doble se administra al sujeto una vez por trimestre.

El agente de ARNi de hebra doble se puede administrar al sujeto, por ejemplo, como una dosis fija de entre aproximadamente 25 mg y

aproximadamente 100 mg, por ejemplo, entre aproximadamente 25 mg y aproximadamente 95 mg, entre aproximadamente 25 mg y aproximadamente 90 mg, entre aproximadamente 25 mg y aproximadamente 85 mg, entre aproximadamente 25 mg y aproximadamente 80 mg, entre aproximadamente 25 mg y aproximadamente 75 mg, entre aproximadamente 25 mg y aproximadamente 70 mg, entre aproximadamente 25 mg y aproximadamente 65 mg, entre aproximadamente 25 mg y aproximadamente 60 mg, entre aproximadamente 25 mg y aproximadamente 50 mg, entre aproximadamente 50 mg y aproximadamente 100 mg, entre aproximadamente 50 mg y aproximadamente 95 mg, entre aproximadamente 50 mg y aproximadamente 90 mg, entre aproximadamente 50 mg y 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 y aproximadamente 90 mg, entre aproximadamente 40 mg y aproximadamente 80 mg, entre aproximadamente 60 mg y aproximadamente 100 mg, entre aproximadamente 60 mg y aproximadamente 90 mg, entre aproximadamente 25 mg y aproximadamente 55 mg, entre aproximadamente 25 mg y aproximadamente 65 mg, entre aproximadamente 30 mg y aproximadamente 95 mg, entre aproximadamente 30 mg y aproximadamente 85 mg, entre aproximadamente 30 mg y aproximadamente 75 mg, entre aproximadamente 30 mg y aproximadamente 65 mg, entre aproximadamente 30 mg y aproximadamente 55 mg, entre aproximadamente 40 mg y aproximadamente 95 mg, entre aproximadamente 40 mg y

aproximadamente 85 mg, entre aproximadamente 40 mg y aproximadamente 75 mg, entre aproximadamente 40 mg y aproximadamente 65 mg, entre aproximadamente 40 mg y aproximadamente 55 mg o entre aproximadamente 45 mg y aproximadamente 95 mg.

En algunas formas de realización, el agente de ARNi de hebra doble se puede administrar a una dosis fija de 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 formas de realización, el agente de ARNi de hebra doble se administra al sujeto a una dosis fija de aproximadamente 25 mg; o a una dosis fija de aproximadamente 50 mg; o a una dosis fija de aproximadamente 80 mg; o a una dosis fija de aproximadamente 100 mg.

En una forma de realización, el agente de ARNi de hebra doble se administra al sujeto por vía subcutánea.

En una forma de realización, el sujeto es un ser humano.

La hemofilia puede ser hemofilia A, hemofilia B o hemofilia C.

En una forma de realización, todos los nucleótidos de la hebra orientada en el sentido del marco de lectura y todos los nucleótidos de la hebra antisentido son nucleótidos modificados.

En una forma de realización, los nucleótidos modificados se seleccionan de manera independiente del grupo que consiste en un nucleótido modificado

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

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

En una forma de realización, la región de complementariedad es de entre 19 y 21 nucleótidos de longitud. En otra forma de realización, la región de complementariedad es de entre 21 y 23 nucleótidos de longitud.

En una forma de realización, cada hebra es de no más de 30 nucleótidos de longitud.

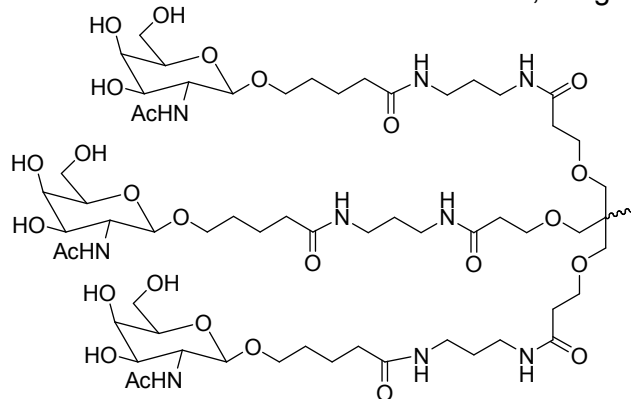
Por lo menos una hebra del agente de ARNi de hebra doble puede comprender una sobreextensión 3' de por lo menos 1 nucleótido o una sobreextensión 3' de por lo menos 2 nucleótidos, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ó 15 nucleótidos. En otras formas de realización, por lo menos una hebra del agente de ARNi comprende una sobreextensión 5' de por lo menos 1 nucleótido. En determinadas formas de realización, por lo menos una hebra comprende una sobreextensión 5' de por lo menos 2 nucleótidos, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ó 15 nucleótidos. En aún otras formas de realización, ambos extremos 3' y 5' de una hebra del agente de ARNi comprenden una sobreextensión de por lo menos 1 nucleótido.

En determinadas formas de realización, el ligando es una N-acetilgalactosamina (GalNAc). El ligando puede ser una o más GalNAc unidas al agente de ARNi por medio de un conector ramificado monovalente, bivalente o trivalente. El ligando se puede conjugar con el extremo 3' de la hebra sentido

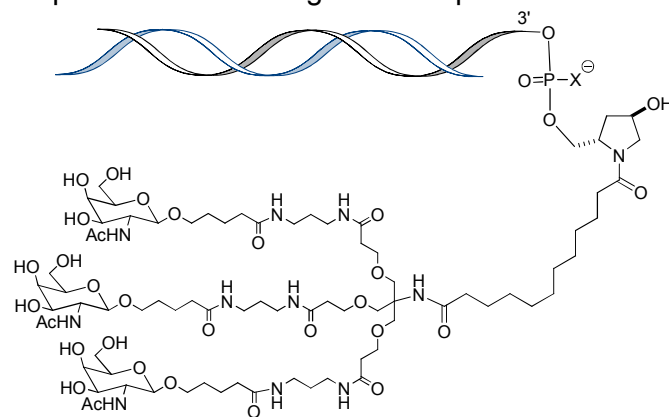
del agente de ARNi de hebra doble, con el extremo 5' de la hebra sentido del agente de ARNi de hebra doble, el extremo 3' de la hebra antisentido del agente de ARNi de hebra doble o el extremo 5' de la hebra antisentido del agente de ARNi de hebra doble.

En algunas formas de realización, los agentes de ARNi de hebra doble de la invención comprenden una pluralidad, por ejemplo, 2, 3, 4, 5 ó 6, de GalNAc, cada uno unido de manera independiente a una pluralidad de nucleótidos del agente de ARNi de hebra doble por medio de una pluralidad de conectores monovalentes.

En determinadas formas de realización, el ligando es



En una forma de realización, el agente de ARNi está conjugado con el ligando representado en el siguiente esquema:



y, en donde X es O o

S.

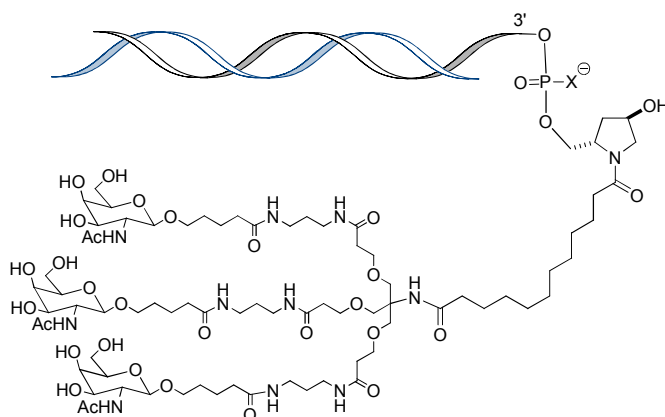
En una forma de realización, X es O.

En una forma de realización, la región de complementariedad consiste en la secuencia de nucleótidos de 5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3' (SEQ ID N°: 15).

En una forma de realización, el agente de ARNi de hebra doble comprende una hebra sentido que comprende la secuencia de nucleótidos de 5'- GGUUAAACACCAUUUACUUCAA -3' (SEQ ID N°: 16), y una hebra antisentido que comprende la secuencia de nucleótidos de 5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3' (SEQ ID N°: 15).

En una forma de realización, la hebra orientada en el sentido del marco de lectura comprende 5'-GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf -3' (SEQ ID N°: 13) y la hebra antisentido comprende 5'-usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg -3' (SEQ ID N°: 14), en donde a, c, g y u son A, C, G o U 2'-O-metilo (2'-OMe); Af, Cf, Gf o Uf son A, C, G, o U 2'-fluoro; y s es un enlace fosforotioato.

En una forma de realización, la hebra orientada en el sentido del marco de lectura comprende 5'-GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf -3' (SEQ ID N°: 13) y la hebra antisentido comprende 5'-usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg -3' (SEQ ID N°: 14), en donde a, c, g y u son A, C, G o U 2'-O-metilo (2'-OMe); Af, Cf, Gf o Uf son A, C, G, o U 2'-fluoro; y s es un enlace fosforotioato; y en donde la hebra sentido está conjugada con el ligando como se muestra en el siguiente esquema



en donde X es O o S.

En una forma de realización, el agente se administra como una composición farmacéutica. En una forma de realización, el agente de ARNi se administra en una solución no amortiguada, tal como salina o agua.

En otra forma de realización, el ARNi se administra con una solución amortiguadora, tal como una solución amortiguadora que comprende acetato, citrato, prolamina, carbonato o fosfato o cualquier combinación de los mismos. En una forma de realización, la solución amortiguadora es una solución amortiguadora salina fosfato (PBS).

En una forma de realización, la administración del agente de ARNhd al sujeto disminuye la actividad de Serpinc1 en aproximadamente un 75% o más.

En una forma de realización, el factor de reemplazo es el Factor VIII. La cantidad terapéuticamente eficaz del factor VIII administrada al sujeto puede ser menor que aproximadamente 200 UI/kg o menor que aproximadamente 190 UI/kg o menor que aproximadamente 180 UI/kg o menor que aproximadamente 170 UI/kg o menor que aproximadamente 160 UI/kg o menor que aproximadamente 150 UI/kg o menor que aproximadamente 140 UI/kg o menor que aproximadamente 130 UI/kg o menor que aproximadamente 120 UI/kg o menor que aproximadamente 110 UI/kg o menor que aproximadamente 100

UI/kg o menor que aproximadamente 90 UI/kg o menor que aproximadamente 80 UI/kg o menor que aproximadamente 70 UI/kg o menor que aproximadamente 60 UI/kg o menor que aproximadamente 50 UI/kg o menor que aproximadamente 40 UI/kg o menor que aproximadamente 30 UI/kg o menor que aproximadamente 20 UI/kg o menor que aproximadamente 10 UI/kg. En una forma de realización, la cantidad terapéuticamente eficaz del Factor VIII administrada al sujeto es de entre aproximadamente una a una y media veces y aproximadamente cinco veces menos que la cantidad eficaz recomendada del Factor VIII, por ejemplo, una dosis de entre aproximadamente 5 UI/kg y aproximadamente 20 UI/kg o entre aproximadamente 10 UI/kg y aproximadamente 20 UI/kg, por ejemplo, de aproximadamente 5, 10, 15 ó 20 UI/kg. En una forma de realización, el evento de sangrado es un evento de sangrado moderado. En otra forma de realización, el evento de sangrado es un evento de sangrado mayor.

En otra forma de realización, el factor de reemplazo es el Factor IX. La cantidad terapéuticamente eficaz del factor IX puede ser menor que aproximadamente 200 UI/kg o menor que aproximadamente 190 UI/kg o menor que aproximadamente 180 UI/kg o menor que aproximadamente 170 UI/kg o menor que aproximadamente 160 UI/kg o menor que aproximadamente 150 UI/kg o menor que aproximadamente 140 UI/kg o menor que aproximadamente 130 UI/kg o menor que aproximadamente 120 UI/kg o menor que aproximadamente 110 UI/kg o menor que aproximadamente 100 UI/kg o menor que aproximadamente 90 UI/kg o menor que aproximadamente 80 UI/kg o menor que aproximadamente 70 UI/kg o menor que aproximadamente 60 UI/kg o menor que aproximadamente 50 UI/kg o menor que aproximadamente 40

UI/kg o menor que aproximadamente 30 UI/kg o menor que aproximadamente 20 UI/kg o menor que aproximadamente 10 UI/kg. En una forma de realización, la cantidad terapéuticamente eficaz del Factor IX administrada al sujeto es de entre aproximadamente dos veces y aproximadamente seis veces menos que la cantidad eficaz recomendada del Factor IX, por ejemplo, una dosis de entre aproximadamente 10 UI/kg y aproximadamente 30 UI/kg o entre aproximadamente 20 y aproximadamente 30 UI/kg, por ejemplo, de aproximadamente 10, 15, 20, 25 o aproximadamente 30 UI/kg. En una forma de realización, el evento de sangrado es un evento de sangrado moderado. En otra forma de realización, el evento de sangrado es un evento de sangrado mayor.

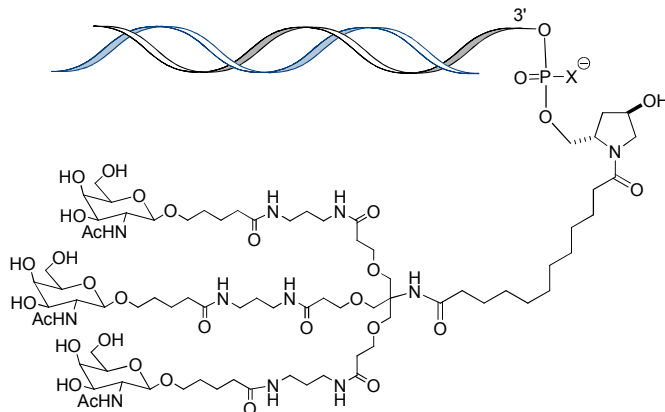
En una forma de realización, el agente de derivación es un concentrado del complejo de protrombina activado (aPCC). La cantidad terapéuticamente eficaz del aPCC puede ser menor que aproximadamente 100 U/kg o menor que aproximadamente 90 U/kg o menor que aproximadamente 80 U/kg o menor que aproximadamente 70 U/kg o menor que aproximadamente 60 U/kg o menor que aproximadamente 50 U/kg o menor que aproximadamente 40 U/kg o menor que aproximadamente 30 U/kg o menor que aproximadamente 20 U/kg o menor que aproximadamente 10 U/kg. En una forma de realización, la cantidad terapéuticamente eficaz de aPCC administrada al sujeto es entre aproximadamente dos veces y aproximadamente tres veces menor que la cantidad eficaz recomendada del aPCC, por ejemplo, una dosis de entre aproximadamente 30 y aproximadamente 50 U/kg. En una forma de realización, el evento de sangrado es un evento de sangrado moderado. En otra forma de realización, el evento de sangrado es un evento de sangrado

mayor.

En otra forma de realización, el agente de derivación es el Factor VIIa recombinante (rFVIIa). La cantidad terapéuticamente eficaz del agente de derivación puede ser menor que aproximadamente 120 µg/kg o menor que aproximadamente 110 µg/kg o menor que aproximadamente 100 µg/kg o menor que aproximadamente 90 µg/kg o menor que aproximadamente 80 µg/kg o menor que aproximadamente 70 µg/kg o menor que aproximadamente 60 µg/kg o menor que aproximadamente 50 µg/kg o menor que aproximadamente 40 µg/kg o menor que aproximadamente 30 µg/kg o menor que aproximadamente 20 µg/kg. En una forma de realización, la cantidad terapéuticamente eficaz de rFVIIa administrada al sujeto es aproximadamente dos veces menor que la cantidad eficaz recomendada del rFVIIa, por ejemplo, una dosis de aproximadamente 45 µg/kg. En una forma de realización, el evento de sangrado es un evento de sangrado moderado. En otra forma de realización, el evento de sangrado es un evento de sangrado mayor.

En un aspecto la presente invención provee un método de tratamiento de un evento de sangrado en un sujeto que sufre de hemofilia, por ejemplo, hemofilia A, hemofilia B o hemofilia C, sin inhibidores. El método incluye administrar, por ejemplo administrar por vía subcutánea, al sujeto una dosis fija de aproximadamente 80 mg de un agente de ácido ribonucleico de hebra doble (ARNi) que inhibe la expresión de un Serpinc1, en donde el agente de ARNi de hebra doble comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde la hebra sentido comprende 5'- GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf – 3' (SEQ ID N°: 13) y la hebra antisentido comprende 5'- usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg – 3' (SEQ ID N°: 14), en donde a, c,

g y u son 2'-O-metilo (2'-OMe) A, C, G o U; Af, Cf, Gf o Uf son A, C, G o U 2'-fluoro; y s es un enlace fosforotioato; y en donde el extremo 3'-terminal de la hebra sentido está conjugada con el ligando que se muestra en el siguiente esquema

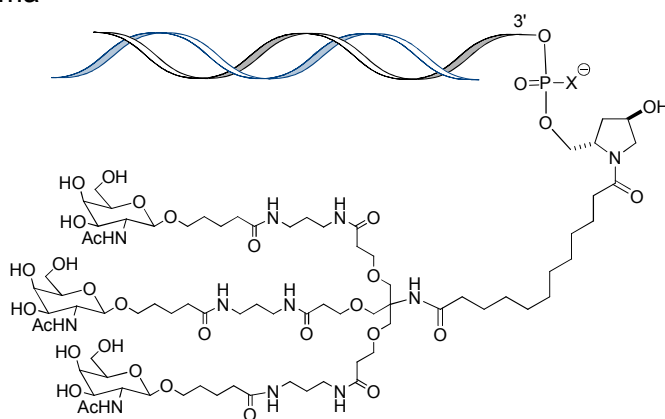


, en donde X es O o S;

y administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un factor de reemplazo, en donde la cantidad eficaz del factor de reemplazo está reducida en comparación con la cantidad eficaz recomendada del factor de reemplazo, tratando de esa manera un evento de sangrado en el sujeto que tiene una hemofilia sin inhibidores.

En otro aspecto la presente invención provee un método de tratamiento de un evento de sangrado en un sujeto que sufre de hemofilia, por ejemplo, hemofilia A, hemofilia B o hemofilia C, con inhibidores. El método incluye administrar, por ejemplo administrar por vía subcutánea, al sujeto una dosis fija de aproximadamente 80 mg de un agente de ácido ribonucleico de hebra doble (ARNi) que inhibe la expresión de un Serpinc1, en donde el agente de ARNi de hebra doble comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde la hebra sentido comprende 5'- GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf – 3' (SEQ ID N°: 13) y la hebra antisentido comprende 5'-

usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg – 3' (SEQ ID N°: 14), en donde a, c, g y u son 2'-O-metilo (2'-OMe) A, C, G o U; Af, Cf, Gf o Uf son A, C, G o U 2'-fluoro; y s es un enlace fosforotioato; y en donde el extremo 3'-terminal de la hebra sentido está conjugada con el ligando que se muestra en el siguiente esquema



, en donde X es O o S;

y administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente de derivación, en donde la cantidad eficaz del agente de derivación está reducida en comparación con la cantidad eficaz recomendada del agente de derivación, tratando de esa manera un evento de sangrado en el sujeto que tiene una hemofilia con inhibidores.

En una forma de realización, la dosis fija del agente de ARNi se administra al sujeto por vía subcutánea.

En una forma de realización, la dosis fija del agente de ARNi se administra al sujeto una vez por mes.

La hemofilia puede ser hemofilia A, hemofilia B o hemofilia C.

Descripción breve de las figuras

La Figura 1A es un gráfico que representa los efectos de una sola dosis subcutánea de 0,03 mg/kg de AT3SC-001 sobre 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 AT3SC-001 sobre 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 sola dosis subcutánea de 0,03 mg/kg de AT3SC-001 sobre 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 sola dosis subcutánea de 0,03 mg/kg de AT3SC-001 sobre 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 sola dosis subcutánea de 0,03 mg/kg de AT3SC-001 sobre los niveles de la proteína AT (Serpinc1) en plasma en un sujeto humano sano.

La Figura 2B es un gráfico que representa los efectos de una sola dosis subcutánea de 0,03 mg/kg de AT3SC-001 sobre los niveles de la proteína AT (Serpinc1) en plasma en un sujeto humano sano.

La Figura 3 es un gráfico que representa la asociación entre el porcentaje de noqueo de AT (Serpinc1) y el porcentaje de aumento en la generación pico de trombina en sujetos sanos que recibieron una sola dosis subcutánea de 0,03 mg/kg de AT3SC-001.

La Figura 4 es un gráfico que representa el efecto de múltiples dosis de 0,015 mg/kg, 0,045 mg/kg o 0,075 mg/kg de AT3SC-001 sobre los niveles de la proteína AT (Serpinc1) en plasma en sujetos humanos que padecen hemofilia A o B.

La Figura 5A es un gráfico que representa el efecto de múltiples

dosis de 0,225 mg/kg, 0,450 mg/kg, 0,900 mg/kg, 1,800 mg/kg u 80 mg de AT3SC-001 sobre los niveles de la proteína AT (Serpinc1) en plasma en sujetos humanos que padecen hemofilia A o B.

La Figura 5B es un gráfico que representa el efecto dependiente de la dosis de AT3SC-001 sobre los niveles de la proteína 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 AT3SC-001 sobre los niveles pico de trombina en sujetos humanos que padecen hemofilia A o B.

La Figura 6B es un gráfico que representa el efecto de múltiples dosis de 0,015 mg/kg o 0,045 mg/kg de AT3SC-001 sobre la generación de trombina como un porcentaje de cambio con relación al grupo basal en sujetos humanos que padecen hemofilia A o B.

La Figura 7 es un gráfico que representa el efecto de múltiples dosis de 0,045 mg/kg de AT3SC-001 sobre el tiempo de formación de coágulos y el tiempo de coagulación en un sujeto que padece hemofilia A (sujeto 101-009).

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

La Figura 9 es un gráfico que representa el efecto de múltiples dosis de AT3SC-001 sobre la generación de trombina por cuartiles que disminuyen AT.

La Figura 10A es un gráfico que representa la actividad AT relativa con relación al porcentaje de generación pico de trombina obtenido con el Factor VIII determinado en un sujeto a quien se le administraron 225 mcg/kg

qM de AT3SC-001.

La Figura 10B es un gráfico que representa la actividad AT relativa con relación al porcentaje de generación pico de trombina obtenido con el Factor VIII determinado en un sujeto a quien se le administraron 1800 mcg/kg qM de AT3SC-001.

La Figura 10C es un gráfico que representa la actividad AT relativa con relación al porcentaje de generación pico de trombina obtenido con el Factor VIII determinado en un sujeto a quien se le administraron 80 mg qM de AT3SC-001.

La Figura 11 es un gráfico que representa el efecto de múltiples dosis de AT3SC-001 sobre eventos de sangrado por cuartiles que disminuyen AT.

La Figura 12 es una tabla que muestra los datos de un evento de sangrado de los sujetos enrolados en la Parte C del ensayo clínico en Fase I de AT3SC-001.

La Figura 13A es un gráfico que muestra la mediana del índice de sangrado anual (ABR) antes de comenzar el estudio, en la parte inicial del estudio y durante la parte de observación del estudio para todas cohortes de dosificación en la Parte C del ensayo clínico en Fase I de AT3SC-001.

La Figura 13B es un gráfico que muestra la mediana del índice de sangrado anual (ABR) antes de comenzar el estudio, en la parte inicial del estudio y durante la parte de observación del estudio para la cohorte mensual de 80 mg (80 mg qM x3) en la Parte C del ensayo clínico en Fase I de AT3SC-001.

La Figura 14A es un gráfico que representa la actividad AT

relativa con relación al porcentaje de generación pico de trombina lograda con el Factor VIII determinada en un sujeto inhibidor a quien se le administra una dosis mensual fija de 50 mg de AT3SC-001.

La Figura 14B es un gráfico que representa la actividad AT relativa con relación al porcentaje de generación pico de trombina lograda con el Factor VIII determinada en un sujeto inhibidor a quien se le administra una dosis mensual fija de 50 mg de AT3SC-001.

La Figura 14C es un gráfico que representa la actividad AT relativa con relación al porcentaje de generación pico de trombina lograda con el Factor VIII determinada en un sujeto inhibidor a quien se le administra una dosis mensual fija de 50 mg de AT3SC-001.

La Figura 14D es un gráfico que representa la actividad AT relativa con relación al porcentaje de generación pico de trombina lograda con el Factor VIII determinada en un sujeto inhibidor a quien se le administra una dosis mensual fija de 50 mg de AT3SC-001.

La Figura 14E es un gráfico que representa la actividad AT relativa con relación al porcentaje de generación pico de trombina lograda con el Factor VIII determinada en un sujeto inhibidor a quien se le administra una dosis mensual fija de 50 mg de AT3SC-001.

La Figura 14F es un gráfico que representa la actividad AT relativa con relación al porcentaje de generación pico de trombina lograda con el Factor VIII determinada en un sujeto inhibidor a quien se le administra una dosis mensual fija de 50 mg de AT3SC-001.

La Figura 15 es un gráfico que representa el efecto de múltiples dosis de 50 mg u 80 mg de AT3SC-001 sobre la actividad promedio de AT

(Serpinc1) con relación al nivel basal en sujetos humanos que padecen hemofilia A o B con inhibidores.

La Figura 16 es un gráfico que muestra que el efecto de disminución de AT de múltiples dosis de 50 mg de AT3SC-001 se correlaciona con un aumento en la generación de trombina en un sujeto que padece hemofilia A.

La Figura 17A es una tabla que muestra los datos de un evento de sangrado de los sujetos enrolados en la Parte D del ensayo clínico en Fase I de AT3SC-001.

La Figura 17B es un gráfico que muestra la mediana del índice de sangrado anual (ABR) antes de comenzar el estudio, en la parte inicial del estudio y durante la parte de observación del estudio para todos los sujetos en la Parte D del ensayo clínico en Fase I de AT3SC-001.

La Figura 18 es un gráfico que representa el efecto de múltiples dosis de 80 mg de AT3SC-001 sobre la actividad promedio de AT (Serpinc1) con relación al nivel basal en un sujeto humano que padece hemofilia sin inhibidores en el estudio de extensión de etiqueta abierta (OLE) en Fase II de AT3SC-001.

La Figura 19A es un gráfico que representa el efecto de múltiples dosis de 50 mg u 80 mg de AT3SC-001 sobre la actividad promedio de AT (Serpinc1) con relación al nivel basal en sujetos humanos que padecen Hemofilia A o B con o sin inhibidores en el estudio de extensión de etiqueta abierta (OLE) en Fase II de AT3SC-001.

La Figura 19B es un gráfico que representa el efecto de múltiples dosis de 50 mg o 80 mg de AT3SC-001 sobre la generación pico de trombina

en sujetos humanos que padecen hemofilia A o B con o sin inhibidores en el estudio de extensión de etiqueta abierta (OLE) en Fase II de AT3SC-001. La porción sombreada del gráfico representa el rango de los niveles pico de trombina observada en voluntarios humanos sanos (HV) a quienes se les administra AT3SC-001 y con menos que un 25% de noqueo de AT en el ensayo en Fase I de AT3SC-001 que se describe en el Ejemplo 1. La línea de puntos que atraviesa el rango HV representa la mediana del nivel pico de trombina observado en voluntarios humanos sanos (HV) y con menos que un 25% de noqueo de AT a quienes se les administra AT3SC-001 en el ensayo en Fase I de AT3SC-001 que se describe en el Ejemplo 1.

La Figura 20A es un gráfico que muestra la mediana del índice de sangrado anual (ABR) antes de comenzar el estudio, en la parte inicial del estudio y durante la parte de observación del estudio para sujetos que padecen hemofilia A o B sin inhibidores de los sujetos en el ensayo clínico OLE en Fase II de AT3SC-001.

La Figura 20B es un gráfico que muestra la mediana del índice de sangrado anual (ABR) antes de comenzar el estudio y durante la parte de observación del estudio para sujetos que padecen hemofilia A o B con inhibidores de los sujetos en el ensayo clínico OLE en Fase II de AT3SC-001.

La Figura 21 es una tabla que muestra las características de los eventos de sangrado experimentados en pacientes con Hemofilia A o B con o sin inhibidores en el ensayo clínico OLE de Fase II de AT3SC-001.

La Figura 22 es una tabla que muestra el manejo de los eventos de sangrado experimentados en pacientes con Hemofilia A o B sin inhibidores en el ensayo clínico OLE de Fase II de AT3SC-001.

La Figura 23 es una tabla que muestra las características de los eventos de sangrado experimentados en pacientes con Hemofilia A o B con inhibidores en el ensayo clínico OLE de Fase II de AT3SC-001.

La Figura 24A es un gráfico que muestra el efecto de una dosis fija mensual de 50 mg u 80 mg de AT3SC-001 sobre la cantidad del Factor VIII requerida para manejar los sangrados en sujetos con hemofilia A, sin inhibidores.

La Figura 24B es un gráfico que muestra el efecto de una dosis fija mensual de 50 mg u 80 mg de AT3SC-001 sobre la cantidad del Factor IX requerida para manejar los sangrados en sujetos con hemofilia B, sin inhibidores.

La Figura 24C es un gráfico que muestra el efecto de una dosis fija mensual de 50 mg u 80 mg de AT3SC-001 sobre la cantidad del Factor rFVIIa requerida para manejar los sangrados en sujetos con hemofilia A o B, con inhibidores.

La Figura 24D es un gráfico que muestra el efecto de una dosis fija mensual de 50 mg u 80 mg de AT3SC-001 sobre la cantidad de aPCC requerida para manejar los sangrados en sujetos con hemofilia A o B, con inhibidores.

La Figura 25A es un gráfico que representa el efecto de adición de aPCC sobre la generación de trombina en muestras de plasma de un sujeto que padece hemofilia A con inhibidores antes (línea inferior) y después (línea superior) de administrarle AT3SC-001 al sujeto.

La Figura 25B es un gráfico que representa el efecto de adición de rFVIIa sobre la generación de trombina en muestras de plasma de un sujeto

que padece hemofilia A con inhibidores antes (línea inferior) y después (línea superior) de administrarle AT3SC-001 al sujeto.

La Figura 26A es un gráfico que representa el efecto de adición de aPCC sobre la generación de trombina en muestras de plasma de un sujeto que padece hemofilia A sin inhibidores antes (línea inferior) y después (línea superior) de administrarle AT3SC-001 al sujeto.

La Figura 26B es un gráfico que representa el efecto de adición de rFVIIa sobre la generación de trombina en muestras de plasma de un sujeto que padece hemofilia A sin inhibidores antes (línea inferior) y después (línea superior) de administrarle AT3SC-001 al sujeto.

La Figura 26C es un gráfico que representa el efecto de adición de aPCC sobre la generación de trombina en muestras de plasma de un sujeto que padece hemofilia A sin inhibidores antes (línea inferior) y después (línea superior) de administrarle AT3SC-001 al sujeto.

La Figura 26D es un gráfico que representa el efecto de adición de rFVIIa sobre la generación de trombina en muestras de plasma de un sujeto que padece hemofilia A sin inhibidores antes (línea inferior) y después (línea superior) de administrarle AT3SC-001 al sujeto.

La Figura 26E es un gráfico que representa el efecto de adición de aPCC sobre la generación de trombina en muestras de plasma de un sujeto que padece hemofilia A sin inhibidores antes (línea inferior) y después (línea superior) de administrarle AT3SC-001 al sujeto.

La Figura 26F es un gráfico que representa el efecto de adición de rFVIIa sobre la generación de trombina en muestras de plasma de un sujeto que padece hemofilia A sin inhibidores antes (línea inferior) y después (línea superior) de administrarle AT3SC-001 al sujeto.

superior) de administrarle AT3SC-001 al sujeto.

La Figura 26G es un gráfico que representa el efecto de adición de aPCC sobre la generación de trombina en muestras de plasma de un sujeto que padece hemofilia A sin inhibidores antes (línea inferior) y después (línea superior) de administrarle AT3SC-001 al sujeto.

La Figura 26H es un gráfico que representa el efecto de adición de rFVIIa sobre la generación de trombina en muestras de plasma de un sujeto que padece hemofilia A sin inhibidores antes (línea inferior) y después (línea superior) de administrarle AT3SC-001 al sujeto.

La Figura 26I es un gráfico que representa el efecto de adición de aPCC sobre la generación de trombina en muestras de plasma de un sujeto que padece hemofilia A sin inhibidores antes (línea inferior) y después (línea superior) de administrarle AT3SC-001 al sujeto.

La Figura 26J es un gráfico que representa el efecto de adición de rFVIIa sobre la generación de trombina en muestras de plasma de un sujeto que padece hemofilia A sin inhibidores antes (línea inferior) y después (línea superior) de administrarle AT3SC-001 al sujeto.

La Figura 26K es un gráfico que representa el efecto de adición de aPCC sobre la generación de trombina en muestras de plasma de un sujeto que padece hemofilia A sin inhibidores antes (línea inferior) y después (línea superior) de administrarle AT3SC-001 al sujeto.

La Figura 26L es un gráfico que representa el efecto de adición de rFVIIa sobre la generación de trombina en muestras de plasma de un sujeto que padece hemofilia A sin inhibidores antes (línea inferior) y después (línea superior) de administrarle AT3SC-001 al sujeto.

La Figura 26M es un gráfico que representa el efecto de adición de aPCC sobre la generación de trombina en muestras de plasma de un sujeto que padece hemofilia A sin inhibidores antes (línea inferior) y después (línea superior) de administrarle AT3SC-001 al sujeto.

La Figura 26N es un gráfico que representa el efecto de adición de rFVIIa sobre la generación de trombina en muestras de plasma de un sujeto que padece hemofilia A sin inhibidores antes (línea inferior) y después (línea superior) de administrarle AT3SC-001 al sujeto.

La Figura 27A es un gráfico que representa el efecto de múltiples dosis de AT3SC-001 sobre la generación de trombina mediante disminución de los cuartiles AT en muestras clínicas de la extensión de etiqueta abierta (OLE) de Fase I/II.

La Figura 27B es un gráfico que representa el efecto simulado de múltiples dosis de AT3SC-001 sobre la generación de trombina por cuartiles que disminuyen AT.

La Figura 27C es un diagrama de dispersión que representa la fuerte correlación entre la TG simulada (Figura 27B) y la TG medida (Figura 27A).

La Figura 28A representa curvas de generación de trombina simulada *in silico* para varios niveles de AT y 0,1% del Factor FVIII (que simula una Hemofilia A severa).

La Figura 28B es una representación de un mapa de calor del pico de trombina a varias dosis del Factor VIII (dosis única) y el nivel de AT para la Hemofilia A severa.

La Figura 28C es una representación de un mapa de calor del

pico de trombina a varias dosis de FIX (dosis única) y el nivel de AT para la Hemofilia B severa.

La Figura 29 A es un gráfico que representa el potencial pico de trombina simulado (nM) en función del tiempo para 5, 10, 20 y 50 UI/kg del factor FVIII con AT al 100%.

La Figura 29B es un gráfico que representa el potencial pico de trombina simulado (nM) en función del tiempo para 5, 10, 20 UI/kg del factor FVIII con AT al 20% del nivel basal.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se basa, por lo menos en parte, en el hallazgo sorprendente que, en sujetos que padecen hemofilia (por ejemplo, hemofilia A, hemofilia B o Hemofilia C), sin inhibidores, y a quienes se les administra una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de ARNi que efectúa el clivaje mediado por el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) de los transcritos de ARN de un gen *Serpinc1*, se puede tratar un evento de sangrado con una cantidad terapéuticamente eficaz de un factor de reemplazo, tal como el factor VIII o el Factor XI, que es menor que la cantidad eficaz recomendada de dicho factor de reemplazo, por ejemplo, recomendada por la *World Federation of Hemophilia* (véase, por ejemplo, Srivastava, *et al.*, “Guidelines for the Management of Hemophilia”, publicación electrónica de *Hemophilia* del 6 de julio de 2012; DOI: 10.1111/j.1365-2516.2012.02909.x; cuyos contenidos completos se incorporan en la presente a modo de referencia) y/o por la Administración de Drogas y Alimentos (véase, por ejemplo, ADVATE (prospecto del producto del Factor Antihemofílico (Recombinante)); 11/2016; BeneFIX (prospecto del producto del Factor de

Coagulación IX (Recombinante); 11/2011; cuyos contenidos completos se incorporan en la presente a modo de referencia). Por lo tanto, la presente invención provee un método de tratamiento de un evento de sangrado en un sujeto que tiene una hemofilia sin inhibidores. El método incluye administrar al sujeto una dosis fija de entre aproximadamente 30 mg y aproximadamente 90 mg de un agente de ácido ribonucleico de hebra doble (ARNi) que inhibe la expresión de un *Serpinc1*, en donde dicho agente de ARNi de hebra doble comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, donde dicha hebra antisentido comprende una región de complementariedad con un ARNm que codifica *Serpinc1* que comprende por lo menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de 5' - UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG - 3' (SEQ ID N°: 15), en donde sustancialmente todos los nucleótidos de la hebra sentido y sustancialmente todos los nucleótidos de la hebra antisentido son nucleótidos modificados, y en donde la hebra sentido está conjugada con un ligando unido al extremo 3'-terminal; y administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un factor de reemplazo, en donde la cantidad eficaz del factor de reemplazo está reducida en comparación con la cantidad eficaz recomendada del factor de reemplazo, tratando de esa manera un evento de sangrado en el sujeto que tiene una hemofilia sin inhibidores.

En otro aspecto la presente invención provee un método de tratamiento de un evento de sangrado en un sujeto que sufre de hemofilia sin inhibidores. El método incluye administrar al sujeto una dosis fija de entre aproximadamente 40 mg y aproximadamente 90 mg de un agente de ácido ribonucleico de hebra doble (ARNi) que inhibe la expresión de un *Serpinc1*, en

donde dicho agente de ARNi de hebra doble comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, donde dicha hebra antisentido comprende una región de complementariedad con un ARNm que codifica Serpinc1 que comprende por lo menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de 5' - UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG – 3' (SEQ ID N°: 15), en donde sustancialmente todos los nucleótidos de la hebra sentido y sustancialmente todos los nucleótidos de la hebra antisentido son nucleótidos modificados, y en donde la hebra sentido está conjugada con un ligando unido al extremo 3'-terminal; y administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un factor de reemplazo, en donde la cantidad eficaz del factor de reemplazo está reducida en comparación con la cantidad eficaz recomendada del factor de reemplazo, tratando de esa manera un evento de sangrado en el sujeto que tiene una hemofilia sin inhibidores.

La presente invención también se basa, por lo menos en parte, en el descubrimiento que en sujetos que padecen hemofilia (por ejemplo, hemofilia A, hemofilia B o Hemofilia C), con inhibidores, y a quienes se les administra una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de ARNi que efectúa el clivaje mediado por el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) de los transcritos de ARN de un gen Serpinc1, se puede tratar un evento de sangrado con una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente de derivación, tal como un concentrado del complejo de protrombina activado (aPCC) o el Factor VIIa recombinante (rFVIIa) que es menor que la cantidad eficaz recomendada del agente de derivación, por ejemplo, recomendada por la *World Federation of Hemophilia* (véase, por ejemplo, Srivastava, *et al.*, “Guidelines for the Management of Hemophilia”, publicación electrónica

Hemofilia del 6 de julio 2012; DOI: 10.1111/j.1365-2516,2012.02909.x) y/o la Administración de Drogas y Alimentos (véase, por ejemplo, NovoSeven RT, prospecto del producto del Factor VIIA de coagulación (Recombinante); 07/2014; FEIBA, prospecto del producto de Complejo de Coagulación Antilnhibidor; 11/2013; cuyos contenidos completos se incorporan en la presente a modo de referencia).

Por lo tanto, en otro aspecto la presente invención provee un método de tratamiento de un evento de sangrado en un sujeto que tiene una hemofilia con inhibidores. Los métodos incluyen administrar al sujeto una dosis fija de entre aproximadamente 30 mg y aproximadamente 90 mg de un agente de ácido ribonucleico de hebra doble (ARNi) que inhibe la expresión de *Serpinc1*, en donde dicho agente de ARNi de hebra doble comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, donde la hebra antisentido comprende una región de complementariedad con un ARNm que codifica *Serpinc1* que comprende por lo menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de 5' - UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCG - 3' (SEQ ID N°: 15), en donde sustancialmente todos los nucleótidos de la hebra sentido y sustancialmente todos los nucleótidos de la hebra antisentido son nucleótidos modificados, y en donde la hebra sentido está conjugada con un ligando unido al extremo 3'-terminal; y administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente de derivación, en donde la cantidad eficaz de dicho agente de derivación está reducida en comparación con la cantidad eficaz recomendada, por ejemplo, aprobada por la Administración de Drogas y alimentos, del agente de derivación, tratando de esa manera un evento de sangrado en el sujeto que tiene una hemofilia con inhibidores.

En otro aspecto la presente invención provee un método de tratamiento de un evento de sangrado en un sujeto que sufre de hemofilia con inhibidores. Los métodos incluyen administrar al sujeto una dosis fija de entre aproximadamente 40 mg y aproximadamente 90 mg de un agente de ácido ribonucleico de hebra doble (ARNi) que inhibe la expresión de Serpinc1, en donde dicho agente de ARNi de hebra doble comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, donde la hebra antisentido comprende una región de complementariedad con un ARNm que codifica Serpinc1 que comprende por lo menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de 5' - UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG – 3' (SEQ ID N°: 15), en donde sustancialmente todos los nucleótidos de la hebra sentido y sustancialmente todos los nucleótidos de la hebra antisentido son nucleótidos modificados, y en donde la hebra sentido está conjugada con un ligando unido al extremo 3'-terminal; y administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente de derivación, en donde la cantidad eficaz de dicho agente de derivación está reducida en comparación con la cantidad eficaz recomendada, por ejemplo, aprobada por la Administración de Drogas y alimentos, del agente de derivación, tratando de esa manera un evento de sangrado en el sujeto que tiene una hemofilia con inhibidores.

Los agentes de ARNi para usar en los métodos de la invención en general incluyen una hebra de ARN (la hebra antisentido) que tiene una región que es de aproximadamente 30 nucleótidos o menos de longitud, por ejemplo, 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 ó 21-22 nucleótidos de longitud, donde dicha región es sustancialmente complementaria de al menos una parte de un transcripto de ARNm de un gen *Serpinc1*.

En otras formas de realización, una o ambas hebras de los agentes de ARNi de hebra doble de la invención es de hasta 66 nucleótidos de longitud, por ejemplo, 36-66, 26-36, 25-36, 31-60, 22-43, 27-53 nucleótidos de longitud, con una región de por lo menos 19 nucleótidos contiguos que es sustancialmente complementaria de por lo menos una parte de un transcripto de ARNm de un gen *Serpinc1*. En algunas formas de realización, las hebras sentido y antisentido forman una dupla de 18-30 nucleótidos contiguos.

En algunas formas de realización, los agentes de ARNi para usar en los métodos de la invención incluyen una hebra de ARN (la hebra antisentido) que puede ser de hasta 66 nucleótidos de longitud, por ejemplo, 36-66, 26-36, 25-36, 31-60, 22-43, 27-53 nucleótidos de longitud, con una región de por lo menos 19 nucleótidos contiguos que es sustancialmente complementaria de por lo menos una parte de un transcripto de ARNm de un gen *Serpinc1*. En algunas formas de realización, dichos agentes de ARNi que tienen hebras antisentido más largas pueden incluir una segunda hebra de ARN (la hebra sentido) de 20-60 nucleótidos de longitud, en donde las hebras sentido y antisentido forman un dúplex de 18-30 nucleótidos contiguos.

La siguiente descripción detallada divulga la manera de elaborar y usar las composiciones que contienen a los ARNi para inhibir la expresión de un gen *Serpinc1*, así como composiciones, usos y métodos para tratar sujetos que sufren de

enfermedades y trastornos que pudieran verse beneficiados con la inhibición y/o con la reducción de la expresión de este gen.

I. Definiciones

Para que se pueda comprender más fácilmente la presente invención, primero se definirán algunos términos. Además, se debería destacar que siempre que se menciona un valor o un rango de valores de un parámetro, los valores y los rangos intermedios de los valores mencionados también forman parte de esta invención.

El artículo "un" y "una" se usan en la presente para hacer referencia a uno o a más de uno (es decir, a por lo menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento, por ejemplo, una pluralidad de elementos.

El término "incluyendo" se emplea en la presente para hacer referencia y para usar indistintamente con la frase "incluyendo, pero en un sentido no taxativo".

El término "o" se emplea en la presente para hacer referencia y para usar indistintamente con el término "y/o" a menos que el contexto claramente indique de otra manera.

Según se usa en la presente, "Serpinc1" se refiere a un polipéptido particular expresado en una célula. Serpinc1 también se conoce como el inhibidor de serpina peptidasa, clado C (antitrombina; AT), miembro 1; antitrombina III; AT3; antitrombina; y cofactor de heparina 1. La secuencia de un transcripto de ARNm de Serpinc1 humano se puede consultar, por ejemplo, en GenBank Acceso N° GI: 254588059 (NM_000488; SEQ ID N°: 1). La secuencia del ARNm Serpinc1 de mono Rhesus se puede consultar, por ejemplo, en GenBank Acceso N° GI: 157167169 (NM_001104583; SEQ ID N°: 2). La secuencia del ARNm Serpinc1 de ratón se puede consultar, por ejemplo, en GenBank Acceso N°: GI:237874216 (NM_080844; SEQ ID N°: 3). La secuencia del

ARNm Serpinc1 de rata se puede consultar, por ejemplo, en GenBank Acceso N° GI: 58865629 (NM_001012027; SEQ ID N°: 4).

El término “Serpinc1” según se usa en la presente también se refiere a un polipéptido particular expresado en una célula por variaciones de una secuencia de ADN natural del gen Serpinc1, tal como un polimorfismo de un solo nucleótido en el gen Serpinc1. Se han identificado numerosos SNP en el gen Serpinc1 y se puede consultar, por ejemplo, en NCBI dbSNP (véase, por ejemplo, www.ncbi.nlm.nih.gov/snp). Los ejemplos no taxativos de SNP en el gen Serpinc1 se pueden consultar en NCBI dbSNP Accesos N°: rs677; rs5877; rs5878; rs5879; rs941988; rs941989; rs1799876; rs19637711; rs2008946; y rs2227586. Según se usa en la presente, un “sujeto” es un animal, tal como un mamífero, inclusive un primate (tal como, un ser humano, un primate no humano, por ejemplo un mono y un chimpancé), un animal no primate (tal como, una vaca, un cerdo, un camello, una llama, un caballo, una cabra, un conejo, una oveja, un hámster, un cobayo, un gato, un perro, una rata, un ratón, un caballo y una ballena) o un ave (por ejemplo, un pato o un ganso). En una forma de realización, el sujeto es un ser humano, tal como un humano bajo tratamiento o evaluado por una enfermedad, un trastorno o una condición que pudiera verse beneficiado con la reducción de la expresión de Serpinc1; un ser humano con riesgo de sufrir una enfermedad, un trastorno o una condición que pudiera verse beneficiado con la reducción de la expresión de Serpinc1; un ser humano que sufre de una enfermedad, un trastorno o una condición que pudiera verse beneficiado con la reducción de la expresión de Serpinc1; y/o un ser humano bajo tratamiento por una enfermedad, un trastorno o una condición que pudiera verse beneficiado con la reducción de la expresión de Serpinc1 como se describe en la presente.

Según se usa en la presente, los términos “tratar” o “tratamiento” se refieren a un resultado beneficioso o deseado incluyendo, pero en un sentido no taxativo, el alivio o la mejor de uno o más síntomas, la disminución del grado de sangrado, un estado estabilizado (es decir, que no está empeorando) de sangrado, una mejora o paliación del sangrado, ya sea detectable o no detectable, o la resolución del sangrado. El término “tratamiento” también puede significar la prolongación de la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada en la ausencia de tratamiento. En los métodos de la invención, el tratamiento incluye un tratamiento a demanda y el control de los episodios de sangrado, el manejo quirúrgico del sangrado y una profilaxis de rutina para reducir la frecuencia de los episodios de sangrado.

El término “menor” en el contexto del nivel de un Serpinc1 en un sujeto o de un marcador o síntoma de la enfermedad se refiere a una disminución estadísticamente significativa en dicho nivel. La disminución puede ser, por ejemplo, de por lo menos un 10%, por lo menos un 15%, por lo menos un 20%, por lo menos un 25%, por lo menos un 30%, por lo menos un 35%, por lo menos un 40%, por lo menos un 45%, por lo menos un 50%, por lo menos un 55%, por lo menos un 60%, por lo menos un 65%, por lo menos un 70%, por lo menos un 75%, por lo menos un 80%, por lo menos un 85%, por lo menos un 90%, por lo menos un 95% o más y preferiblemente disminuye hasta un nivel aceptado como dentro del rango normal para un individuo que no sufre de dicho trastorno.

Según se usa en la presente, el término “prevención” o “prevenir”, cuando se usa con referencia a una enfermedad, un trastorno o una condición del mismo, que pudiera verse beneficiado con la reducción de la expresión de

un gen Sertpinc1, se refiere a una reducción en la “probabilidad” que un sujeto pueda desarrollar un síntoma asociado con una enfermedad, un trastorno o una condición tal, por ejemplo, un síntoma tal como el sangrado. La “probabilidad” de desarrollar sangrado se reduce, por ejemplo, cuando un individuo que presenta uno o más factores de riesgo de sangrado no desarrolla dicho sangrado o desarrolla un sangrado de menor severidad con relación a una población que presenta los mismos factores de riesgo y que no recibe tratamiento como se describe en la presente. Se considera que hay una prevención efectiva si no hay desarrollo de una enfermedad, un trastorno o una condición o si se reduce el desarrollo de un síntoma asociado con una enfermedad, un trastorno o una condición tal (por ejemplo, en por lo menos un 10% aproximadamente sobre una escala clínicamente aceptada para dicha enfermedad o trastorno) o si se presenta una demora en los síntomas (por ejemplo, de días, semanas, meses o años).

Según se usa en la presente, el término “trastorno de sangrado” es una enfermedad o un trastorno que da como resultado una pobre coagulación de la sangre y/o un sangrado excesivo. Un trastorno de sangrado puede ser un trastorno heredado, tal como una hemofilia o la enfermedad de von Willebrand, o un trastorno adquirido, asociado, por ejemplo, con coagulación intravascular diseminada, eclampsia asociada con el embarazo, deficiencia de vitamina K, un trastorno autoinmune, enfermedad intestinal inflamatoria, colitis ulcerosa, un trastorno dermatológico (por ejemplo, psoriasis, pénfigo), una enfermedad respiratoria (por ejemplo, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica), una reacción alérgica a drogas, por ejemplo, como resultado de medicaciones, tal como aspirina, heparina y warfarina, diabetes, una infección aguda por hepatitis

B, una infección por hepatitis C aguda, una forma maligna o un tumor sólido (por ejemplo, de próstata, de pulmón, de colon, de páncreas, de estómago, de ductos biliares, de cabeza y cuello, cérvicouterino, de mama, melanoma, de riñón y/o una forma maligna hematológica). En una forma de realización, un trastorno heredado de sangrado es una hemofilia, por ejemplo, una hemofilia A, B o C. En una forma de realización, un sujeto que sufre de un trastorno heredado de sangrado, por ejemplo, una hemofilia, ha desarrollado inhibidores, por ejemplo, inhibidores de aloanticuerpos, para reemplazar las terapias de coagulación y en la presente se denomina “sujeto inhibidor”. En una forma de realización, el sujeto inhibidor tiene hemofilia A. En otra forma de realización, el sujeto inhibidor tiene hemofilia B. En aún otra forma de realización, el sujeto inhibidor tiene hemofilia C.

En una forma de realización, el trastorno de sangrado es un trastorno de sangrado raro (RBD). Un RBD puede ser un RBD adquirido o un RBD heredado. Los RBD heredados incluyen trastornos asociados con deficiencias de los factores de coagulación fibrinógeno, FII, FV, FV y FVIII combinados, FVII, FX, FXI, FXIII y una deficiencia congénita de factores dependientes de la vitamina K (VKCFD). En general se transmiten como condiciones recesivas autosómicas aunque, en algunos casos, tal como FXI y una disfibrinogenomia, pueden ser dominantes autosómicos. Los RBD se han descrito en la mayoría de las poblaciones, con una incidencia de homocigotas o heterocigotas dobles que varía entre 1 en 500.000 para la deficiencia de FVII y 1 en 2 a 3 millones para las deficiencias de protrombina y FXIII. La frecuencia relativa varía entre las poblaciones, siendo mayor donde son comunes los matrimonios consanguíneos o endogámicos, con una mayor frecuencia de los genes

mutantes específicos.

Los ejemplos de RBD incluyen afibrinogenemia (fibrinógeno; deficiencia del Factor I); hipofibrinogenemia (fibrinógeno; deficiencia del Factor I); disfibrinogenemia (fibrinógeno; deficiencia del Factor I); hipodisfibrinogenemia (fibrinógeno; deficiencia del Factor I); hipoprotrombinemia (protrombina; deficiencia del Factor II); deficiencia de protrombina (protrombina; deficiencia del Factor II); trombofilia (protrombina; deficiencia del Factor II); deficiencia de antitrombina III congénita (tromboplastinas; Factor III; factor tisular); parahemofilia (proacelerina; Factor V; factor lábil); enfermedad de Owren (proacelerina; Factor V; factor lábil); resistencia a Proteína C activada (proacelerina; Factor V; factor lábil); enfermedad de Alexander (factor estable proconvertina; Factor VII); deficiencia congénita de proconvertina/Factor VII (factor estable proconvertina; Factor VII); deficiencia de Stuart-Prower (factor de Stuart-Prower; Factor X); deficiencia congénita del Factor XIIIa/b (es el factor estabilizante de fibrina; Factor XIII); deficiencia heredada del Factor XIII (factor estabilizante de fibrina; Factor XIII); y deficiencia del factor estabilizante de fibrina (factor estabilizante de fibrina; Factor XIII).

Una "cantidad terapéuticamente eficaz", según se usa en la presente, pretende incluir la cantidad de un agente de ARNi que, cuando es administrada a un sujeto que sufre de un trastorno de sangrado y sangrado, es suficiente para el tratamiento de la enfermedad (por ejemplo, por disminución, alivio o mantenimiento de la enfermedad existente o de uno o más síntomas de enfermedad). La "cantidad terapéuticamente eficaz" puede variar dependiendo del agente de ARNi, de la manera en que se administra el agente, la enfermedad y su severidad y los antecedentes, edad, peso, historia familiar,

constitución genética, los tipos de tratamientos precedentes o concomitantes, si hubiera alguno, y otras características individuales del sujeto a tratar.

Una “cantidad profilácticamente eficaz”, según se usa en la presente, pretende incluir la cantidad de un ARNi que, cuando se administra a un sujeto que sufre de un trastorno de sangrado pero no presenta sangrado, por ejemplo, un sujeto que sufre de un trastorno de sangrado y está programado para una cirugía (por ejemplo, un tratamiento periquirúrgico), sea suficiente para prevenir o aliviar la enfermedad o uno o más síntomas de enfermedad. El alivio de la enfermedad incluye demorar el transcurso de la enfermedad o reducir la severidad de una enfermedad desarrollada posteriormente. La "cantidad profilácticamente eficaz" puede variar dependiendo del ARNi, de la manera en que se administra el agente, del grado de riesgo de enfermedad y los antecedentes, edad, peso, historia familiar, constitución genética, los tipos de tratamientos precedentes o concomitantes, si hubiera alguno, y otras características individuales del paciente a tratar.

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

La “cantidad terapéuticamente eficaz recomendada de un factor de reemplazo” y la “cantidad terapéuticamente eficaz recomendada de un agente de derivación” son las dosis del factor de reemplazo o del agente de derivación,

respectivamente, que sean suficientes para generar trombina y resolver un sangrado y/o suficientes para lograr un nivel pico en plasma del factor en un sujeto que tiene un sangrado provisto por la *World Federation of Hemophilia* (véase, por ejemplo, Srivastava, *et al.*, “Guidelines for the Management of Hemophilia”, *Hemofilia* publicación electrónica del 6 de julio, 2012; DOI: 10.1111/j.1365-2516.2012.02909.x; ADVATE, prospecto del producto (Factor Antihemofílico (Recombinante)); 11/2016; y BeneFIX, prospecto del producto (Factor IX de la Coagulación (Recombinante)); 11/2011. El contenido completo de cada uno de los mencionados se incorpora en la presente a modo de referencia.

Por ejemplo, la dosis recomendada del factor de reemplazo o del agente de derivación para un sujeto que tiene un sangrado menor es la dosis suficiente para lograr un nivel pico en plasma del Factor VIII de aproximadamente 10-40 UI/dl; la dosis recomendada del factor de reemplazo o del agente de derivación para un sujeto que tiene un sangrado moderado es la dosis suficiente para lograr un nivel pico en plasma del Factor VIII de aproximadamente 30-60 UI/dl; la dosis recomendada del factor de reemplazo o del agente de derivación para un sujeto que tiene un sangrado mayor es la dosis suficiente para lograr un nivel pico en plasma del Factor VIII de aproximadamente 60-100 UI/dl; la dosis recomendada del factor de reemplazo o del agente de derivación para un sujeto en situación perquirúrgica es la dosis suficiente para lograr un nivel pico en plasma del Factor VIII de aproximadamente 30-60 UI/dl (véase, por ejemplo, las Tablas 1 y 2 de ADVATE, prospecto del producto (Factor Antihemofílico (Recombinante)); 11/2016).

La dosis recomendada del factor de reemplazo o del agente de

derivación para un sujeto que tiene un sangrado menor es la dosis suficiente para lograr un nivel pico en plasma del Factor IX de aproximadamente 10-30 UI/dl; la dosis recomendada del factor de reemplazo o del agente de derivación para un sujeto que tiene un sangrado moderado es la dosis suficiente para lograr un nivel pico en plasma del Factor IX de aproximadamente 25-50 UI/dl; la dosis recomendada de factor de reemplazo o del agente de derivación para un sujeto que tiene un sangrado mayor es la dosis suficiente para lograr un nivel pico en plasma del Factor IX de aproximadamente 50-100 UI/dl.

En la presente, la frase “farmacéuticamente aceptable” se emplea para hacer referencia a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que, dentro del alcance del buen juicio médico, son apropiados para su uso en contacto con los sujetos humanos y los sujetos animales sin una toxicidad, una irritación o una respuesta alérgica excesiva, y sin otros problemas o complicaciones, de acuerdo con una relación beneficio/riesgo razonable.

La frase "vehículo farmacéuticamente aceptable", según se usa en la presente, significa un material, una composición o un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como un relleno líquido o sólido, un diluyente, un excipiente, un auxiliar de fabricación (por ejemplo, un lubricante, talco, estearato de magnesio, calcio o zinc, o ácido esteárico), o un material solvente encapsulante, relacionado con llevar o transportar el compuesto sujeto desde un órgano, o una porción del cuerpo, a otro órgano, o a otra porción del cuerpo. Cada vehículo debe ser “aceptable” en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación, y no debe ser perjudicial para el sujeto bajo tratamiento. 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 papa; (3) celulosa, y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa de sodio, etilcelulosa y acetato de celulosa; (4) tragacanto en polvo; (5) malta; (6) gelatina; (7) agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio, laurilsulfato de sodio y talco; (8) excipientes, tales como manteca de cacao y ceras para supositorios; (9) aceites, tales como aceite de maní, aceite de semillas de algodón, aceite de alazor, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; (10) glicoles, tal como propilenglicol; (11) polioles, tal como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; (12) ésteres, tal como oleato de etilo y laurato de etilo; (13) agar; (14) agentes amortiguadores, tal como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; (15) ácido algínico; (16) agua libre de pirógenos; (17) salina isotónica; (18) solución de Ringer; (19) alcohol etílico; (20) soluciones amortiguadoras del pH; (21) poliésteres, policarbonatos y/o polianhídridos; (22) agentes de relleno, 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 las formulaciones farmacéuticas. Según se usa en la presente, una “secuencia blanco” se refiere a una porción contigua de la secuencia de nucleótidos de una molécula de ARNm formada durante la transcripción de un gen *Serpinc1*, incluyendo un ARNm que es producto del procesamiento de ARN de un producto de transcripción primario. En una forma de realización, la porción blanco de la secuencia será por lo menos de una longitud suficiente como para servir como sustrato para un clivaje dirigido por ARNi en o cerca de dicha porción de la secuencia de nucleótidos de una molécula de ARNm formada durante la transcripción de un gen *Serpinc1*.

La secuencia blanco puede ser de aproximadamente 9-36 nucleótidos de longitud, por ejemplo, de aproximadamente 15-30 nucleótidos de longitud. Por ejemplo, la secuencia blanco 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 ó 21-22 nucleótidos de longitud. Los rangos y las longitudes intermedios de los rangos y las longitudes indicadas previamente también se contemplan como parte de esta invención.

Según se usa en la presente, el término “secuencia que comprende una cadena” se refiere a un oligonucleótido que comprende una cadena de nucleótidos descrita por la secuencia de referencia usando la nomenclatura estándar de nucleótidos.

“G”, “C”, “A”, “T” y “U” representan cada uno un nucleótido que comprende guanina, citosina, adenina, timidina y uracilo como base, respectivamente. Sin embargo, se comprenderá que el término “ribonucleótido” o “nucleótido” también puede hacer referencia a un nucleótido modificado, como se describirá con mayor detalle más adelante, o una porción de reemplazo sustituto (véase, por ejemplo, la Tabla 2). El especialista sabe que la guanina, citosina, adenina y uracilo se pueden reemplazar por otras porciones sin alterar sustancialmente las propiedades de apareamiento de bases de un oligonucleótido que comprende un nucleótido que contiene dicha porción de reemplazo. Por ejemplo, en un sentido no taxativo, un nucleótido que comprende inosina como base puede aparearse por sus bases con nucleótidos que contienen adenina, citosina o uracilo. Por ende, se pueden

reemplazar los nucleótidos que contienen uracilo, guanina o adenina en las secuencias de nucleótidos de ARNcd presentadas en la invención por un nucleótido que contiene, por ejemplo, inosina. En otro ejemplo, se puede reemplazar la adenina y la citosina en cualquier ubicación en el oligonucleótido por guanina y uracilo, respectivamente, para formar apareamientos de bases con bamboleo de G-U con el ARNm blanco. Las secuencias que contienen dichas porciones de reemplazo son adecuadas para las composiciones y los métodos presentados en la invención.

Los términos “ARNi”, “agente de ARNi”, “agente de ARNi”, “agente de interferencia de ARN”, usados indistintamente en la presente, se refieren a un agente que contiene, ARN tal como se define dicho término en la presente, y que interviene en el clivaje dirigido de un ARN transcripto por medio de una vía de un complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC). El ARNi dirige la degradación de ARNm específica de la secuencia por un proceso conocido como interferencia de ARN (ARNi). El ARNi modula, por ejemplo, inhibe, la expresión de *Serpinc1* en una célula, por ejemplo, una célula en un sujeto, tal como un sujeto mamífero.

En una forma de realización, un agente de ARNi de la invención incluye un ARN de cadena simple que interactúa con una secuencia de ARN blanco, por ejemplo, una *Serpinc1* secuencia de ARNm blanco, para dirigir el clivaje del ARN blanco. Sin considerar la teoría, se cree que los ARN de cadena doble largos introducidos en las células son degradados en ARNsi por una endonucleasa de Tipo III conocida como Dicer (Sharp *et al.*, (2001) *Genes Dev.*, 15:485). Dicer, una enzima tipo ribonucleasa III, procesa el ARNcd en ARN de interferencia cortos de 19-23 pares de bases con dos sobreextensiones de bases 3' (Bernstein, *et al.*, (2001) *Nature* 409: 363). Los ARNsi se incorporan luego en un complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) donde una o más helicasas desenrolla la dupla de ARNsi, permitiendo que la cadena

antisentido complementaria guíe el reconocimiento buscado (Nykanen, *et al.*, (2001) *Cell* 107: 309). Al unirse al unión ARNm blanco apropiado, una o más endonucleasas en el RISC clivan al blanco para así inducir silenciamiento (Elbashir, *et al.*, (2001) *Genes Dev.*, 15: 188). Por consiguiente, en un aspecto la invención se relaciona con un ARN de cadena simple (ARNsi) generado en la célula y que promueve la formación de un complejo RISC para efectuar el silenciamiento del gen blanco, es decir, un gen *Serpinc1*. Por lo tanto, el término “ARNsi” también se usa en la presente para hacer referencia a un ARNi descrito previamente.

En otra forma de realización, el agente de ARNi puede ser un ARNsi de cadena simple que se introduce en una célula u organismo para inhibir un ARNm blanco. Los ARNsi de cadena simple generalmente comprenden 15-30 nucleótidos y están modificados químicamente. El diseño y las pruebas con los ARNsi de cadena simple se describen en la Patente de los EE.UU. N°: 8.101.348 y en Lima *et al.*, (2012) *Cell* 150: 883-894, cuyos contenidos se incorporan por completo en la presente a modo de referencia. Se puede emplear cualquiera de las secuencias de nucleótidos antisentido descritas en la presente como un ARNsi de cadena simple como se describe en la presente o modificados químicamente mediante los métodos descritos en Lima *et al.*, (2012) *Cell* 150: 883-894.

Generalmente, la mayoría de los nucleótidos de cada hebra de una molécula de ARNcd son ribonucleótidos, pero como se describe con detalle en la presente, cada una o ambas hebras también pueden incluir uno o más no ribonucleótidos, por ejemplo, un desoxirribonucleótido y/o un nucleótido modificado. Adicionalmente, según se usa en esta descripción, un “agente de ARNi” puede incluir ribonucleótidos con modificaciones químicas; un agente de ARNi puede incluir modificaciones sustanciales en múltiples nucleótidos.

Según se usa en la presente, el término “nucleótido modificado” se refiere a un nucleótido que puede comprender, de manera independiente, una unidad de azúcares que ha sido modificada, un enlace entre nucleótidos que ha sido modificado y/o una nucleobase modificada. Por consiguiente, el término nucleótido modificado abarca sustituciones, adiciones o la eliminación, por ejemplo, de un grupo funcional o átomo, de enlaces entre nucleósidos, unidades de azúcares o nucleobases. Las modificaciones adecuadas para su uso en los agentes de la invención incluyen todos los tipos de modificaciones divulgados en la presente o conocidos en el arte. Cualquiera de dichas modificaciones, tal como se usan en una molécula tipo ARN_{pi}, están comprendidas por el “agente de ARN_i” a los efectos de esta descripción y las reivindicaciones.

La región de la dupla puede ser de cualquier longitud que permita una degradación específica de un ARN blanco deseado a través de una vía RISC, y puede variar en un rango de entre aproximadamente 9 y 36 pares de bases de longitud, por ejemplo, de aproximadamente 15-30 pares de bases de longitud, por ejemplo, de aproximadamente 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 y 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 ó 21-22 pares de bases de longitud. Los rangos y las longitudes intermedios de los rangos y las longitudes indicadas previamente también se contemplan como parte de esta invención.

Las dos cadenas que forman la estructura en dupla pueden ser porciones diferentes de una molécula de ARN más grande o pueden ser moléculas de ARN separadas. Cuando las dos cadenas forman parte de una molécula más grande, y por ende están conectadas por 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 en dupla, la cadena de ARN conectora se conoce como "bucle en horquilla". Un bucle en horquilla puede comprender al menos un nucleótido no apareado. En algunas formas de realización, el bucle en 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, al menos 23 o más nucleótidos no apareados.

Cuando las dos cadenas sustancialmente complementarias de un ARNcd están compuestas por moléculas de ARN separadas, dichas moléculas pueden estar, aunque no necesariamente, conectadas de manera covalente. Cuando las dos cadenas están conectadas de manera covalente pero por un medio distinto 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 en dupla, la estructura de conexión se conoce como un "conector". Las cadenas de ARN pueden contener la misma cantidad, o una cantidad diferente, de nucleótidos. La cantidad máxima de pares de bases es la cantidad de nucleótidos en la cadena más corta del ARNcd menos cualquier sobreextensión presente en la dupla. Además de la estructura en dupla, un ARNi puede comprender una o más sobreextensiones de nucleótidos.

En una forma de realización, un agente de ARNi de la invención comprende un ARNcd de de 24-30 nucleótidos, que interactúa con una secuencia de ARN blanco, por ejemplo, una secuencia de ARNm blanco de *Serpinc1*, para dirigir el clivaje del ARN blanco. Sin vinculación con la teoría, los

ARN de hebra doble largos introducidos en las células son degradados en ARNip por una endonucleasa de Tipo III conocida como Dicer (Sharp *et al.*, (2001) *Genes Dev.*, 15: 485). Dicer, una enzima tipo ribonucleasa III, procesa el ARNhd en ARNi cortos de 19-23 pares de bases con dos sobreextensiones de bases 3' (Bernstein, *et al.*, (2001) *Nature* 409: 363). Los ARNip se incorporan luego en un complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) donde una o más helicasas desenrolla la dúplex de ARNip, permitiendo que la hebra antisentido complementaria guíe el reconocimiento al blanco (Nykanen, *et al.*, (2001) *Cell* 107: 309). Al unirse al ARNm blanco apropiado, una o más endonucleasas en el RISC clivan al blanco para así inducir silenciamiento (Elbashir, *et al.*, (2001) *Genes Dev.*, 15: 188).

Según se usa en la presente, el término “sobreextensión de nucleótidos” se refiere a por lo menos un nucleótido no apareado que sobresale de la estructura en dupla de un ARNi, por ejemplo, un ARNcd. Por ejemplo, cuando un extremo 3' de una cadena de un ARNcd se extiende más allá del extremo 5' de la otra cadena, o viceversa, hay una sobreextensión de nucleótidos. Un ARNcd puede comprender una sobreextensión de al menos un nucleótido; como alternativa la sobreextensión puede comprender al menos dos nucleótidos, al menos tres nucleótidos, al menos cuatro nucleótidos, al menos cinco nucleótidos o más. Una sobreextensión de nucleótidos puede comprender o consistir de un análogo de nucleótido/nucleósido, incluyendo un desoxinucleótido/nucleósido. Las sobreextensiones pueden ser en la cadena orientada en el sentido del marco de lectura, en la cadena antisentido o en cualquier combinación de las mismas. Aún más, los nucleótidos de una sobreextensión se pueden encontrar en el extremo 5', en el extremo 3' o en ambos extremos de una cadena orientada en el sentido del marco de lectura antisentido o de un ARNcd.

En una forma de realización, la cadena antisentido de un ARNcd tiene una sobreextensión de 1-10 nucleótidos, por ejemplo, de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 nucleótidos, por el extremo 3' y/o por el extremo 5'. En una forma de realización, la cadena orientada en el sentido del marco de lectura de un ARNcd tiene una sobreextensión de 1-10 nucleótidos, por ejemplo, de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 nucleótidos, por el extremo 3' y/o por el extremo 5'. En otra forma de realización, se reemplaza uno o más de los nucleótidos en la sobreextensión por un nucleósido con tiofosfato.

En determinadas formas de realización, la sobreextensión en la hebra sentido o en la hebra antisentido o en ambas, pueden incluir longitudes extendidas más de 10 nucleótidos, por ejemplo, de 10-30 nucleótidos, de 10-25 nucleótidos, de 10-25 nucleótidos o de 10-15 nucleótidos de longitud. En determinadas formas de realización, la sobreextensión extendida se encuentra en la hebra sentido del dúplex. En determinadas formas de realización, hay una sobreextensión extendida por el extremo 3' de la hebra sentido del dúplex. En determinadas formas de realización, hay una sobreextensión extendida por el extremo 5' de la hebra sentido del dúplex. En determinadas formas de realización, la sobreextensión extendida se encuentra en la hebra antisentido del dúplex. En determinadas formas de realización, hay una sobreextensión extendida en el extremo 3' de la hebra antisentido del dúplex. En determinadas formas de realización, hay una sobreextensión extendida en el extremo 5' de la hebra antisentido del dúplex. En otra forma de realización, se reemplaza uno o más de los nucleótidos en la sobreextensión extendida por un nucleósido con tiofosfato.

Los términos “romo” o “extremo romo” hacen referencia a que no hay

nucleótidos desapareados en el extremo del agente de ARNi de hebra doble, es decir, no hay sobreextensión de nucleótidos. Un agente de ARNi “con extremos romos” es un ARNcd que es de hebra doble en toda su longitud, es decir, sin sobreextensión de nucleótidos en ninguno de los extremos de la molécula. Los agentes de ARNi de la invención incluyen agentes de ARNi con sobreextensiones de nucleótidos en un extremo (es decir, agentes con una sobreextensión y un extremo romo) o con sobreextensiones de nucleótidos en ambos extremos.

El término “cadena antisentido” o “cadena guía” se refiere a la cadena de un ARNi, por ejemplo, un ARNcd, que incluye una región que es sustancialmente complementaria a una secuencia blanco, por ejemplo, un ARNm de *Serpinc1*. Según se usa en la presente, el término “región de complementariedad” se refiere a la región sobre la cadena antisentido que es sustancialmente complementaria de una secuencia, por ejemplo una secuencia blanco, por ejemplo, una secuencia de nucleótidos de *Serpinc1*, definida en la presente. Cuando la región de complementariedad no es completamente complementaria de la secuencia blanco, las faltas de coincidencia pueden estar en las regiones internas o terminales de la molécula. En general, las faltas de coincidencia más toleradas están en las regiones terminales, por ejemplo, dentro de los 5, 4, 3 ó 2 nucleótidos del extremo terminal 5' y/o 3' del ARNi.

El término “cadena orientada en el sentido del marco de lectura”, o “cadena pasajero”, según se usa en la presente, se refiere a la cadena de un ARNi que incluye una región que es sustancialmente complementaria de una región de la cadena antisentido según la definición de dicho término en la presente.

Según se usa en la presente, el término “región de clivaje” se refiere a

una región localizada inmediatamente adyacente al sitio de clivaje. El sitio de clivaje es el sitio en el blanco en donde se produce el clivaje. En algunas formas de realización, la región de clivaje comprende tres bases en cualquier extremo e inmediatamente adyacente al sitio de clivaje. En algunas formas de realización, la región de clivaje comprende dos bases en cualquier extremo e inmediatamente adyacente al sitio de clivaje. En algunas formas de realización, el sitio de clivaje se encuentra específicamente en el sitio donde se unen los nucleótidos 10 y 11 de la hebra antisentido, y la región de clivaje comprende los nucleótidos 11, 12 y 13.

Según se usa en la presente, y a menos que se indique de otra manera, el término “complementaria”, cuando se usa para describir una primera secuencia de nucleótidos con relación a una segunda secuencia de nucleótidos, se refiere a la capacidad de un oligonucleótido o polinucleótido que comprende a la primera secuencia de nucleótidos de hibridarse y formar una estructura en dupla bajo determinadas condiciones con un oligonucleótido o polinucleótido que comprende a la segunda secuencia de nucleótidos, como comprenderá el especialista. Dichas condiciones pueden ser, por ejemplo, condiciones severas, donde estas condiciones severas pueden incluir : NaCl 400 mM, PIPES 40 mM pH 6,4, EDTA 1 mM, a 50°C o 70°C durante 12-16 horas seguido por lavado (véase, por ejemplo, “Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, Sambrook, *et al.*, (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press). Se pueden aplicar otras condiciones, tales como las condiciones fisiológicamente relevantes que se pueden encontrar dentro de un organismo. El especialista podrá determinar el conjunto de condiciones más apropiadas para la prueba de complementariedad de dos secuencias de acuerdo con la aplicación final de los nucleótidos hibridizados.

Las secuencias complementarias en un ARNi, por ejemplo, en un ARNcd descrito en la presente, incluyen apareamiento de bases del oligonucleótido o polinucleótido que comprende una primera secuencia de nucleótidos con un oligonucleótido o polinucleótido que comprende una segunda secuencia de nucleótidos sobre la longitud completa de una o ambas secuencias de nucleótidos. Dichas secuencias se pueden denominar “completamente complementarias” entre sí en la presente. Sin embargo, cuando se indica que la primera secuencia es “sustancialmente complementaria” con respecto a una segunda secuencia en la presente, las dos secuencias pueden ser completamente complementarias, o pueden formar una o más, pero generalmente no más de 5, 4, 3 ó 2 pares de bases no coincidentes con la hibridación para una dupla de hasta 30 pares de bases, reteniendo al mismo tiempo la capacidad para hibridizarse bajo las condiciones más relevantes para su aplicación final, por ejemplo, la inhibición de la expresión genética por medio de la vía RISC. Sin embargo, cuando se diseñan dos oligonucleótidos para formar, luego de la hibridación, una o más sobreextensiones de cadena simple, dichas sobreextensiones no serán consideradas como faltas de coincidencia con respecto a la determinación de complementariedad. Por ejemplo, un ARNcd que comprende un oligonucleótido de 21 nucleótidos de longitud y otro oligonucleótido de 23 nucleótidos de longitud, en donde el oligonucleótido más largo comprende una secuencia de 21 nucleótidos que es completamente complementaria del oligonucleótido más cortos, aún puede denominarse como “completamente complementario” para los fines que se describen en la presente.

Las secuencias “complementarias”, según se usan en la presente, también pueden incluir o pueden estar formadas completamente pares de bases que no son Watson-Crick y/o pares de bases formados a partir de nucleótidos no naturales y

modificados, en tanto se cumpla con los requisitos anteriores con respecto a su capacidad para hibridarse. Dichos pares de bases que no son Watson-Crick incluyen, pero en un sentido no taxativo, Bamboleo G:U o apareamiento de bases de Hoogstein.

Los términos “complementario”, “completamente complementario” y “sustancialmente complementario” se pueden usar en la presente con respecto a la coincidencia de bases entre la cadena orientada en el sentido del marco de lectura y la cadena antisentido de un ARNcd, o entre la cadena antisentido de un agente de ARNi y una secuencia blanco, como se comprenderá a partir del contexto de su uso.

Según se usa en la presente, un polinucleótido que es “sustancialmente complementario a por lo menos una parte de un ARN mensajero (ARNm) se refiere a un polinucleótido que es sustancialmente complementario de una porción contigua del ARNm de interés (por ejemplo, un ARNm que codifica *Serpinc1*). Por ejemplo, un polinucleótido es complementario de por lo menos una parte de un ARNm *Serpinc1* si la secuencia es sustancialmente complementaria de una porción no interrumpida de un ARNm que codifica *Serpinc1*.

Según se usa en la presente, un polinucleótido que es “sustancialmente complementario a por lo menos una parte de un ARN mensajero (ARNm) se refiere a un polinucleótido que es sustancialmente complementario de una porción contigua del ARNm de interés (por ejemplo, un ARNm que codifica *Serpinc1*). Por ejemplo, un polinucleótido es complementario de por lo menos una parte de un ARNm *Serpinc1* si la secuencia es sustancialmente complementaria de una porción no interrumpida de un ARNm que codifica *Serpinc1*.

Por lo tanto, en algunas formas de realización, las hebras de los

polinucleótidos antisentido que se divulgan en la presente son completamente complementarios de la secuencia de Serpinc1 blanco. En otras formas de realización, la hebra antisentido de los polinucleótidos que se divulgan en la presente son sustancialmente complementarias de la secuencia de Serpinc1 blanco y comprenden una secuencia de nucleótidos contigua que es por lo menos aproximadamente un 80% complementaria en toda su longitud a la región equivalente de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N°: 1, o un fragmento de la SEQ ID N°: 1, tal como aproximadamente un 85%, aproximadamente un 86%, aproximadamente un 87%, aproximadamente un 88%, aproximadamente un 89%, aproximadamente un 90%, aproximadamente un 91%, aproximadamente un 92%, aproximadamente un 93%, aproximadamente un 94%, aproximadamente un 95%, aproximadamente un 96%, aproximadamente un 97%, aproximadamente un 98% o aproximadamente un 99% complementaria.

En una forma de realización, un agente de ARNi de la invención incluye una hebra orientada en el sentido del marco de lectura que es sustancialmente complementaria de un polinucleótido antisentido que, a su vez, es complementaria de una secuencia Serpinc1 blanco, y en donde la hebra orientada en el sentido del marco de lectura del polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos contigua que es por lo menos aproximadamente un 80% complementaria sobre toda su longitud a la región equivalente de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N°: 5, o un fragmento de cualquier parte de la SEQ ID N°: 5, tal como aproximadamente un 85%, aproximadamente un 86%, aproximadamente un 87%, aproximadamente un 88%, aproximadamente un 89%, aproximadamente un 90%, aproximadamente un 91%,

aproximadamente un 92%, aproximadamente un 93%, aproximadamente un 94%, aproximadamente un 95%, aproximadamente un 96%, aproximadamente un 97%, aproximadamente un 98% o aproximadamente un 99% complementaria.

En un aspecto de la invención, un agente para usar en los métodos y las composiciones de la invención es una molécula de ARN antisentido de hebra simple que inhibe un ARNm blanco mediante un mecanismo de inhibición antisentido. La molécula de ARN antisentido de hebra simple es complementaria de una secuencia en el ARNm blanco. Los oligonucleótidos antisentido de hebra simple pueden inhibir la traducción de una manera estequiométrica por apareamiento de bases con el ARNm y obstruir físicamente la maquinaria de traducción, véase Dias, N. *et al.*, (2002) *Mol Cancer Ther* 1: 347-355. La molécula de ARN antisentido de hebra simple puede ser de entre aproximadamente 15 y aproximadamente 30 nucleótidos de longitud y tener una secuencia que es complementaria de una secuencia blanco. Por ejemplo, la molécula de ARN antisentido de hebra simple puede comprender una secuencia que comprende por lo menos aproximadamente 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más nucleótidos contiguos de cualquiera de las secuencias antisentido descritas en la presente.

El término “inhibición”, según se usa en la presente, se usa indistintamente con “reducción”, “silenciamiento”, “subregulación”, “supresión” y otros términos similares, e incluye cualquier nivel de inhibición.

La frase “inhibición de la expresión de un *Serpinc1*”, según se usa en la presente, incluye la inhibición de la expresión de cualquier gen *Serpinc1* (tal como, por ejemplo, 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.

La “inhibición de la expresión de un gen Serpinc1” incluye cualquier nivel de la inhibición de un gen Serpinc1, por ejemplo, al menos una supresión parcial de la expresión de un gen Serpinc1, tal como una inhibición de al menos aproximadamente 5%, al menos aproximadamente 10%, 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 sobre la base del nivel de cualquier variable asociada con la expresión del gen Serpinc1, por ejemplo, el nivel del ARNm de Serpinc1, el nivel de la proteína Serpinc1 o, por ejemplo, los niveles del complejo de trombina:antitrombina como una medida de la generación potencial 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 por una disminución en el nivel absoluto o relativo de una o más de estas variables en comparación con un nivel control. El nivel control puede ser cualquier tipo de nivel control que se utilice en el arte, por ejemplo, un nivel basal de predosis, o un nivel

determinado de un sujeto, célula o muestra similar no tratado o tratado con un control (tal como, por ejemplo, un control de solución amortiguadora solamente o un control con un agente inactivo).

En una forma de realización, una supresión al menos parcial de la expresión de un gen *Serpinc1*, se evalúa por la reducción de la cantidad de ARNm de *Serpinc1* que se puede aislar o detectar en una primera célula o grupo de células en la cual se transcribe un gen *Serpinc1* y que fue tratado de manera tal que se inhibe la expresión de un gen *Serpinc1*, en comparación con una segunda célula o grupo de células sustancialmente idéntico a la primera célula o grupo de células pero que no ha sido tratado de esa manera (células control). El grado de la inhibición se puede expresar en términos de

(ARNm en células control) – (ARNm en células tratadas)

----- • 100%

(ARNm en células control)

La frase “poner una célula en contacto con un agente de ARNi”, tal como un ARNcd, según se usa en la presente, incluye el contacto de la célula mediante cualquier medio posible. Poner una célula en contacto con un agente de ARNi incluye poner la célula *in vitro* en contacto con el ARNi o poner la célula *in vivo* en contacto con el ARNi. El contacto puede ser directo o indirecto. Así, por ejemplo, la persona que ejecuta el método puede poner el agente de ARNi en contacto físico con la célula o, como alternativa, el agente de ARNi puede situarse en una posición que permitirá o hará que subsiguientemente tomará contacto con la célula.

El contacto con una célula *in vitro* puede efectuarse, por ejemplo, por incubación de la célula con el agente de ARNi. El contacto con una célula *in vivo* puede efectuarse, por ejemplo, por inyección del agente de ARNi en o cerca del tejido

donde se encuentra la célula o por inyección del agente de ARNi en otro área, por ejemplo, el torrente sanguíneo o el espacio subcutáneo, de manera tal que el agente llegará posteriormente al tejido donde se encuentra la célula para el contacto. Por ejemplo, el agente de ARNi puede contener y/o puede estar acoplado a un ligando, por ejemplo, GalNAc3, que dirigirá al agente de ARNi al sitio de interés, por ejemplo, el hígado. También es posible combinar los métodos de contacto *in vitro* e *in vivo*. Por ejemplo, la célula también se puede poner contacto *in vitro* con un agente de ARNi y posteriormente ser transplantada en un sujeto.

En una forma de realización, poner una célula en contacto con un ARNi incluye “introducir” o “distribuir el ARNi en la célula” facilitando o efectuando la captación o absorción en la célula. La absorción o captación de un ARNi puede tener lugar mediante procesos de difusión o celulares activos, o mediante agentes o dispositivos auxiliares. La introducción de un ARNi en una célula puede efectuarse *in vitro* y/o *in vivo*. Por ejemplo, para la introducción *in vivo*, el ARNi se puede inyectar en un sitio del tejido o puede administrarse por vía sistémica. La administración *in vivo* también puede efectuarse mediante un sistema de administración de beta-glucano, tal como se describe en las Patentes de los EE.UU. N°: 5.032.401 y 5.607.677, y en la publicación de Patente de los EE.UU. N°: 2005/0281781, cuyos contenidos completos se incorporan en la presente a modo de referencia. La introducción *in vitro* en una célula incluye los métodos conocidos en el arte, tales como electroporación y lipofección. Otros enfoques se describen más adelante en la presente y/o son conocidos en el arte.

II. Métodos de la invención

La presente invención provee métodos terapéuticos para tratar un evento de sangrado en un sujeto que padece hemofilia (por ejemplo, hemofilia

A, hemofilia B o hemofilia C) que incluyen administrar al sujeto un agente de ARNi o una composición farmacéutica que comprende un agente de ARNi de la invención, por ejemplo, en una cantidad que disminuye la actividad de Serpinc1 en el sujeto en aproximadamente un 75% o más, y un factor de reemplazo o un agente de derivación en una cantidad terapéuticamente eficaz que está reducida en comparación con la cantidad terapéuticamente eficaz recomendada para el factor de reemplazo o el agente de derivación, por ejemplo, recomendada por la *World Federation of Hemophilia* (véase, por ejemplo, Srivastava, *et al.*, “Guidelines for the Management of Hemophilia”, *Hemofilia* publicación electrónica del 6 de julio, 2012; DOI: 10.1111/j.1365-2516.2012.02909.x) y/o la Administración de Drogas y Alimentos ((véase, por ejemplo, ADVATE, prospecto del producto (Factor Antihemofílico (Recombinante)); 11/2016; BeneFIX, prospecto del producto (Factor de Coagulación IX (Recombinante); 11/2011) (por ejemplo, una cantidad suficiente para generar trombina y resolver un sangrado (formar un coágulo). El contenido completo de cada uno de los mencionados se incorpora en la presente a modo de referencia.

Según se describe más adelante en los ejemplos, se ha descubierto sorprendentemente que, en los sujetos que padecen una hemofilia, por ejemplo, hemofilia A, hemofilia B o hemofilia C, con o sin inhibidores, la administración de un agente de ARNi que inhibe la expresión de Serpinc1 en una cantidad que disminuye la actividad de Serpinc1 en el sujeto en aproximadamente un 75% o más reduce la mediana del índice de sangrado anual y el índice de sangrado anual espontáneo y dichos sangrados se pueden manejar (se genera trombina y se resuelve el sangrado) con un factor de

reemplazo o un agente de derivación en una cantidad terapéuticamente eficaz que está reducida en comparación con la cantidad terapéuticamente eficaz recomendada del factor de reemplazo o del agente de derivación.

Los factores de reemplazo adecuados para usar en los métodos de la invención incluyen el Factor VIII, por ejemplo, Advato, Eloctato, Haemato, Helixato, Immunato, Octanato, Recombinato y Refacto, o el Factor IX, por ejemplo, Aimafix, Benefix, Immuniney Refacto. Los agentes de derivación adecuados para usar en los métodos de la invención incluyen concentrados del complejo de protrombina activado (aPCC), por ejemplo, FEIBA y Prothromplex, y el Factor VIIa recombinante (rFVIIa), por ejemplo, NovoSeven.

El factor de reemplazo puede ser el Factor VIII y la cantidad terapéuticamente eficaz del factor de reemplazo administrado al sujeto en los métodos de la invención es una dosis suficiente como para lograr un nivel pico en plasma del Factor VIII de aproximadamente 10-100 UI/dl, por ejemplo, aproximadamente 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o aproximadamente 100 UI/dl.

Por ejemplo, la cantidad terapéuticamente eficaz del factor de reemplazo, el factor VIII, administrada al sujeto puede ser menor que aproximadamente 200 UI/kg o menor que aproximadamente 190 UI/kg o menor que aproximadamente 180 UI/kg o menor que aproximadamente 170 UI/kg o menor que aproximadamente 160 UI/kg o menor que aproximadamente 150 UI/kg o menor que aproximadamente 140 UI/kg o menor que aproximadamente 130 UI/kg o menor que aproximadamente 120 UI/kg o menor que aproximadamente 110 UI/kg o menor que aproximadamente 100 UI/kg o menor que aproximadamente 90 UI/kg o menor que aproximadamente 80 UI/kg o

menor que aproximadamente 70 UI/kg o menor que aproximadamente 60 UI/kg o menor que aproximadamente 50 UI/kg o menor que aproximadamente 40 UI/kg o menor que aproximadamente 30 UI/kg o menor que aproximadamente 20 UI/kg o menor que aproximadamente 10 UI/kg. En una forma de realización, la cantidad terapéuticamente eficaz del Factor VIII administrada al sujeto es de entre aproximadamente una a una y media veces y aproximadamente cinco veces menos que la cantidad eficaz recomendada del factor de reemplazo, por ejemplo, una dosis de entre aproximadamente 5 y aproximadamente 20 UI/kg o entre aproximadamente 10 y aproximadamente 20 UI/kg, por ejemplo, 5, 10, 15 ó 20 UI/kg. En una forma de realización, el evento de sangrado es un evento de sangrado moderado. En otra forma de realización, el evento de sangrado es un evento de sangrado mayor.

El factor de reemplazo puede ser el Factor IX y la cantidad terapéuticamente eficaz del factor de reemplazo administrado al sujeto en los métodos de la invención es una dosis suficiente como para lograr un nivel pico en plasma del Factor IX de aproximadamente 10-100 UI/dl, por ejemplo, aproximadamente 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o aproximadamente 100 UI/dl.

Por ejemplo, la cantidad terapéuticamente eficaz del factor de reemplazo, el factor XI, puede ser menor que aproximadamente 200 UI/kg o menor que aproximadamente 190 UI/kg o menor que aproximadamente 180 UI/kg o menor que aproximadamente 170 UI/kg o menor que aproximadamente 160 UI/kg o menor que aproximadamente 150 UI/kg o menor que aproximadamente 140 UI/kg o menor que aproximadamente 130 UI/kg o menor que aproximadamente 120 UI/kg o menor que aproximadamente 110 UI/kg o

menor que aproximadamente 100 UI/kg o menor que aproximadamente 90 UI/kg o menor que aproximadamente 80 UI/kg o menor que aproximadamente 70 UI/kg o menor que aproximadamente 60 UI/kg o menor que aproximadamente 50 UI/kg o menor que aproximadamente 40 UI/kg o menor que aproximadamente 30 UI/kg o menor que aproximadamente 20 UI/kg o menor que aproximadamente 10 UI/kg. En una forma de realización, la cantidad terapéuticamente eficaz del Factor IX administrada al sujeto es de entre aproximadamente dos veces y aproximadamente seis veces menos que la cantidad eficaz recomendada del factor de reemplazo, por ejemplo, una dosis de entre aproximadamente 10 UI/kg y aproximadamente 30 UI/kg o entre aproximadamente 20 y aproximadamente 30 UI/kg, por ejemplo, aproximadamente 10, 15, 20, 25 ó 30 UI/kg. En una forma de realización, el evento de sangrado es un evento de sangrado moderado. En otra forma de realización, el evento de sangrado es un evento de sangrado mayor.

El agente de derivación puede ser aPCC y la cantidad terapéuticamente eficaz del agente de derivación administrada al sujeto en los métodos de la invención es una dosis suficiente para generar trombina y resolver un sangrado.

Por ejemplo, la cantidad terapéuticamente eficaz del agente de derivación aPCC puede ser menor que aproximadamente 100 U/kg o menor que aproximadamente 90 U/kg o menor que aproximadamente 80 U/kg o menor que aproximadamente 70 U/kg o menor que aproximadamente 60 U/kg o menor que aproximadamente 50 U/kg o menor que aproximadamente 40 U/kg o menor que aproximadamente 30 U/kg o menor que aproximadamente 20 U/kg o menor que aproximadamente 10 U/kg. En una forma de realización,

la cantidad terapéuticamente eficaz de aPCC administrada al sujeto es entre aproximadamente dos veces y aproximadamente tres veces menor que la cantidad eficaz recomendada del factor de reemplazo, por ejemplo, una dosis de entre aproximadamente 30 y aproximadamente 50 U/kg, tal como, aproximadamente 30, 35, 40, 45 ó 50 U/kg. En una forma de realización, el evento de sangrado es un evento de sangrado moderado. En otra forma de realización, el evento de sangrado es un evento de sangrado mayor.

El agente de derivación puede ser rFVIIa y la cantidad terapéuticamente eficaz del agente de derivación administrada al sujeto en los métodos de la invención es una dosis suficiente para generar trombina y resolver un sangrado.

Por ejemplo, la cantidad terapéuticamente eficaz del agente de derivación rFVIIa es menor que aproximadamente 120 µg/kg o menor que aproximadamente 110 µg/kg o menor que aproximadamente 100 µg/kg o menor que aproximadamente 90 µg/kg o menor que aproximadamente 80 µg/kg o menor que aproximadamente 70 µg/kg o menor que aproximadamente 60 µg/kg o menor que aproximadamente 50 µg/kg o menor que aproximadamente 40 µg/kg o menor que aproximadamente 30 µg/kg o menor que aproximadamente 20 µg/kg. En una forma de realización, la cantidad terapéuticamente eficaz de rFVIIa administrada al sujeto es aproximadamente dos veces menor que la cantidad eficaz recomendada del factor de reemplazo, por ejemplo, una dosis de aproximadamente 45 µg/kg. En una forma de realización, el evento de sangrado es un evento de sangrado moderado. En otra forma de realización, el evento de sangrado es un evento de sangrado mayor.

En algunas formas de realización, el agente de ARNi se administra a una dosis fija de entre aproximadamente 25 mg y aproximadamente 100 mg, por ejemplo, entre aproximadamente 25 mg y aproximadamente 95 mg, entre aproximadamente 25 mg y aproximadamente 90 mg, entre aproximadamente 25 mg y aproximadamente 85 mg, entre aproximadamente 25 mg y aproximadamente 80 mg, entre aproximadamente 25 mg y aproximadamente 75 mg, entre aproximadamente 25 mg y aproximadamente 70 mg, entre aproximadamente 25 mg y aproximadamente 65 mg, entre aproximadamente 25 mg y aproximadamente 60 mg, entre aproximadamente 25 mg y aproximadamente 50 mg, entre aproximadamente 50 mg y aproximadamente 100 mg, entre aproximadamente 50 mg y aproximadamente 95 mg, entre aproximadamente 50 mg y aproximadamente 90 mg, entre aproximadamente 50 mg y 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 y aproximadamente 90 mg, entre aproximadamente 40 mg y aproximadamente 80 mg, entre aproximadamente 60 mg y aproximadamente 100 mg, entre aproximadamente 60 mg y aproximadamente 90 mg,, entre aproximadamente 25 mg y aproximadamente 55 mg, entre aproximadamente 25 mg y aproximadamente 65 mg, entre aproximadamente 30 mg y aproximadamente 95 mg, entre aproximadamente 30 mg y aproximadamente 85 mg, entre aproximadamente 30 mg y aproximadamente 75 mg, entre aproximadamente 30 mg y aproximadamente 65 mg, entre aproximadamente 30 mg y

aproximadamente 55 mg, entre aproximadamente 40 mg y aproximadamente 95 mg, entre aproximadamente 40 mg y aproximadamente 85 mg, entre aproximadamente 40 mg y aproximadamente 75 mg, entre aproximadamente 40 mg y aproximadamente 65 mg, entre aproximadamente 40 mg y aproximadamente 55 mg o entre aproximadamente 45 mg y aproximadamente 95 mg.

En algunas formas de realización, el agente de ARNi se administra a una dosis fija de 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 una forma de realización, el agente de ARNi se administra al sujeto a una dosis que disminuye la actividad de Serpinc1 en aproximadamente un 75% o más

Por lo tanto, en un aspecto la presente invención provee un método de tratamiento de un evento de sangrado en un sujeto que tiene una hemofilia sin inhibidores. El método incluyen administrar al sujeto una dosis fija de entre aproximadamente 30 mg y aproximadamente 90 mg de un agente de ácido ribonucleico de hebra doble (ARNi) que inhibe la expresión de un Serpinc1 (por ejemplo, una cantidad que disminuye la actividad de Serpinc1 en el sujeto en aproximadamente un 75% o más), en donde el agente de ARNi de hebra doble comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, donde la hebra antisentido comprende una región de complementariedad con un ARNm que

codifica Serpinc1 que comprende por lo menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de 5' - UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG - 3' (SEQ ID N°: 15), en donde sustancialmente todos los nucleótidos de la hebra sentido y sustancialmente todos los nucleótidos de la hebra antisentido son nucleótidos modificados, y en donde la hebra sentido está conjugada con un ligando unido al extremo 3'-terminal; y administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un factor de reemplazo, en donde la cantidad eficaz del factor de reemplazo está reducida en comparación con la cantidad eficaz recomendada del factor de reemplazo (por ejemplo, una cantidad suficiente para lograr un nivel pico en plasma del Factor VIII de aproximadamente 10-100 UI/dl (por ejemplo, una dosis de menos de aproximadamente 200 UI/kg del Factor VIII, por ejemplo, una dosis de entre aproximadamente 5 y aproximadamente 20 UI/kg del Factor VIII); o una cantidad suficiente para lograr un nivel pico en plasma del Factor IX de aproximadamente 10-100 UI/dl (por ejemplo, una dosis de menos de aproximadamente 200 UI/kg del Factor IX, por ejemplo, una dosis de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 30 UI/kg del Factor IX)), tratando de esa manera un evento de sangrado en el sujeto que tiene una hemofilia sin inhibidores.

En otro aspecto la presente invención provee un método de tratamiento de un evento de sangrado en un sujeto que sufre de hemofilia con inhibidores. Los métodos incluyen administrar al sujeto una dosis fija de entre aproximadamente 30 mg y aproximadamente 90 mg de un agente de ácido ribonucleico de hebra doble (ARNi) que inhibe la expresión de Serpinc1 (por ejemplo, una cantidad que disminuye la actividad de Serpinc1 en el sujeto en

aproximadamente un 75% o más), en donde el agente de ARNi de hebra doble comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, donde la hebra antisentido comprende una región de complementariedad con un ARNm que codifica *Serpinc1* que comprende por lo menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de 5' - UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG - 3' (SEQ ID N°: 15), en donde sustancialmente todos los nucleótidos de la hebra sentido y sustancialmente todos los nucleótidos de la hebra antisentido son nucleótidos modificados, y en donde la hebra sentido está conjugada con un ligando unido al extremo 3'-terminal; y administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente de derivación, en donde la cantidad eficaz del agente de derivación está reducida en comparación con la cantidad eficaz recomendada del agente de derivación (por ejemplo, una cantidad suficiente para generar trombina y resolver un sangrado, por ejemplo, una dosis de menos de aproximadamente 100 U/kg de aPCC (por ejemplo, una dosis de aproximadamente entre 30 y 50 U/kg de aPCC); una dosis de menos de aproximadamente 120 µg/kg de rFVIIa (por ejemplo, una dosis de aproximadamente 45 µg/kg de rFVIIa)), tratando de esa manera un evento de sangrado en el sujeto que tiene una hemofilia con inhibidores.

En otro aspecto la presente invención provee un método de tratamiento de un evento de sangrado en un sujeto que sufre de hemofilia sin inhibidores. El método incluyen administrar al sujeto una dosis fija de entre aproximadamente 40 mg y aproximadamente 90 mg de un agente de ácido ribonucleico de hebra doble (ARNi) que inhibe la expresión de un *Serpinc1* (por ejemplo, una cantidad que disminuye la actividad de *Serpinc1* en el sujeto en

aproximadamente un 75% o más), en donde el agente de ARNi de hebra doble comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, donde la hebra antisentido comprende una región de complementariedad con un ARNm que codifica *Serpinc1* que comprende por lo menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de 5' - UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG - 3' (SEQ ID N°: 15), en donde sustancialmente todos los nucleótidos de la hebra sentido y sustancialmente todos los nucleótidos de la hebra antisentido son nucleótidos modificados, y en donde la hebra sentido está conjugada con un ligando unido al extremo 3'-terminal; y administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un factor de reemplazo, en donde la cantidad eficaz del factor de reemplazo está reducida en comparación con la cantidad eficaz recomendada del factor de reemplazo (por ejemplo, una cantidad suficiente para lograr un nivel pico en plasma del Factor VIII de aproximadamente 10-100 UI/dl (por ejemplo, una dosis de menos de aproximadamente 200 UI/kg del Factor VIII, por ejemplo, una dosis de entre aproximadamente 5 y aproximadamente 20 UI/kg del Factor VIII); o una cantidad suficiente para lograr un nivel pico en plasma del Factor IX de aproximadamente 10-100 UI/dl (por ejemplo, una dosis de menos de aproximadamente 200 UI/kg del Factor IX, por ejemplo, una dosis de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 30 UI/kg del Factor IX)), tratando de esa manera un evento de sangrado en el sujeto que tiene una hemofilia sin inhibidores.

En otro aspecto la presente invención provee un método de tratamiento de un evento de sangrado en un sujeto que sufre de hemofilia con inhibidores. Los métodos incluyen administrar al sujeto una dosis fija de entre

aproximadamente 40 mg y aproximadamente 90 mg de un agente de ácido ribonucleico de hebra doble (ARNi) que inhibe la expresión de Serpinc1 (por ejemplo, una cantidad que disminuye la actividad de Serpinc1 en el sujeto en aproximadamente un 75% o más), en donde el agente de ARNi de hebra doble comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, donde la hebra antisentido comprende una región de complementariedad con un ARNm que codifica Serpinc1 que comprende por lo menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de 5' - UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG - 3' (SEQ ID N°: 15), en donde sustancialmente todos los nucleótidos de la hebra sentido y sustancialmente todos los nucleótidos de la hebra antisentido son nucleótidos modificados, y en donde la hebra sentido está conjugada con un ligando unido al extremo 3'-terminal; y administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente de derivación, en donde la cantidad eficaz del agente de derivación está reducida en comparación con la cantidad eficaz recomendada del agente de derivación (por ejemplo, una cantidad suficiente para generar trombina y resolver un sangrado, por ejemplo, una dosis de menos de aproximadamente 100 U/kg de aPCC (por ejemplo, una dosis de aproximadamente entre 30 y 50 U/kg de aPCC); una dosis de menos de aproximadamente 120 µg/kg de rFVIIa (por ejemplo, una dosis de aproximadamente 45 µg/kg de rFVIIa)), tratando de esa manera un evento de sangrado en el sujeto que tiene una hemofilia con inhibidores.

En un aspecto, la presente invención provee un agente de ácido ribonucleico de hebra doble (ARNi) que inhibe la expresión de un Serpinc1 adecuado para su administración a un sujeto a una dosis fija de

aproximadamente entre 30 mg y 90 mg (por ejemplo, una cantidad que disminuye la actividad de Serpinc1 en el sujeto en aproximadamente un 75% o más); y un factor de reemplazo adecuado para su administración a un sujeto a una dosis que está reducida en comparación con la cantidad eficaz recomendada del factor de reemplazo (por ejemplo, una cantidad suficiente para lograr un nivel pico en plasma del Factor VIII de aproximadamente 10-100 UI/dl (por ejemplo, una dosis de menos de aproximadamente 200 UI/kg del Factor VIII, por ejemplo, una dosis de entre aproximadamente 5 y aproximadamente 20 UI/kg de Factor VIII); o una cantidad suficiente para lograr un nivel pico en plasma del Factor IX de aproximadamente 10-100 UI/dl (por ejemplo, una dosis de menos de aproximadamente 200 UI/kg del Factor IX, por ejemplo, una dosis de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 30 UI/kg de Factor IX)) para usar en un método de tratamiento de un evento de sangrado en un sujeto que tiene una hemofilia, por ejemplo, hemofilia A, hemofilia B o hemofilia C, sin inhibidores. El agente de ARNi comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, donde la hebra antisentido comprende una región de complementariedad con un ARNm que codifica Serpinc1 que comprende por lo menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de 5' - UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG - 3' (SEQ ID N°: 15), en donde sustancialmente todos los nucleótidos de la hebra sentido y sustancialmente todos los nucleótidos de la hebra antisentido son nucleótidos modificados, y en donde la hebra sentido está conjugada con un ligando unido al extremo 3'-terminal.

En otro aspecto la presente invención provee un agente de ácido

ribonucleico de hebra doble (ARNi) que inhibe la expresión de un Serpinc1 adecuado para su administración a un sujeto a una dosis fija de aproximadamente entre 30 mg y 90 mg (por ejemplo, una cantidad que disminuye la actividad de Serpinc1 en el sujeto en aproximadamente un 75% o más); y un agente de derivación adecuado para su administración a un sujeto a una dosis que está reducida en comparación con la cantidad eficaz recomendada del agente de derivación (por ejemplo, una cantidad suficiente para generar trombina y resolver un sangrado, por ejemplo, una dosis de menos de aproximadamente 100 U/kg de aPCC (por ejemplo, una dosis de aproximadamente entre 30 y 50 U/kg de aPCC); una dosis de menos de aproximadamente 120 µg/kg de rFVIIa (por ejemplo, una dosis de aproximadamente 45 µg/kg de rFVIIa)) para usar en un método de tratamiento de un evento de sangrado en un sujeto que tiene una hemofilia, por ejemplo, hemofilia A, hemofilia B o hemofilia C, con inhibidores. El agente de ARNi comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, donde la hebra antisentido comprende una región de complementariedad con un ARNm que codifica Serpinc1 que comprende por lo menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de 5' - UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG - 3' (SEQ ID N°: 15), en donde sustancialmente todos los nucleótidos de la hebra sentido y sustancialmente todos los nucleótidos de la hebra antisentido son nucleótidos modificados, y en donde la hebra sentido está conjugada con un ligando unido al extremo 3'-terminal.

En un aspecto, la presente invención provee un agente de ácido ribonucleico de hebra doble (ARNi) que inhibe la expresión de un Serpinc1

adecuado para su administración a un sujeto a una dosis fija de aproximadamente entre 40 mg y 90 mg (por ejemplo, una cantidad que disminuye la actividad de Serpinc1 en el sujeto en aproximadamente un 75% o más); y un factor de reemplazo adecuado para su administración a un sujeto a una dosis que está reducida en comparación con la cantidad eficaz recomendada del factor de reemplazo (por ejemplo, una cantidad suficiente para lograr un nivel pico en plasma del Factor VIII de aproximadamente 10-100 UI/dl (por ejemplo, una dosis de menos de aproximadamente 200 UI/kg del Factor VIII, por ejemplo, una dosis de entre aproximadamente 5 y aproximadamente 20 UI/kg de Factor VIII); o una cantidad suficiente para lograr un nivel pico en plasma del Factor IX de aproximadamente 10-100 UI/dl (por ejemplo, una dosis de menos de aproximadamente 200 UI/kg del Factor IX, por ejemplo, una dosis de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 30 UI/kg de Factor IX)) para usar en un método de tratamiento de un evento de sangrado en un sujeto que tiene una hemofilia, por ejemplo, hemofilia A, hemofilia B o hemofilia C, sin inhibidores. El agente de ARNi comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, donde la hebra antisentido comprende una región de complementariedad con un ARNm que codifica Serpinc1 que comprende por lo menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de 5' - UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG - 3' (SEQ ID N°: 15), en donde sustancialmente todos los nucleótidos de la hebra sentido y sustancialmente todos los nucleótidos de la hebra antisentido son nucleótidos modificados, y en donde la hebra sentido está conjugada con un ligando unido al extremo 3'-terminal.

En otro aspecto la presente invención provee un agente de ácido ribonucleico de hebra doble (ARNi) que inhibe la expresión de un *Serpinc1* adecuado para su administración a un sujeto a una dosis fija de aproximadamente entre 40 mg y 90 mg (por ejemplo, una cantidad que disminuye la actividad de *Serpinc1* en el sujeto en aproximadamente un 75% o más); y un agente de derivación adecuado para su administración a un sujeto a una dosis que está reducida en comparación con la cantidad eficaz recomendada del agente de derivación (por ejemplo, una cantidad suficiente para generar trombina y resolver un sangrado, por ejemplo, una dosis de menos de aproximadamente 100 U/kg de aPCC (por ejemplo, una dosis de aproximadamente entre 30 y 50 U/kg de aPCC); una dosis de menos de aproximadamente 120 µg/kg de rFVIIa (por ejemplo, una dosis de aproximadamente 45 µg/kg de rFVIIa)) para usar en un método de tratamiento de un evento de sangrado en un sujeto que tiene una hemofilia, por ejemplo, hemofilia A, hemofilia B o hemofilia C, con inhibidores. El agente de ARNi comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, donde la hebra antisentido comprende una región de complementariedad con un ARNm que codifica *Serpinc1* que comprende por lo menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de 5' - UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG - 3' (SEQ ID N°: 15), en donde sustancialmente todos los nucleótidos de la hebra sentido y sustancialmente todos los nucleótidos de la hebra antisentido son nucleótidos modificados, y en donde la hebra sentido está conjugada con un ligando unido al extremo 3'-terminal.

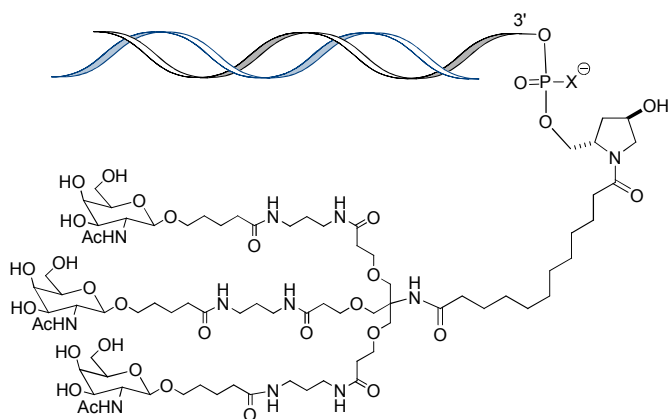
En los métodos y usos precedentes, en una forma de realización, la

región de complementariedad consiste en la secuencia de nucleótidos de 5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3' (SEQ ID N°: 15).

En una forma de realización, el agente de ARNi de hebra doble comprende una hebra sentido que comprende la secuencia de nucleótidos de 5'-GGUUAACACCAUUUACUUCAA -3' (SEQ ID N°: 16), y una hebra antisentido que comprende la secuencia de nucleótidos de 5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3' (SEQ ID N°: 15).

En una forma de realización, la hebra orientada en el sentido del marco de lectura comprende 5'-GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf -3' (SEQ ID N°: 13) y la hebra antisentido comprende 5'-usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg -3' (SEQ ID N°: 14), en donde a, c, g y u son A, C, G o U 2'-O-metilo (2'-OMe); Af, Cf, Gf o Uf son A, C, G, o U 2'-fluoro; y s es un enlace fosforotioato.

En una forma de realización, la hebra orientada en el sentido del marco de lectura comprende 5'-GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf -3' (SEQ ID N°: 13) y la hebra antisentido comprende 5'-usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg -3' (SEQ ID N°: 14), en donde a, c, g y u son A, C, G o U 2'-O-metilo (2'-OMe); Af, Cf, Gf o Uf son A, C, G, o U 2'-fluoro; y s es un enlace fosforotioato; y en donde la hebra sentido está conjugada con el ligando como se muestra en el siguiente esquema



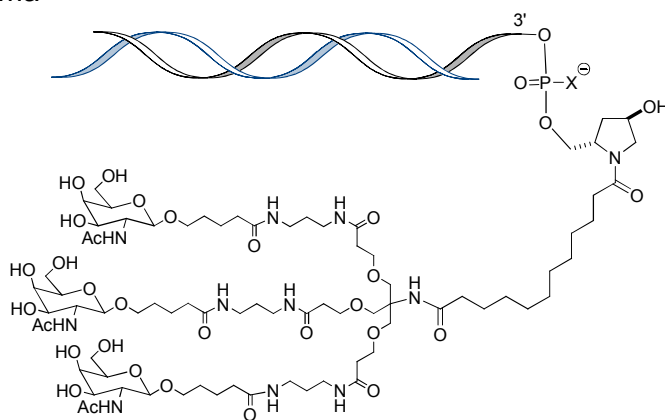
en donde X es O o S.

En una forma de realización, el agente se administra como una composición farmacéutica. En una forma de realización, el agente de ARNi se administra en una solución no amortiguada, tal como salina o agua.

En otra forma de realización, el agente de ARNi se administra con una solución amortiguadora, tal como una solución amortiguadora que comprende acetato, citrato, prolamina, carbonato o fosfato o cualquier combinación de los mismos. En una forma de realización, la solución amortiguadora es una solución amortiguadora salina fosfato (PBS).

En un aspecto, la presente invención provee un agente de ácido ribonucleico de hebra doble (ARNi) que inhibe la expresión de un Serpinc1 adecuado para su administración a un sujeto a una dosis fija de aproximadamente 80 mg (por ejemplo, una cantidad que disminuye la actividad de Serpinc1 en el sujeto en aproximadamente un 75% o más); y un factor de reemplazo adecuado para su administración a un sujeto a una dosis que está reducida en comparación con la cantidad eficaz recomendada del factor de reemplazo (por ejemplo, una cantidad suficiente para lograr un nivel pico en plasma del Factor VIII de aproximadamente 10-100 UI/dl (por ejemplo, una dosis de menos de aproximadamente 200 UI/kg del Factor VIII, por ejemplo,

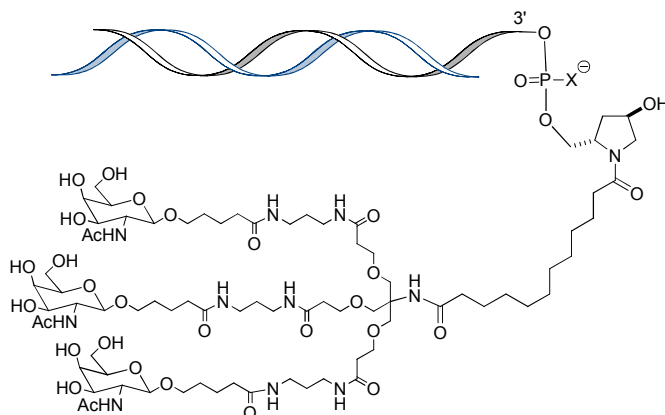
una dosis de entre aproximadamente 5 y aproximadamente 20 UI/kg de Factor VIII); o una cantidad suficiente para lograr un nivel pico en plasma del Factor IX de aproximadamente 10-100 UI/dl (por ejemplo, una dosis de menos de aproximadamente 200 UI/kg del Factor IX, por ejemplo, una dosis de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 30 UI/kg de Factor IX)) para usar en un método de tratamiento de un evento de sangrado en un sujeto que tiene una hemofilia, por ejemplo, hemofilia A, hemofilia B o hemofilia C, sin inhibidores. El agente de ARNi comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde la hebra sentido comprende 5'- GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf – 3' (SEQ ID N°: 13) y la hebra antisentido comprende 5'- usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg – 3' (SEQ ID NO:14), en donde a, c, g y u son A, C, G o U 2'-O-metilo (2'-OMe); Af, Cf, Gf o Uf son A, C, G o U 2'-fluoro; y s es un enlace fosforotioato; y en donde el extremo 3'-terminal de la hebra sentido está conjugado con el ligando como se muestra en el siguiente esquema



en donde X es O o S.

En otro aspecto la presente invención provee un agente de ácido ribonucleico de hebra doble (ARNi) que inhibe la expresión de un Serpinc1 adecuado para su administración a un sujeto a una dosis fija de

aproximadamente 80 mg (por ejemplo, una cantidad que disminuye la actividad de Serpinc1 en el sujeto en aproximadamente un 75% o más); y un agente de derivación adecuado para su administración a un sujeto a una dosis que está reducida en comparación con la cantidad eficaz recomendada del agente de derivación (por ejemplo, una cantidad suficiente para generar trombina y resolver un sangrado, por ejemplo, una dosis de menos de aproximadamente 100 U/kg de aPCC (por ejemplo, una dosis de aproximadamente entre 30 y 50 U/kg de aPCC); una dosis de menos de aproximadamente 120 µg/kg de rFVIIa (por ejemplo, una dosis de aproximadamente 45 µg/kg de rFVIIa)) para usar en un método de tratamiento de un evento de sangrado en un sujeto que tiene una hemofilia, por ejemplo, hemofilia A, hemofilia B o hemofilia C, con inhibidores. El agente de ARNi comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde la hebra sentido comprende 5'- GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf – 3' (SEQ ID N°: 13) y la hebra antisentido comprende 5'- usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg – 3' (SEQ ID NO:14), en donde a, c, g y u son A, C, G o U 2'-O-metilo (2'-OMe); Af, Cf, Gf o Uf son A, C, G o U 2'-fluoro; y s es un enlace fosforotioato; y en donde el extremo 3'-terminal de la hebra sentido está conjugado con el ligando como se muestra en el siguiente esquema



en donde X es O o S.

En una forma de realización, la dosis fija del agente de ARNi es adecuada para una administración subcutánea.

En una forma de realización, la dosis fija del agente de ARNi es adecuada para su administración al sujeto una vez por mes.

La presente invención también provee métodos para prevenir por lo menos un síntoma en un sujeto que padece un trastorno que pudiera verse beneficiado con una reducción de la expresión de Serpinc1, por ejemplo, un trastorno de sangrado, por ejemplo, una hemofilia. Los métodos incluyen administrar al sujeto una dosis profilácticamente eficaz, por ejemplo, una cantidad que disminuye la actividad de Serpinc1 en el sujeto en aproximadamente un 75% o más, por ejemplo, una dosis fija de entre aproximadamente 25 mg y aproximadamente 100 mg, del agente de ARNi, por ejemplo, ARNhd, de la invención (por ejemplo, una composición farmacéutica que comprende un ARNhd de la invención), para así prevenir por lo menos un síntoma en el sujeto que tiene un trastorno que pudiera verse beneficiado con una reducción de la expresión de Serpinc1. En una forma de realización, los métodos incluyen administrar al sujeto una dosis profilácticamente eficaz, por ejemplo, una dosis fija de aproximadamente 50 mg, del agente de ARNi, por

ejemplo, ARNhd, de la invención, (por ejemplo, una composición farmacéutica que comprende un ARNhd de la invención), para así prevenir por lo menos un síntoma en el sujeto que tiene un trastorno que pudiera verse beneficiado con una reducción de la expresión de Serpinc1. En otra forma de realización, los métodos incluyen administrar al sujeto una dosis profilácticamente eficaz, por ejemplo, una dosis fija de aproximadamente 80 mg, del agente de ARNi, por ejemplo, ARNhd, de la invención, (por ejemplo, una composición farmacéutica que comprende un ARNhd de la invención), para así prevenir por lo menos un síntoma en el sujeto que tiene un trastorno que pudiera verse beneficiado con una reducción de la expresión de Serpinc1.

En otro aspecto, la presente invención provee métodos de tratamiento de un sujeto que tiene un trastorno que pudiera verse beneficiado con una reducción de la expresión de Serpinc1, por ejemplo, un trastorno de sangrado, por ejemplo, una hemofilia, que incluyen administrar al sujeto, por ejemplo, un humano, una dosis terapéuticamente eficaz, por ejemplo, una cantidad que disminuye la actividad de Serpinc1 en el sujeto en aproximadamente un 75% o más, por ejemplo, una dosis fija de entre aproximadamente 25 mg y aproximadamente 100 mg, de un agente de ARNi dirigido a un gen Serpinc1 o una composición farmacéutica que comprende un agente de ARNi dirigido a un gen Serpinc1, tratando de esa manera el sujeto que tiene un trastorno que pudiera verse beneficiado con una reducción de la expresión de Serpinc1. En una forma de realización, los métodos incluyen administrar al sujeto una dosis terapéuticamente eficaz, por ejemplo, una dosis fija de aproximadamente 50 mg, del agente de ARNi, por ejemplo, ARNhd, de la invención, (por ejemplo, una composición farmacéutica que comprende un ARNhd de la invención),

tratando de esa manera el sujeto que tiene un trastorno que pudiera verse beneficiado con una reducción de la expresión de Serpinc1. En otra forma de realización, los métodos incluyen administrar al sujeto una dosis terapéuticamente eficaz, por ejemplo, una dosis fija de aproximadamente 80 mg, del agente de ARNi, por ejemplo, ARNhd, de la invención, (por ejemplo, una composición farmacéutica que comprende un ARNhd de la invención), tratando de esa manera el sujeto que tiene un trastorno que pudiera verse beneficiado con una reducción de la expresión de Serpinc1.

En otro aspecto, la invención provee usos de una dosis profilácticamente eficaz, por ejemplo, una cantidad que disminuye la actividad de Serpinc1 en el sujeto en aproximadamente un 75% o más, por ejemplo, una dosis fija de entre aproximadamente 25 mg y aproximadamente 100 mg, de un ARNi, por ejemplo, un ARNhd, de la invención, para prevenir por lo menos un síntoma en un sujeto que sufre de un trastorno que pudiera verse beneficiado con una reducción y/o inhibición de la expresión de Serpinc1, tal como un trastorno de sangrado, por ejemplo, una hemofilia. En una forma de realización, la invención provee usos de una dosis profilácticamente eficaz, por ejemplo, una dosis fija de aproximadamente 50 mg, de un ARNi, por ejemplo, un ARNhd, de la invención para prevenir por lo menos un síntoma en un sujeto que sufre de un trastorno que pudiera verse beneficiado con una reducción y/o inhibición de la expresión de Serpinc1, tal como un trastorno de sangrado, por ejemplo, una hemofilia. En otra forma de realización, la invención provee usos de una dosis profilácticamente eficaz, por ejemplo, una dosis fija de aproximadamente 80 mg, de un ARNi, por ejemplo, un ARNhd, de la invención para prevenir por lo menos un síntoma en un sujeto que sufre de un trastorno que pudiera verse

beneficiado con una reducción y/o inhibición de la expresión de Serpinc1, tal como un trastorno de sangrado, por ejemplo, una hemofilia.

En un aspecto adicional, la presente invención provee usos de una dosis profilácticamente eficaz, por ejemplo, una cantidad que disminuye la actividad de Serpinc1 en el sujeto en aproximadamente un 75% o más, por ejemplo, una dosis fija de entre aproximadamente 25 mg y aproximadamente 100 mg de un agente de ARNi de la invención en la elaboración de un medicamento para prevenir por lo menos un síntoma en un sujeto que sufre de un trastorno que pudiera verse beneficiado con una reducción y/o inhibición de la expresión de Serpinc1, tal como un trastorno de sangrado, por ejemplo, una hemofilia. En una forma de realización, la presente invención provee usos de una dosis profilácticamente eficaz, por ejemplo, una dosis fija de aproximadamente 50 mg de un agente de ARNi de la invención en la elaboración de un medicamento para prevenir por lo menos un síntoma en un sujeto que sufre de un trastorno que pudiera verse beneficiado con una reducción y/o inhibición de la expresión de Serpinc1, tal como un trastorno de sangrado, por ejemplo, una hemofilia. En otra forma de realización, la presente invención provee usos de una dosis profilácticamente eficaz, por ejemplo, una dosis fija de aproximadamente 80 mg de un agente de ARNi de la invención en la elaboración de un medicamento para prevenir por lo menos un síntoma en un sujeto que sufre de un trastorno que pudiera verse beneficiado con una reducción y/o inhibición de la expresión de Serpinc1, tal como un trastorno de sangrado, por ejemplo, una hemofilia.

En otro aspecto, la presente invención provee usos de una dosis terapéuticamente eficaz, por ejemplo, una cantidad que disminuye la actividad de Serpinc1 en el sujeto en aproximadamente un 75% o más, por ejemplo, una

dosis fija de entre aproximadamente 25 mg y aproximadamente 100 mg, de un agente de ARNi de la invención para tratar a un sujeto, por ejemplo, un sujeto que pudiera verse beneficiado con una reducción y/o inhibición de la expresión de Serpinc1. En una forma de realización, la presente invención provee usos de una dosis terapéuticamente eficaz, por ejemplo, una dosis fija de aproximadamente 50 mg, de un agente de ARNi de la invención para tratar a un sujeto, por ejemplo, un sujeto que pudiera verse beneficiado con una reducción y/o inhibición de la expresión de Serpinc1. En otra forma de realización, la presente invención provee usos de una dosis terapéuticamente eficaz, por ejemplo, una dosis fija de aproximadamente 80 mg, de un agente de ARNi de la invención para tratar a un sujeto, por ejemplo, un sujeto que pudiera verse beneficiado con una reducción y/o inhibición de la expresión de Serpinc1.

En aún otro aspecto, la presente invención provee el uso de un agente de ARNi, por ejemplo, un ARNhd, de la invención dirigido a un gen Serpinc1 o una composición farmacéutica que comprende una dosis terapéuticamente eficaz, por ejemplo, una cantidad que disminuye la actividad de Serpinc1 en el sujeto en aproximadamente un 75% o más, por ejemplo, una dosis fija de entre aproximadamente 25 mg y aproximadamente 100 mg, de un agente de ARNi dirigido a un gen Serpinc1 en la elaboración de un medicamento para tratar a un sujeto, por ejemplo, un sujeto que pudiera verse beneficiado con una reducción y/o inhibición de la expresión de Serpinc1, tal como un sujeto que tiene un trastorno de sangrado, por ejemplo, una hemofilia. En una forma de realización, la presente invención provee el uso de un agente de ARNi, por ejemplo, un ARNhd, de la invención dirigido a un gen de Serpinc1 o una composición farmacéutica que comprende una dosis terapéuticamente eficaz,

por ejemplo, una dosis fija de aproximadamente 50 mg, de un agente de ARNi dirigido a un gen *Serpinc1* en la elaboración de un medicamento para tratar a un sujeto, por ejemplo, un sujeto que pudiera verse beneficiado con una reducción y/o inhibición de la expresión de *Serpinc1*, tal como un sujeto que tiene un trastorno de sangrado, por ejemplo, una hemofilia. En otra forma de realización, la presente invención provee el uso de un agente de ARNi, por ejemplo, un ARNhd, de la invención dirigido a un gen de *Serpinc1* o una composición farmacéutica que comprende una dosis terapéuticamente eficaz, por ejemplo, una dosis fija de aproximadamente 80 mg, de un agente de ARNi dirigido a un gen *Serpinc1* en la elaboración de un medicamento para tratar a un sujeto, por ejemplo, un sujeto que pudiera verse beneficiado con una reducción y/o inhibición de la expresión de *Serpinc1*, tal como un sujeto que tiene un trastorno de sangrado, por ejemplo, una hemofilia.

En algunas formas de realización de la invención, por ejemplo, cuando un agente de ARNi de hebra doble comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, la hebra antisentido comprende una región de complementariedad con un ARNm que codifica *Serpinc1* que comprende por lo menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de 5' - UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG – 3' (SEQ ID N°: 15), en donde sustancialmente todos los nucleótidos de la hebra sentido y sustancialmente todos los nucleótidos de la hebra antisentido son nucleótidos modificados, y en donde la hebra sentido está conjugada con un ligando unido al extremo 3'-terminal, dicho agente se administra a una dosis fija de entre aproximadamente 25 mg y aproximadamente 100 mg, por ejemplo, como una dosis fija de aproximadamente 25 mg; o como una dosis fija de

aproximadamente 50 mg; o como una dosis fija de aproximadamente 80 mg; o como una dosis fija de aproximadamente 100 mg.

Por lo tanto, en un aspecto, la invención provee métodos de prevención de al menos un síntoma, por ejemplo, sangrado, en un sujeto que sufre de un trastorno que pudiera verse beneficiado con la reducción de la expresión de *Serpinc1*, por ejemplo, hemofilia. Los métodos incluyen administrar al sujeto una dosis profilácticamente eficaz, por ejemplo, una cantidad que disminuye la actividad de *Serpinc1* en el sujeto en aproximadamente un 75% o más, por ejemplo, una dosis fija de entre aproximadamente 25 mg y aproximadamente 100 mg, de un agente de ácido ribonucleico de hebra doble (ARNi), que comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, donde la hebra antisentido comprende una región de complementariedad con un ARNm que codifica *Serpinc1* que comprende por lo menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de 5' - UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG - 3' (SEQ ID N°: 15), en donde sustancialmente todos los nucleótidos de la hebra sentido y sustancialmente todos los nucleótidos de la hebra antisentido son nucleótidos modificados, y en donde la hebra sentido está conjugada con un ligando unido al extremo 3'-terminal (por ejemplo, una composición farmacéutica que comprende el agente de ARNi), para así prevenir por lo menos un síntoma en el sujeto que tiene un trastorno que pudiera verse beneficiado con una reducción de la expresión de *Serpinc1*. En una forma de realización, la dosis fija es de 50 mg. En otra forma de realización, la dosis fija es de 80 mg.

En otro aspecto, la presente invención provee métodos de tratamiento de un sujeto que tiene un trastorno que pudiera verse beneficiado con una

reducción de la expresión de *Serpinc1*, por ejemplo, un trastorno de sangrado, por ejemplo, una hemofilia, que incluyen administrar al sujeto, por ejemplo, un humano, una dosis terapéuticamente eficaz, por ejemplo, una cantidad que disminuye la actividad de *Serpinc1* en el sujeto en aproximadamente un 75% o más, por ejemplo, una dosis fija de entre aproximadamente 25 mg y aproximadamente 100 mg, de un agente de ácido ribonucleico de hebra doble (ARNi), que comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, donde la hebra antisentido comprende una región de complementariedad con un ARNm que codifica *Serpinc1* que comprende por lo menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de 5' - UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG - 3' (SEQ ID N°: 15), en donde sustancialmente todos los nucleótidos de la hebra sentido y sustancialmente todos los nucleótidos de la hebra antisentido son nucleótidos modificados, y en donde la hebra sentido está conjugada con un ligando unido al extremo 3'-terminal o una composición farmacéutica que comprende al agente de ARNi dirigido a un gen *Serpinc1*, tratando de esa manera el sujeto que tiene un trastorno que pudiera verse beneficiado con una reducción de la expresión de *Serpinc1*. En una forma de realización, la dosis fija es de 50 mg. En otra forma de realización, la dosis fija es de 80 mg.

En otro aspecto, la invención provee usos de una dosis profilácticamente eficaz, por ejemplo, una cantidad que disminuye la actividad de *Serpinc1* en el sujeto en aproximadamente un 75% o más, por ejemplo, una dosis fija de entre aproximadamente 25 mg y aproximadamente 100 mg, de un agente de ácido ribonucleico de hebra doble (ARNi), que comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, donde la hebra antisentido comprende una región de

complementariedad con un ARNm que codifica Serpinc1 que comprende por lo menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de 5' - UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG - 3' (SEQ ID N°: 15), en donde sustancialmente todos los nucleótidos de la hebra sentido y sustancialmente todos los nucleótidos de la hebra antisentido son nucleótidos modificados, y en donde la hebra sentido está conjugada con un ligando unido al extremo 3'-terminal para prevenir por lo menos un síntoma en un sujeto que sufre de un trastorno que pudiera verse beneficiado con una reducción y/o inhibición de la expresión de Serpinc1, tal como un trastorno de sangrado, por ejemplo, una hemofilia. En una forma de realización, la dosis fija es de 50 mg. En otra forma de realización, la dosis fija es de 80 mg.

En un aspecto adicional, la presente invención provee usos de una dosis profilácticamente eficaz, por ejemplo, una cantidad que disminuye la actividad de Serpinc1 en el sujeto en aproximadamente un 75% o más, por ejemplo, una dosis fija de entre aproximadamente 25 mg y aproximadamente 100 mg de un agente de ácido ribonucleico de hebra doble (ARNi), que comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, donde la hebra antisentido comprende una región de complementariedad con un ARNm que codifica Serpinc1 que comprende por lo menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de 5' - UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG - 3' (SEQ ID N°: 15), en donde sustancialmente todos los nucleótidos de la hebra sentido y sustancialmente todos los nucleótidos de la hebra antisentido son nucleótidos modificados, y en donde la hebra sentido está conjugada con un ligando unido al extremo 3'-terminal en la elaboración de un medicamento para prevenir por lo menos un

síntoma en un sujeto que sufre de un trastorno que pudiera verse beneficiado con una reducción y/o inhibición de la expresión de *Serpinc1*, tal como un trastorno de sangrado, por ejemplo, una hemofilia. En una forma de realización, la dosis fija es de 50 mg. En otra forma de realización, la dosis fija es de 80 mg.

En otro aspecto, la presente invención provee usos de una dosis terapéuticamente eficaz, por ejemplo, una cantidad que disminuye la actividad de *Serpinc1* en el sujeto en aproximadamente un 75% o más, por ejemplo, una dosis fija de entre aproximadamente 25 mg y aproximadamente 100 mg, de un agente de ácido ribonucleico de hebra doble (ARNi), que comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, donde la hebra antisentido comprende una región de complementariedad con un ARNm que codifica *Serpinc1* que comprende por lo menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de 5' - UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG - 3' (SEQ ID N°: 15), en donde sustancialmente todos los nucleótidos de la hebra sentido y sustancialmente todos los nucleótidos de la hebra antisentido son nucleótidos modificados, y en donde la hebra sentido está conjugada con un ligando unido al extremo 3'-terminal para tratar a un sujeto, por ejemplo, un sujeto que pudiera verse beneficiado con una reducción y/o inhibición de la expresión de *Serpinc1*. En una forma de realización, la dosis fija es de 50 mg. En otra forma de realización, la dosis fija es de 80 mg.

En aún otro aspecto, la presente invención provee el uso de un agente de ARNi, por ejemplo, un ARNhd, de la invención dirigido a un gen *Serpinc1* o una composición farmacéutica que comprende una dosis

terapéuticamente eficaz, por ejemplo, una cantidad que disminuye la actividad de Serpinc1 en el sujeto en aproximadamente un 75% o más, por ejemplo, una dosis fija de entre aproximadamente 25 mg y aproximadamente 100 mg, de un agente de ácido ribonucleico de hebra doble (ARNi), que comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, donde la hebra antisentido comprende una región de complementariedad con un ARNm que codifica Serpinc1 que comprende por lo menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de 5' - UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG - 3' (SEQ ID N°: 15), en donde sustancialmente todos los nucleótidos de la hebra sentido y sustancialmente todos los nucleótidos de la hebra antisentido son nucleótidos modificados, y en donde la hebra sentido está conjugada con un ligando unido al extremo 3'-terminal, en la elaboración de un medicamento para tratar a un sujeto, por ejemplo, un sujeto que pudiera verse beneficiado con una reducción y/o inhibición de la expresión de Serpinc1, tal como un sujeto que tiene un trastorno de sangrado, por ejemplo, una hemofilia. En una forma de realización, la dosis fija es de 50 mg. En otra forma de realización, la dosis fija es de 80 mg.

Los métodos y usos de la invención incluyen administrar una composición descrita en la presente de manera tal que disminuye la expresión del gen Serpinc1 blanco, tal como durante 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 forma de

realización, la expresión del gen *Serpinc1* blanco disminuye por una duración extendida, por ejemplo, por lo menos aproximadamente siete días o más, por ejemplo, aproximadamente una semana, dos semanas, tres semanas, aproximadamente cuatro semanas, aproximadamente 5 semanas, aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 2 meses, aproximadamente tres meses o más.

La reducción en la expresión del gen se puede evaluar mediante cualquier método conocido en el arte. Por ejemplo, la reducción en la expresión de *Serpinc1* se puede establecer determinando el nivel de expresión del ARNm de *Serpinc1* usando métodos de rutina para un especialista en el arte, por ejemplo, transferencia Northern, qRT-PCR, determinando el nivel de la proteína *Serpinc1* usando métodos de rutina para un especialista en el arte, tal como transferencia Western, técnicas inmunológicas y/o determinando la actividad biológica de *Serpinc1*, tal como afectando una o más moléculas asociadas con el mecanismo de coagulación de células sanguíneas (o en un entorno *in vivo*, la propia coagulación de la sangre). En una forma de realización, el tiempo de generación de trombina, el tiempo de formación de coágulos y/o el tiempo de coagulación se determinan a fin de evaluar la expresión de *Serpinc1* usando, por ejemplo, análisis por Tromboelastometría ROTEM® de sangre completa.

La administración del ARNcd de acuerdo con los métodos y los usos de la invención pueden dar como resultado una reducción de la severidad, los signos, los síntomas y/o los marcadores de dichas enfermedades o trastornos en un paciente con una enfermedad asociada a *Serpinc1*. En este contexto, una “reducción” se refiere a una disminución estadísticamente significativa en

dicho nivel. La reducción puede ser, por ejemplo, de al menos aproximadamente un 5%, un 10%, un 15%, un 20%, un 25%, un 30%, un 35%, un 40%, un 45%, un 50%, un 55%, un 60%, un 65%, un 70%, un 75%, un 80%, un 85%, un 90%, un 95% o aproximadamente un 100%.

La eficacia del tratamiento o de la prevención de la enfermedad se puede evaluar, por ejemplo, midiendo el progreso de la enfermedad, la remisión de la enfermedad, la severidad de los síntomas, la frecuencia de sangrados, la reducción del dolor, la calidad de vida, la dosis de la medicación requerida para conservar el efecto del tratamiento, el nivel de un marcador de la enfermedad o cualquier otro parámetro mensurable apropiado para una enfermedad dada bajo tratamiento o buscada como blanco para la prevención. Es propio de la capacidad de un especialista en el arte monitorear la eficacia del tratamiento o de la prevención mediante la medición de cualquiera de dichos parámetros o cualquier combinación de parámetros. Por ejemplo, la eficacia del tratamiento de un trastorno de sangrado se puede evaluar, por ejemplo, mediante un monitoreo periódico de los niveles de trombina:antitrombina. La comparación de las últimas lecturas con las lecturas iniciales le ofrece al médico una indicación de la eficacia del tratamiento. Es propio de la capacidad de un especialista en el arte monitorear la eficacia del tratamiento o de la prevención mediante la medición de cualquiera de dichos parámetros o cualquier combinación de parámetros. Con relación a la administración de un ARNi dirigido a Serpinc1 o a una composición farmacéutica del mismo, el término "eficaz contra" un trastorno de sangrado indica que la administración de una manera clínicamente apropiada da como resultado un efecto beneficioso para al menos una fracción estadísticamente

significativo de pacientes, tal como una mejora de los síntomas, la cura, una reducción de la enfermedad, la prolongación de la vida, una mejora en la calidad de vida u otro efecto reconocido en general como positivo por el médico de cabecera del tratamiento de trastornos de sangrado y las causas relacionadas.

El tratamiento o efecto preventivo es evidente cuando hay una mejora estadísticamente significativa de uno o más parámetros del estado de enfermedad o cuando no hay un empeoramiento o no hay desarrollo de síntomas que por el contrario se podrían haber anticipado. A modo de ejemplo, un cambio favorable de por lo menos un 10% en un parámetro de enfermedad mensurable, y preferiblemente al menos un 20%, un 30%, un 40%, un 50% o más, puede ser indicativo de un tratamiento eficaz. La eficacia de un fármaco de ARNi dado o de la formulación de dicho fármaco también se puede considerar usando un modelo experimental en animales para la enfermedad dada, como es de conocimiento en el arte. Cuando se usa un modelo experimental en animales, la eficacia del tratamiento resulta evidente cuando se observa una reducción estadísticamente significativa de un marcador o síntoma.

Como alternativa, la eficacia se puede medir por la reducción en la severidad de la enfermedad determinada por un especialista en el arte de diagnóstico basado en una escala de clasificación de la severidad de la enfermedad aceptada clínicamente. Cualquier cambio positivo que, por ejemplo, da como resultado una disminución de la severidad de la enfermedad medida usando la escala apropiada, representa un tratamiento adecuado usando un ARNi o una formulación de ARNi descrita en la presente.

El ARNi (o composiciones farmacéuticas que comprenden al ARNi) se pueden administrar al sujeto aproximadamente una vez por semana, aproximadamente dos veces por mes, aproximadamente una vez cada seis semanas, aproximadamente una vez cada 2 meses o una vez cada tres meses.

El agente de ARNi de hebra doble se puede administrar a un sujeto como una o más dosis. Por ejemplo, se puede administrar un agente de ARNi de hebra doble a un sujeto como una dosis mensual de entre aproximadamente 0,200 mg/kg y aproximadamente 1,825 mg/kg. Como alternativa, el agente de ARNi de hebra doble se puede administrar a un sujeto a una dosis fija de entre aproximadamente 25 mg y aproximadamente 100 mg.

En una forma de realización, un agente de ARNi de hebra doble que comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, donde la hebra antisentido comprende una región de complementariedad con un ARNm que codifica Serpinc1 que comprende por lo menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de 5' - UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG - 3' (SEQ ID N°: 15), en donde sustancialmente todos los nucleótidos de la hebra sentido y sustancialmente todos los nucleótidos de la hebra antisentido son nucleótidos modificados, y en donde la hebra sentido está conjugada con un ligando unido al extremo 3'-terminal se administra al sujeto a una dosis fija de entre aproximadamente 25 y aproximadamente 100 mg, por ejemplo, aproximadamente 25 mg, 50 mg, 80 mg o 100 mg.

La administración se puede repetir, por ejemplo, sobre una base regular, tal como mensualmente, por un mes, dos meses, tres meses, cuatro meses o más. Después del régimen de tratamiento inicial, los tratamientos se

pueden administrar sobre una base menos frecuente. Por ejemplo, después de una administración mensual por tres meses, se puede repetir la administración una vez cada tres meses, por un año o más.

Por lo tanto, en algunas formas de realización, el agente de ARNi se administra con un régimen de dosificación que incluye una “fase de carga” de administraciones muy frecuentes, que puede ser seguida de una “fase de mantenimiento”, en la cual el agente de ARNi se administra a intervalos más separados.

Opcionalmente, se puede repetir un programa de dosificación de carga y/o un programa de dosificación de mantenimiento con una o más repeticiones. El número de repeticiones puede depender de si se obtiene un efecto deseado, por ejemplo, la supresión de un gen *Serpinc1*, y/o de si se obtiene un efecto terapéutico o profiláctico, por ejemplo, un aumento en la coagulación sanguínea, una reducción en el tiempo de formación de coágulos y/o una reducción del tiempo de coagulación.

La administración del ARNi puede reducir niveles de *Serpinc1*, por ejemplo, en una célula, tejido, sangre, orina u otro compartimiento del paciente en por lo menos aproximadamente un 5%, un 6%, un 7%, un 8%, un 9%, un 10%, un 11%, un 12%, un 13%, un 14%, un 15%, un 16%, un 17%, un 18%, un 19%, un 20%, un 21%, un 22%, un 23%, un 24%, un 25%, un 26%, un 27%, un 28%, un 29%, un 30%, un 31%, un 32%, un 33%, un 34%, un 35%, un 36%, un 37%, un 38%, un 39%, un 40%, un 41%, un 42%, un 43%, un 44%, un 45%, un 46%, un 47%, un 48%, un 49%, un 50%, un 51%, un 52%, un 53%, un 54%, un 55%, un 56%, un 57%, un 58%, un 59%, un 60%, un 61%, un 62%, un 63%, un 64%, un 65%, un 66%, un 67%, un 68%, un 69%, un 70%, un 71%, un 72%, un

73%, un 74%, un 75%, un 76%, un 77%, un 78%, un 79%, un 80%, un 81%, un 82%, un 83%, un 84%, un 85%, un 86%, un 87%, un 88%, un 89%, un 90%, un 91%, un 92%, un 93%, un 94%, un 95%, un 96%, un 97%, un 98% o por lo menos aproximadamente un 99% o más.

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

Antes de la administración de una dosis completa del ARNi, a los pacientes se les puede administrar una dosis más pequeña, tal como una de infusión al 5% y se pueden monitorear los efectos adversos, tal como una reacción alérgica. En otro ejemplo, el paciente puede ser monitoreado por efectos inmunoestimulantes indeseados, tal como un aumento en los niveles de citoquinas (por ejemplo, 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 con la misma puede mejorar la calidad de vida.

Un ARNi de la invención se puede administrar en una forma “desnuda”, o como un “ARNi libre”. El ARNi desnudo se administra en la ausencia de una composición farmacéutica. El ARNi desnudo se puede encontrar en una solución amortiguadora adecuada. La solución amortiguadora puede comprender acetato, citrato, prolamina, carbonato o fosfato, o cualquier combinación de los mismos. En una forma de realización, la solución amortiguadora es una solución amortiguadora salina fosfato (PBS). Se puede ajustar el pH y la osmolaridad de la solución amortiguadora que contiene al ARNi de modo tal que sean adecuados para la administración a un sujeto.

Como alternativa, el ARNi de la invención se puede administrar como una composición farmacéutica, tal como una formulación liposómica de ARNcd.

Los sujetos que pudieran verse beneficiados con la reducción y/o inhibición de la expresión del gen *Serpinc1* son aquellos que sufren de un trastorno de sangrado, por ejemplo, un trastorno de sangrado heredado o un trastorno de sangrado adquirido, como se describe en la presente. En una forma de realización, un sujeto que sufre de un trastorno de sangrado heredado sufre de una hemofilia, por ejemplo, hemofilia A, B o C. En una forma de realización, un sujeto que sufre de un trastorno de sangrado heredado, por ejemplo, una hemofilia, es un sujeto inhibidor (un sujeto que se ha vuelto refractario a los factores de coagulación de reemplazo). En una forma de realización, el sujeto inhibidor tiene hemofilia A. En otra forma de realización, el sujeto inhibidor tiene hemofilia B. En aún otra forma de realización, el sujeto inhibidor tiene hemofilia C. El tratamiento de un sujeto que pudiera verse beneficiado con la reducción y/o inhibición de la expresión del gen *Serpinc1* incluye un tratamiento terapéutico (por ejemplo, según demanda, por ejemplo, el sujeto está sangrando (sangrado espontáneo o sangrado debido a un traumatismo) y no coagula) y profiláctico (por ejemplo, el sujeto no está sangrando y/o debe someterse a una cirugía).

La invención provee además métodos y usos para el uso de un ARNi o una composición farmacéutica de los mismos, por ejemplo, para tratar un sujeto que pudiera verse beneficiado con la reducción y/o la inhibición de la expresión de *Serpinc1*, por ejemplo, un sujeto que sufre de un trastorno de sangrado, en combinación con otros métodos farmacéuticos y/u otros métodos terapéuticos, por ejemplo, con los métodos farmacéuticos conocidos y/o los

métodos terapéuticos conocidos, tal como, por ejemplo, los que se emplean actualmente para tratar estos trastornos.

Por ejemplo, en determinadas formas de realización, el ARNi dirigido a Serpinc1 se administra en combinación, por ejemplo, con un agente de utilidad en el tratamiento de un trastorno de sangrado según se describe en otra parte en la presente. Por ejemplo, la terapéutica y los métodos terapéuticos adecuados adicionales para tratar a un sujeto que pudiera verse beneficiado con la reducción de la expresión de Serpinc1, por ejemplo, un sujeto que sufre de un trastorno de sangrado, incluyen plasma recién congelado (FFP); FVIIa recombinante; FIX recombinante; concentrados de FXI; concentrados de FVIII que contienen vWF, inactivados por virus; terapia de desensibilización que puede incluir dosis grandes de FVIII o FIX, junto con esteroides o inmunoglobulina intravenosa (IVIG) y ciclofosfamida; plasmaféresis junto con inmunosupresión e infusión de FVIII o FIX, con o sin una terapia antifibrinolítica; inducción de tolerancia inmune (ITI), con o sin una terapia inmunosupresora (por ejemplo, ciclofosfamida, prednisona y/o anti-CD20); acetato de desmopresina [DDAVP]; antifibrinolíticos, tal como ácido aminocaproico y ácido tranexámico; concentrado del complejo de protrombina (PCC) activado; agentes antihemofílicos; corticosteroides; agentes inmunosupresores; y estrógenos.

Se puede administrar el ARNi y un agente terapéutico y/o tratamiento adicional al mismo tiempo y/o en la misma combinación, por ejemplo, por vía parenteral, o el agente terapéutico adicional se puede administrar como parte de una composición separada o en tiempos separados y/o mediante otro método conocido en el arte o que se describe en la presente.

En una forma de realización, la presente invención provee métodos para tratar a un sujeto que sufre de un trastorno de sangrado, por ejemplo, una hemofilia, mediante la administración subcutánea al sujeto del compuesto AT3SC-001 (AD-57213-Hebra sentido: 5'-GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf – 3' (SEQ ID N°: 13) y hebra antisentido: 5'-usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg – 3' (SEQ ID N°: 14), en donde a, c, g y u son A, C, G o U 2'-O-metilo (2'-OMe); Af, Cf, Gf o Uf son A, C, G o U 2'-fluoro; y s es un enlace fosforotioato) a una dosis fija de entre aproximadamente 25 mg y aproximadamente 100 mg, por ejemplo, una dosis fija de aproximadamente 25 mg, aproximadamente 50 mg, aproximadamente 80 mg o aproximadamente 100 mg (por ejemplo, una cantidad que disminuye la actividad de Serpinc1 en el sujeto en aproximadamente un 75% o más). En una forma de realización, la dosis fija es de 50 mg. En otra forma de realización, la dosis fija es de 80 mg.

III. ARNi para usar en los métodos de la invención

En la presente se describen métodos para usar los agentes de ARNi de hebra doble mejorados que inhiben la expresión de un gen Serpinc1 en una célula, tal como una célula en un sujeto, por ejemplo, un mamífero, tal como un humano, que padece un trastorno asociado con Serpinc1, por ejemplo, un trastorno de sangrado, por ejemplo, hemofilia.

Por lo tanto, la invención provee agentes de ARNi de hebra doble con modificaciones químicas que pueden inhibir la expresión de un gen blanco (es decir, un gen de Serpinc1) *in vivo*. En determinados aspectos de la invención, están modificados sustancialmente todos los nucleótidos de un ARNi de la invención. En otras formas de realización de la invención, están

modificados todos los nucleótidos de un ARNi de la invención. Los ARNi de la invención en donde “sustancialmente todos los nucleótidos están modificados”, están mayormente modificados pero no completamente modificados y pueden incluir no más que 5, 4, 3, 2 ó 1 nucleótidos no modificados.

El agente de ARNi comprende una hebra orientada en el sentido del marco de lectura y una hebra antisentido. Cada hebra del agente de ARNi puede variar entre 12 y 30 nucleótidos de longitud. Por ejemplo, cada hebra puede tener entre 14 y 30 nucleótidos de longitud, entre 17 y 30 nucleótidos de longitud, entre 25 y 30 nucleótidos de longitud, entre 27 y 30 nucleótidos de longitud, entre 17 y 23 nucleótidos de longitud, entre 17 y 21 nucleótidos de longitud, entre 17 y 19 nucleótidos de longitud, entre 19 y 25 nucleótidos de longitud, entre 19 y 23 nucleótidos de longitud, entre 19 y 21 nucleótidos de longitud, entre 21 y 25 nucleótidos de longitud, o entre 21 y 23 nucleótidos de longitud.

La hebra orientada en el sentido del marco de lectura y la hebra antisentido típicamente forman un ARN dúplex de hebra doble (“ARNcd”), también referido en la presente como un “agente de ARNi”. La región dúplex de un agente de ARNi puede tener entre 12 y 30 pares de nucleótidos de longitud. Por ejemplo, la región dúplex puede tener entre 14 y 30 pares de nucleótidos de longitud, entre 17 y 30 pares de nucleótidos de longitud, entre 27 y 30 pares de nucleótidos de longitud, entre 17 y 23 pares de nucleótidos de longitud, entre 17 y 21 pares de nucleótidos de longitud, entre 17 y 19 pares de nucleótidos de longitud, entre 19 y 25 pares de nucleótidos de longitud, entre 19 y 23 pares de nucleótidos de longitud, entre 19 y 21 pares de nucleótidos de longitud, entre 21 y 25 pares de nucleótidos de longitud o entre 21 y 23 pares

de nucleótidos de longitud. En otro ejemplo, la región dúplex se selecciona entre 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 y 27 nucleótidos de longitud.

En una forma de realización, el agente de ARNi puede contener una o más regiones sobreextendidas y/o grupos protectores en el extremo 3', o extremo 5' o ambos extremos de una o ambas hebras. La sobreextensión puede tener entre 1 y 6 nucleótidos de longitud, por ejemplo entre 2 y 6 nucleótidos de longitud, entre 1 y 5 nucleótidos de longitud, entre 2 y 5 nucleótidos de longitud, entre 1 y 4 nucleótidos de longitud, entre 2 y 4 nucleótidos de longitud, entre 1 y 3 nucleótidos de longitud, entre 2 y 3 nucleótidos de longitud o entre 1 y 2 nucleótidos de longitud. Las sobreextensiones pueden ser el resultado de que una hebra sea más larga que la otra, o el resultado de dos hebras de la misma longitud que estén escalonadas. La sobreextensión puede formar una no coincidencia con el ARNm blanco o puede ser complementaria con las secuencias del gen que es blanco o puede ser otra secuencia. La primera y segunda hebra también pueden estar unidas, por ejemplo, por bases adicionales para formar una horquilla, o por otros conectores que no son bases.

En una forma de realización, los nucleótidos en la región sobreextendida del agente de ARNi pueden ser de manera independiente cada uno un nucleótido modificado o no modificado que incluye, a título enunciativo no taxativo 2'-azúcar modificado, tal como, 2-F, 2'-O-metilo, timidina (T), 2'-O-metoxietil-5-metiluridina (Teo), 2'-O-metoxietiladenosina (Aeo), 2'-O-metoxietil-5-metilcitidina (m5Ceo), y cualquier combinación de los mismos. Por ejemplo, TT puede ser una secuencia sobreextendida para cada extremo en cualquier hebra. La sobreextensión puede formar una no coincidencia con el ARNm

blanco o puede ser complementaria con las secuencias del gen que es blanco o puede ser otra secuencia.

Las sobreextensiones 5' o 3' en la misma hebra orientada en el sentido del marco de lectura, hebra antisentido o ambas hebras del agente de ARNi pueden estar fosforiladas. En algunas formas de realización, la región sobreextendida contiene dos nucleótidos con un fosforotioato entre los dos nucleótidos, en donde los dos nucleótidos pueden ser iguales o diferentes. En una forma de realización, la sobreextensión está presente en el extremo 3' de la hebra orientada en el sentido del marco de lectura, hebra antisentido o ambas hebras. En una forma de realización, esta sobreextensión 3' está presente en la hebra antisentido. En una forma de realización, esta sobreextensión 3' está presente en la hebra orientada en el sentido del marco de lectura.

El agente de ARNi puede contener sólo una sobreextensión simple, que puede fortalecer la actividad de interferencia del ARNi, sin afectar su estabilidad global. Por ejemplo, la sobreextensión de hebra simple puede estar localizada en el extremo terminal 3' de la hebra orientada en el sentido del marco de lectura o, como alternativa, en el extremo terminal 3' de la hebra antisentido. El ARNi también puede tener un extremo romo, localizado en el extremo 5' de la hebra antisentido (o el extremo 3' de la hebra orientada en el sentido del marco de lectura) o viceversa. Generalmente, la hebra antisentido del ARNi tiene una sobreextensión de nucleótidos en el extremo 3', y el extremo 5' es romo. Si bien no se desea considerar ninguna teoría, el extremo romo asimétrico en el extremo 5' de la hebra antisentido y la sobreextensión del extremo 3' de la hebra antisentido favorece la carga de la hebra guía en el

proceso de RISC.

Los ácidos nucleicos presentados en la invención se pueden sintetizar y/o modificar mediante métodos bien establecidos en el arte, tales como los que se describen en “Current protocols in nucleic acid chemistry”, Beaucage, S.L. *et al.*, (Editores.), John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, NY, EE.UU., que se incorpora en la presente a modo de referencia. Las modificaciones incluyen, por ejemplo, modificaciones de los extremos, por ejemplo, modificaciones del extremo 5' (fosforilación, conjugación, ligamientos invertidos) o modificaciones del extremo 3' (conjugación, nucleótidos de ADN, ligamientos invertidos, *etc.*); modificaciones de bases, por ejemplo, reemplazo por bases estabilizantes, bases desestabilizantes o bases que se aparean con un repertorio expandido de miembros, eliminación de bases (nucleótidos abásicos) o bases conjugadas; modificaciones con azúcares (por ejemplo, en la posición 2' o en la posición 4') o reemplazo del azúcar; y/o modificaciones del esqueleto, incluyendo la modificación o el reemplazo de los enlaces fosfodiéster. Los ejemplos específicos de compuestos de ARNi de utilidad en las formas de realización que se describen en la presente incluyen, pero en un sentido no taxativo, los ARN que contienen esqueletos modificados o enlaces internucleósido no naturales. Los ARN que tienen esqueletos modificados incluyen, entre otros, aquellos que no tienen un átomo de fósforo en el esqueleto. A los efectos de esta Descripción, y como en ocasiones se menciona en el arte, los ARN modificados que no tienen un átomo de fósforo en su esqueleto internucleósido también se pueden considerar como oligonucleósidos. En algunas formas de realización, el ARNi modificado tendrá un átomo de fósforo en su esqueleto internucleósido.

Los esqueletos de ARN modificados incluyen, por ejemplo, fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres,

metilo y otros alquifosfonatos incluyendo 3'-alquilenfosfonatos y fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos incluyendo 3'-aminofosforamidato y aminoalquifosforamidatos, tionofosforamidatos, tionoalquifosfonatos, tionoalquifosfotriésteres y boranofosfatos que tienen enlaces 3'-5' normales, análogos unidos 2'-5' de los mismos, y aquellos que tienen una polaridad invertida, en donde los pares adyacentes de unidades de nucleósidos están unidos 3'-5' a 5'-3' o 2'-5' a 5'-2'. También se incluyen diversas sales, sales mixtas y formas de ácidos libres.

Las Patentes de los EE.UU. representativas que divulgan la preparación de los enlaces que contienen fósforo anteriores incluyen, pero en un sentido no taxativo, las Patentes de los EE.UU. N°: 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 EE.UU. N°: RE39464, cuyos contenidos completos se incorporan en la presente a modo de referencia.

Los esqueletos de ARN modificados que no incluyen un átomo de fósforo son esqueletos formados por enlaces internucleósido de alquilo o cicloalquilo de cadena corta, heteroátomos mixtos y enlaces internucleósido de alquilo o cicloalquilo, o uno o más enlaces internucleósido heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta. Estos incluyen aquellos que tienen enlaces morfolino (formados en parte a partir de la porción de azúcar de un nucleósido); esqueletos de siloxano; esqueletos de sulfuro, sulfóxido y sulfona; esqueletos de formacetilo y tioformacetilo; esqueletos de

metilenformacetilo y tioformacetilo; esqueletos que contienen alqueno; esqueletos de sulfamato; esqueletos de metilenimino y metilenhidrazino; esqueletos de sulfonato y sulfonamida; esqueletos de amida; y otros que tienen partes componentes mixtos de N, O, S y CH₂.

Las Patentes de los EE.UU. representativas que divulgan la preparación de los oligonucleósidos anteriores incluyen, pero en un sentido no taxativo, las Patentes de los EE.UU. N°: 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, cuyos contenidos completos se incorporan en la presente a modo de referencia.

En otras formas de realización, se contemplan miméticos de ARN adecuados para su uso en los ARNi, en donde tanto el azúcar como el enlace internucleósido, es decir, el esqueleto, de las unidades de nucleótidos se reemplazan por grupos nuevos. Las unidades de bases se mantienen para su hibridación con un compuesto de ácido nucleico blanco apropiado. Un compuesto oligomérico tal, un mimético de ARN que ha demostrado excelentes propiedades hibridación, se conoce como un ácido nucleico peptídico (PNA). En los compuestos PNA, el esqueleto de azúcar de un ARN es reemplazado por un esqueleto que contiene amida, en particular un esqueleto de aminoetilglicina. Las nucleobases se retienen y se unen de manera directa o indirecta a los átomos de nitrógeno aza de la porción amida del esqueleto. Las Patentes de los EE.UU. representativas que divulgan la preparación de compuestos PNA incluyen, pero en un sentido no taxativo, las Patentes de los EE.UU. N°: 5.539.082; 5.714.331; y 5.719.262, cuyos contenidos completos se incorporan en la presente a modo de referencia. Otros compuestos PNA adecuados para su uso en los ARNi de la invención

se describen, por ejemplo, en Nielsen *et al.*, *Science*, 1991, 254, 1497-1500.

Algunas formas de realización presentadas en la invención incluyen ARN con esqueletos de fosforotioato y oligonucleósidos con esqueletos de heteroátomos y, en particular, $--CH_2--NH--CH_2--$, $--CH_2--N(CH_3)--O--CH_2--$ [conocido como un esqueleto de metileno (metilimino) o MMI], $--CH_2--O--N(CH_3)--CH_2--$, $--CH_2--N(CH_3)--N(CH_3)--CH_2--$ y $--N(CH_3)--CH_2--CH_2--$ [en donde el esqueleto fosfodiéster nativo está representado como $--O--P--O--CH_2--$] de la Patente de los EE.UU. N°: 5.489.677 ya mencionada, y los esqueletos de amida de la Patente de los EE.UU. N°: 5.602.240 ya mencionada. En algunas formas de realización, los ARN presentados en la presente tienen las estructuras de esqueletos de morfolino de la Patente de los EE.UU. N°: 5.034.506 ya mencionada.

Los ARN modificados también pueden contener una o más grupos de azúcares sustituidos. Los ARNi, por ejemplo, los ARNcd, presentados en la presente pueden incluir uno de los siguientes en la posición 2': OH; F; O-, S- o N-alquilo; O-, S- o N-alqueno; O-, S- o N-alquino; u O-alquilo-O-alquilo, en donde el alquilo, el alqueno y el alquino pueden ser C₁ a C₁₀ alquilo o C₂ a C₁₀ alqueno y alquino sustituidos o no sustituidos. Los ejemplos de modificaciones adecuadas incluyen $O[(CH_2)_nO]_mCH_3$, $O(CH_2)_nOCH_3$, $O(CH_2)_nNH_2$, $O(CH_2)_nCH_3$, $O(CH_2)_nONH_2$ y $O(CH_2)_nON[(CH_2)_nCH_3]_2$, donde n y m comprenden entre 1 y 10 aproximadamente. En otras formas de realización, los ARNcd incluyen uno de los siguientes en la posición 2': C₁ a C₁₀ alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, alcarilo, aralquilo, O-alcarilo o O-aralquilo, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino, sililo sustituido, un grupo de clivaje de ARN, un grupo informante, un intercalador, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un ARNi o un grupo para mejorar las propiedades

farmacodinámicas de un ARNi y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. En algunas formas de realización, la modificación incluye un grupo 2'-metoxietoxi (2'-O--CH₂CH₂OCH₃, también conocido como 2'-O-(2-metoxietilo) o 2'-MOE) (Martin *et al.*, *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78: 486-504), es decir, un grupo alcoxi-alcoxi. Otro ejemplo de modificación es el grupo 2'-dimetilaminooxietoxi, es decir, un grupo O(CH₂)₂ON(CH₃)₂, también conocido como 2'-DMAOE, como se describe más adelante en los ejemplos de la presente, y 2'-dimetilaminoetoxietoxi (también conocido en el arte como 2'-O-dimetilaminoetoxietilo o 2'-DMAEOE), es decir, 2'-O--CH₂--O--CH₂--N(CH₂)₂.

Otras modificaciones incluyen 2'-metoxi (2'-OCH₃), 2'-aminopropoxi (2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂) y 2'-fluoro (2'-F). También se pueden efectuar modificaciones similares en otras posiciones del ARN de un ARNi, en particular en la posición 3' del azúcar en el nucleótido 3' terminal o en ARNcd unidos en 2'-5' y en la posición 5' del nucleótido 5' terminal. Los ARNi también pueden contener miméticos de azúcar, tales como grupos ciclobutilo, en lugar del azúcar pentofuranosilo. Las Patentes de los EE.UU. representativas que divulgan la preparación de dichas estructuras de azúcares modificados incluyen, pero en un sentido no taxativo, las Patentes de los EE.UU. N°: 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 5.700.920, algunas de las cuales son del mismo solicitante que la presente solicitud. El contenido completo de cada una de las publicaciones precedentes se incorpora en la presente a modo de referencia.

Un ARNi también puede incluir modificaciones o sustituciones de la nucleobase (a menudo denominado simplemente "base" en el arte). Según se usa en la presente, 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, tal como desoxitimina (dT), 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetilcitosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metilo y otros derivados alquilo de adenina y guanina, 2-propilo y otros derivados alquilo de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracilo y citosina, 5-propiniluracilo y citosina, 6-azouracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxil anal y otras adeninas y guaninas 8-sustituidas, 5-halo, en particular 5-bromo, 5-trifluorometilo y otros uracilos y citosinas 5-sustituidos, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 8-azaguanina y 8-aza-adenina, 7-deazaguanina y 7-deazaadenina y 3-deazaguanina y 3-deazaadenina. Otras nucleobases incluyen las que se divulgan en la Patente de los EE.UU. N°: 3.687.808; las que se divulgan en *Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine*, Herdewijn, P. ed. Wiley-VCH, 2008; las que se divulgan en *The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering*, páginas 858-859, Kroschwitz, J. L, ed. John Wiley & Sons, 1990; las que divulgan Englisch *et al.*, *Angewandte Chemie*, Edición Internacional, 1991, 30, 613; y las divulgadas por Sanghvi, Y S., Capítulo 15, *dsRNA Research and Applications*, páginas 289-302, Crooke, S. T. y Lebleu, B., Ed., CRC Press, 1993. Algunas de estas nucleobases son de particular utilidad para aumentar la afinidad de unión de los compuestos oligoméricos presentados en la invención. Estas incluyen pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas N-2, N-6 y O-6 sustituidas, incluyendo 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. Se ha demostrado que las sustituciones 5-metilcitosina aumentan la estabilidad de la dupla de ácidos nucleicos en 0,6-1,2°C (Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. y Lebleu, B., Eds., *dsRNA Research and Applications*, CRC Press, Boca Raton, 1993, páginas 276-278) y

son ejemplos de sustituciones de la base, aún más particularmente cuando se combinan con modificaciones 2'-O-metoxietilo de los azúcares.

Las Patentes de los EE.UU. representativas que divulgan la preparación de algunas de las nucleobases modificadas indicadas previamente, así como otras nucleobases modificadas incluyen, pero en un sentido no taxativo, las Patentes de los EE.UU. N°: 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 indicadas previamente y cuyos contenidos completos se incorporan en la presente a modo de referencia.

El ARN de un ARNi también se puede modificar para que incluya una o más unidades de azúcares bicíclicos. Un “azúcar bicíclico” es un anillo furanosilo modificado por formación de un puente de dos átomos. Un “nucleósido bicíclico” (“BNA”) es un nucleósido que tiene un grupo de azúcar que comprende un puente que une a dos átomos de carbono del anillo de azúcar, formando de esa manera un sistema de anillos bicíclico. En determinadas formas de realización, el puente une el carbono 4' y el carbono 2' del anillo de azúcar. Por consiguiente, en algunas formas de realización el agente de la invención puede incluir el ARN de un ARNi también se puede modificar para incluir uno o más ácidos nucleicos cerrados (LNA). Un ácido nucleico cerrado es un nucleótido que contiene una porción ribosa modificada, en donde dicha porción ribosa comprende un puente adicional que conecta los carbonos 2' y 4'. En otras palabras, un LNA es un nucleótido que comprende una unidad de azúcar bicíclico que comprende un puente 4'-CH₂-O-2'. Esta

estructura "cierra" la ribosa de manera efectiva en la conformación estructural 3'-endo. Se ha demostrado que la adición de ácidos nucleicos cerrados a los ARNsi aumenta la estabilidad en suero del ARNsi y reduce los efectos fuera del blanco (Elmen, J. *et al.*, (2005) *Nucleic Acids Research* 33(1): 439-447; Mook, O. *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 usar en los polinucleótidos de la invención incluyen, en un sentido no taxativo, nucleósidos que comprenden un puente entre los átomos 4' y 2' del anillo ribosilo. En determinadas formas de realización, los agentes de polinucleótidos antisentido de la invención incluyen uno o más nucleósidos bicíclicos que comprenden un puente entre los átomos 4' a 2'. Los ejemplos de dichos nucleósidos bicíclicos con un puente 4' a 2', incluyen, pero en un sentido no taxativo, 4'-(CH₂)—O-2' (LNA); 4'-(CH₂)—S-2'; 4'-(CH₂)₂—O-2' (ENA); 4'-CH(CH₃)—O-2' (también denominado de "etilo restringido" o "cEt") y 4'-CH(CH₂OCH₃)—O-2' (y análogos de los mismos; véase, por ejemplo, la Patente de los EEUU N°: 7.399.845); 4'-C(CH₃)(CH₃)—O-2' (y análogos de los mismos; véase por ejemplo, la Patente de los EEUU N°: 8.278.283); 4'-CH₂—N(OCH₃)-2' (y análogos de los mismos; véase por ejemplo, la Patente de los EEUU N°: 8.278.425); 4'-CH₂—O—N(CH₃)-2' (véase, por ejemplo, la publicación de Patente de los EEUU N°: 2004/0171570); 4'-CH₂—N(R)—O-2', en donde R es H, C₁-C₁₂ alquilo, o un grupo protector (véase, por ejemplo, la Patente de los EEUU N°: 7.427.672); 4'-CH₂—C(H)(CH₃)-2' (véase, por ejemplo, Chattopadhyaya *et al.*, *J. Org. Chem.*, 2009, 74, 118-134); y 4'-CH₂—C(=CH₂)-2' (y análogos de los mismos; véase, por ejemplo, la Patente de los EEUU N°:

8.278.426). El contenido completo de cada una de las publicaciones precedentes se incorpora en la presente a modo de referencia.

Las Patentes de los EEUU y las publicaciones de Patentes de los EEUU representativas adicionales que divulgan la preparación de ácidos nucleicos y nucleótidos cerrados incluyen, pero en un sentido no taxativo, las siguientes: Patente de los EEUU N°: 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, cuyos contenidos completos se incorporan en la presente a modo de referencia.

Cualquiera uno de los nucleósidos bicíclicos precedentes se puede preparar con una o más configuraciones estereoquímicas del azúcar incluyendo, por ejemplo, α -L-ribofuranosa y β -D-ribofuranosa (véase WO 99/14226).

El ARN de un ARNi también se puede modificar para que incluya uno o más etilnucleótidos restringidos. Según se usa en la presente, un "etilnucleótido restringido" o "cEt" es un ácido nucleico cerrado que comprende una unidad de azúcar bicíclico que comprende un puente 4'-CH(CH₃)-O-2'. En una forma de realización, un etilnucleótido restringido se encuentra en la conformación S denominado "S-cEt" en la presente.

Un ARNi de la invención también puede incluir uno o más "nucleótidos de conformación restringida" ("CRN"). Los CRN son análogos de nucleótido con un conector que une a los carbonos C2' y C4' de la ribosa o los carbonos C3 y -C5' de la ribosa. El CRN cierra el anillo ribosa en una conformación estable y aumenta la afinidad de hibridación con el ARNm. El conector es de

una longitud suficiente como para situar el oxígeno en una posición óptima para la estabilidad y afinidad dando como resultado menos deformación del anillo ribosa.

Las publicaciones representativas que divulgan la preparación de algunos de los CRN anotados precedentes incluyen, pero en un sentido no taxativo, la publicación de Patente de los EEUU N°: 2013/0190383; y la publicación PCT WO 2013/036868, cuyos contenidos completos se incorporan en la presente a modo de referencia.

Uno o más de los nucleótidos de un ARNi de la invención también puede incluir un nucleótido sustituido con hidroximetilo. Un “nucleótido sustituido con hidroximetilo” es un 2'-3'-seco-nucleótido acíclico, también conocida como una modificación de “ácido nucleico no cerrado” (“UNA”).

Las publicaciones de Patentes de los EEUU representativas que divulgan la preparación de UNA incluyen, pero en un sentido no taxativo, la Patente de los EEUU N°: 8.314.227; y las publicaciones de Patentes de los EEUU N°: 2013/0096289; 2013/0011922; y 2011/0313020, cuyos contenidos completos se incorporan en la presente a modo de referencia.

Las modificaciones potencialmente estabilizantes de los extremos de las moléculas de ARN pueden incluir N-(acetilaminocaproil)-4-hidroxiprolinol (Hip-C6-NHAc), N-(caproil-4-hidroxiprolinol (Hip-C6), N-(acetil-4-hidroxiprolinol (Hip-NHAc), timidina-2'-O-desoxitimidina (éter), N-(aminocaproil)-4-hidroxiprolinol (Hip-C6-amino), 2-docosanoil-uridina-3"-fosfato, base dT(idT) invertida y otras. La divulgación de esta modificación se puede consultar en la publicación PCT N°: WO 2011/005861.

A. ARNi modificados que comprenden motivos de la invención

En determinados aspectos de la invención, los agentes de ARNi de

hebra doble de la invención incluyen agentes con las modificaciones químicas divulgadas, por ejemplo, en la Solicitud de Patente Provisional de los EEUU N°: 61/561.710, presentada el 18 de noviembre, 2011, o en PCT/US2012/065691, presentada el 16 de noviembre, 2012, cuyos contenidos completos se incorporan en la presente a modo de referencia.

Según se muestra en la presente, en la Solicitud Provisional de Patente de los EE.UU. N°: 61/561.710 y en PCT/US2012/065691, se puede obtener una resultado superior con la introducción de uno o más motivos de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos en una hebra orientada en el sentido del marco de lectura y/o en una hebra antisentido de un agente de ARNi, en particular en o cerca del sitio de clivaje. En algunas formas de realización, por lo demás la hebra orientada en el sentido del marco de lectura y la hebra antisentido del agente de ARNi pueden modificarse por completo. La introducción de estos motivos interrumpe el patrón de modificación, si está presente, de la hebra orientada en el sentido del marco de lectura y/o de la hebra antisentido. El agente de ARNi se puede conjugar opcionalmente con un ligando derivado de GalNAc, por ejemplo en la hebra orientada en el sentido del marco de lectura. Los agentes de ARNi resultantes presentan una actividad superior de silenciamiento de genes.

Más específicamente, se ha descubierto sorprendentemente que cuando la hebra orientada en el sentido del marco de lectura y la hebra antisentido del agente de ARNi de hebra doble se modifican para contener uno o más motivos de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos en o cerca del sitio de clivaje de por lo menos una de las hebras de un agente de ARNi, la actividad de silenciamiento de genes del agente de ARNi era definitivamente

superior.

En una forma de realización, el agente de ARNi es un oligómero de extremos romos con extremos dobles de 19 nucleótidos de longitud, en donde la hebra orientada en el sentido del marco de lectura contiene por lo menos un motivo de tres modificaciones 2'-F en tres nucleótidos consecutivos en las posiciones 7, 8, 9 del extremo 5'. La hebra antisentido contiene por lo menos un motivo de tres modificaciones 2'-O-metilo en tres nucleótidos consecutivos en las posiciones 11, 12, 13 del extremo 5'.

En otra forma de realización, el agente de ARNi es un oligómero de extremos romos con extremos dobles de 20 nucleótidos de longitud, en donde la hebra orientada en el sentido del marco de lectura contiene por lo menos un motivo de tres modificaciones 2'-F en tres nucleótidos consecutivos en las posiciones 8, 9, 10 del extremo 5'. La hebra antisentido contiene por lo menos un motivo de tres modificaciones 2'-O-metilo en tres nucleótidos consecutivos en las posiciones 11, 12, 13 del extremo 5'.

En otra forma de realización, el agente de ARNi es un oligómero de extremos romos con extremos dobles de 21 nucleótidos de longitud, en donde la hebra orientada en el sentido del marco de lectura contiene por lo menos un motivo de tres modificaciones 2'-F en tres nucleótidos consecutivos en las posiciones 9, 10, 11 del extremo 5'. La hebra antisentido contiene por lo menos un motivo de tres modificaciones 2'-O-metilo en tres nucleótidos consecutivos en las posiciones 11, 12, 13 del extremo 5'.

En otra forma de realización, el agente de ARNi comprende una hebra orientada en el sentido del marco de lectura de 21 nucleótidos y una hebra antisentido de 23 nucleótidos, en donde la hebra orientada en el sentido del

marco de lectura contiene por lo menos un motivo de tres modificaciones 2'-F en tres nucleótidos consecutivos en las posiciones 9, 10, 11 del extremo 5'; la hebra antisentido contiene por lo 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 de ARNi es romo, mientras que el otro extremo comprende una sobreextensión de 2 nucleótidos. Preferiblemente, la sobreextensión de 2 nucleótidos se encuentra en el extremo 3' de la hebra antisentido. En este contexto, cuando la sobreextensión de 2 nucleótidos se encuentra en el extremo 3' de la hebra antisentido, puede haber dos enlaces de fosforotioato entre los tres nucleótidos en el extremo, dos de los cuales pueden constituir la sobreextensión, mientras que el tercero puede estar unido a uno de los nucleótidos de salientes. En una forma de realización, el agente de ARNi también comprende dos enlaces de fosforotioato entre los tres nucleótidos en el extremo 5' de la hebra orientada en el sentido del marco de lectura y entre los tres nucleótidos en el extremo 5' de la hebra antisentido. En una forma de realización, todos los nucleótidos en la hebra orientada en el sentido del marco de lectura y la hebra antisentido del agente de ARNi, incluyendo los nucleótidos que forman parte de los motivos, están modificados. En una forma de realización, todos los residuos están modificados de manera independiente con una unidad de 2'-O-metilo o de 3'-fluoro, por ejemplo, de manera alternada. Opcionalmente, el agente de ARNi también comprende un ligando (preferiblemente GalNAc₃).

En una forma de realización, el agente de ARNi comprende hebras sentido y antisentido, en donde el agente de ARNi comprende una primera hebra que tiene una longitud que es por lo menos 25 y como máximo 29

nucleótidos y una segunda hebra que tiene una longitud que es como máximo 30 nucleótidos con por lo menos un motivo de tres modificaciones 2'-O-metilo en tres nucleótidos consecutivos en las posiciones 11, 12, 13 del extremo 5'; en donde el extremo 3' de la primera hebra y el extremo 5' de la segunda hebra forman un extremo romo y la segunda hebra es entre 1 y 4 nucleótidos más larga en su extremo 3' que la primera hebra, en donde la región dúplex que tiene por lo menos 25 nucleótidos de longitud, y la segunda hebra es suficientemente complementaria con un ARNm blanco a lo largo de por lo menos 19 nucleótidos de longitud de la segunda hebra para reducir la expresión del gen blanco cuando el agente de ARNi se introduce en una célula de mamífero, y en donde el clivaje por *dicer* del agente de ARNi preferencialmente da como resultado un ARNip que comprende el extremo 3' de la segunda hebra, reduciendo de este modo la expresión del gen blanco en el mamífero. Opcionalmente, el agente de ARNi además comprende un ligando.

En una forma de realización, la hebra orientada en el sentido del marco de lectura del agente de ARNi contiene por lo menos un motivo de tres modificaciones idénticas en los tres nucleótidos consecutivos, en donde uno de los motivos puede estar en el sitio de clivaje en la hebra orientada en el sentido del marco de lectura.

En una forma de realización, la hebra antisentido del agente de ARNi también puede contener por lo menos un motivo de tres modificaciones idénticas en los tres nucleótidos consecutivos, en donde uno de los motivos puede estar en o cerca del sitio de clivaje en la hebra antisentido.

Para el agente de ARNi que tiene una región dúplex de entre 17 y 23

nucleótidos de longitud, el sitio de clivaje de la hebra antisentido está típicamente alrededor de 10, 11 y 12 posiciones del extremo 5'. Por lo tanto los motivos de tres modificaciones idénticas pueden estar en las posiciones 9, 10, 11; posiciones 10, 11, 12; posiciones 11, 12, 13; posiciones 12, 13, 14; o posiciones 13, 14, 15 de la hebra antisentido, iniciando el conteo a partir del 1^{er} nucleótido del extremo 5' de la hebra antisentido, o, iniciando el conteo a partir del 1^{er} nucleótido apareado en la región dúplex del extremo 5' de la hebra antisentido. El sitio de clivaje en la hebra antisentido también puede cambiar de acuerdo a la longitud de la región dúplex del ARNi del extremo 5'.

La hebra orientada en el sentido del marco de lectura del agente de ARNi puede contener por lo menos un motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos en el sitio de clivaje de la hebra; y la hebra antisentido puede tener por lo menos un motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos en o cerca del sitio de clivaje de la hebra. Cuando la hebra orientada en el sentido del marco de lectura y la hebra antisentido forman un ARNcd dúplex, la hebra orientada en el sentido del marco de lectura y la hebra antisentido pueden estar tan alineadas que un motivo de los tres nucleótidos en la hebra orientada en el sentido del marco de lectura y un motivo de los tres nucleótidos en la hebra antisentido tienen por lo menos una superposición de un nucleótido, es decir, por lo menos uno de los tres nucleótidos del motivo en la hebra orientada en el sentido del marco de lectura forma un par de bases con por lo menos uno de los tres nucleótidos del motivo en la hebra antisentido. Como alternativa, por lo menos dos nucleótidos pueden superponerse, o los tres nucleótidos pueden superponerse.

En una forma de realización, la hebra orientada en el sentido del marco

de lectura del agente de ARNi puede contener más de un motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos. El primer motivo puede estar en o cerca del sitio de clivaje de la hebra y los otros motivos pueden ser modificaciones por extensión. El término “modificación por extensión” en la presente hace referencia a un motivo que puede estar en otra porción de la hebra que está separada del motivo en o cerca del sitio de clivaje de la misma hebra. La modificación por extensión está adyacente al primer motivo o está separada por lo menos uno o más. Cuando los motivos son inmediatamente adyacentes entre sí, la química de los motivos es diferente una de la otra y cuando los motivos están separados por uno o más nucleótidos, las químicas pueden ser las mismas o diferentes. Puede haber dos o más modificaciones por extensión. Por ejemplo, cuando hay dos modificaciones por extensión, cada modificación por extensión puede estar en un extremo con relación al primer motivo que está en o cerca del sitio de clivaje o en cualquier lado del motivo líder.

Al igual que la hebra orientada en el sentido del marco de lectura, la hebra antisentido del agente de ARNi puede contener más de un motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos, donde por lo menos uno de los motivos presentes en o cerca del sitio de clivaje de la hebra. Esta hebra antisentido también puede contener una o más modificaciones por extensión con un alineamiento similar a las modificaciones por extensión que pueden estar presentes en la hebra orientada en el sentido del marco de lectura.

En una forma de realización, la modificación por extensión en la hebra orientada en el sentido del marco de lectura o hebra antisentido del agente de

ARNi típicamente no incluye los primeros uno o dos nucleótidos terminales en el extremo 3', 5' o ambos extremos de la hebra.

En otra forma de realización, la modificación por extensión en la hebra orientada en el sentido del marco de lectura o hebra antisentido del agente de ARNi típicamente no incluye el primero o dos nucleótidos apareados en la región dúplex en el extremo 3', extremo 5' o ambos extremos de la hebra.

Cuando la hebra orientada en el sentido del marco de lectura y la hebra antisentido del agente de ARNi contienen cada una por lo menos una modificación por extensión, las modificaciones por extensión pueden caer en el mismo extremo de la región dúplex, y pueden tener una superposición de uno, dos o tres nucleótidos.

Cuando la hebra orientada en el sentido del marco de lectura y la hebra antisentido del agente de ARNi contienen cada una por lo menos dos modificaciones por extensión, la hebra orientada en el sentido del marco de lectura y la hebra antisentido pueden ser alineadas tanto que dos modificaciones cada una de una hebra caigan en un extremo de la región dúplex, que tiene una superposición de uno, dos o tres nucleótidos; dos modificaciones una de cada hebra caiga en el otro extremo de la región dúplex, que tiene una superposición de uno, dos o tres nucleótidos; dos modificaciones en una hebra caen a cada lado del motivo líder, que tiene una superposición de uno, dos o tres nucleótidos en la región dúplex.

En una forma de realización, cada nucleótido en la hebra orientada en el sentido del marco de lectura y hebra antisentido del agente de ARNi, que incluye los nucleótidos que son parte de los motivos, puede ser modificado. Cada nucleótido se puede modificar con la misma modificación o diferente que

puede incluir una o más alteraciones de uno o ambos de los oxígenos de fosfato que no se une y/o de uno o más oxígenos de fosfato que se une; alteración de un constituyente del azúcar ribosa, por ejemplo, del hidroxilo 2' en el azúcar ribosa; el reemplazo general del grupo fosfato por conectores “desfosfo”; modificación o reemplazo de una base de origen natural; y reemplazo o modificación de la estructura ribosa-fosfato.

Debido a que los ácidos nucleicos son polímeros de subunidades, muchas de las modificaciones se producen en una posición que se repite en un ácido nucleico, por ejemplo, una modificación de una base, o un grupo fosfato, o un O no conector de un grupo fosfato. En algunos casos la modificación se producirá en todas las posiciones del sujeto en el ácido nucleico pero en muchos casos no ocurrirá. A modo de ejemplo, una modificación puede sólo ocurrir en una posición 3' o 5' terminal, puede sólo ocurrir en una región terminal, por ejemplo, en una posición en un nucleótido terminal o en los últimos 2, 3, 4, 5, o 10 nucleótidos de una hebra. Una modificación puede ocurrir en una región de hebra doble, una región de simple hebra, o en ambas. Una modificación puede ocurrir sólo en la región de hebra doble de un ARN o puede sólo ocurrir en una región de simple hebra de un ARN. Por ejemplo, una modificación fosforotioato en una posición de O no conector puede sólo ocurrir en uno o ambos extremos, puede sólo ocurrir en una región terminal, por ejemplo, en una posición en un nucleótido terminal o en los últimos 2, 3, 4, 5, o 10 nucleótidos de una hebra, o puede ocurrir en las regiones de hebra doble o simple hebra, particularmente en el extremo terminal. Los extremos 5' pueden estar fosforilados.

Sería posible, por ejemplo, mejorar la estabilidad, incluir bases

particulares en sobreextensiones, o incluir nucleótidos modificados o nucleótidos sustitutos, en sobreextensiones de simple hebra, por ejemplo, en una sobreextensión 5' o 3', o en ambas. Por ejemplo, puede ser deseable incluir nucleótidos de purina en las sobreextensiones. En algunas formas de realización todas o algunas de las bases en una sobreextensión 3' o 5' pueden ser modificadas, por ejemplo, con una modificación descrita en la presente. Las modificaciones pueden incluir, por ejemplo, el uso de modificaciones en la posición 2' del azúcar ribosa con modificaciones que son conocidas en el arte, por ejemplo, el uso de desoxirribonucleótidos, 2'-desoxi-2'-fluoro (2'-F) o 2'-O-metilo modificados en lugar del riboazúcar de la nucleobase, y modificaciones en el grupo fosfato, por ejemplo, modificaciones fosforotioato. Las sobreextensiones no necesitan ser homólogas con la secuencia blanco.

En una forma de realización, cada residuo de la hebra orientada en el sentido del marco de lectura y hebra antisentido se modifica de manera independiente con LNA, HNA, CeNA, 2'-metoxietilo, 2'-O-metilo, 2'-O-alilo, 2'-C-alilo, 2'-desoxi, 2'-hidroxilo o 2'-fluoro. Las hebras pueden contener más de una modificación. En una forma de realización, cada residuo de la hebra orientada en el sentido del marco de lectura y hebra antisentido está modificada de manera independiente con 2'-O-metilo o 2'-fluoro.

Típicamente hay por lo menos dos modificaciones diferentes en la hebra orientada en el sentido del marco de lectura y hebra antisentido. Aquellas dos modificaciones pueden ser las modificaciones 2'-O-metilo o 2'-fluoro, u otras.

En una forma de realización, la N_a y/o N_b comprenden modificaciones de un patrón alternante. El término “motivo alternante” según se usa en la presente hace referencia a un motivo que tiene una o más modificaciones, en

donde cada modificación se produce en nucleótidos alternados de una hebra. El nucleótido alternado puede hacer referencia a uno cada otro nucleótido o uno 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.

El tipo de modificaciones contenidas en el motivo alternante puede ser el mismo o diferente. Por ejemplo, si cada uno de A, B, C, D representa un tipo de modificación en el nucleótido, el patrón alternante, es decir, modificaciones en los nucleótidos por medio, pueden ser las mismas, pero cada una de las hebra orientada en el sentido del marco de lectura o hebra antisentido se pueden seleccionar de varias posibilidades de modificaciones en el motivo alternante tal como “ABABAB...”, “ACACAC...” “BDBDBD...” o “CDCDCD...”, etc.

En una forma de realización, el agente de ARNi de la invención comprende el patrón de modificación para el motivo alternante en la hebra orientada en el sentido del marco de lectura está desplazado en relación al patrón de modificación para el motivo alternante en la hebra antisentido. El desplazamiento puede ser tal que el grupo modificado de nucleótidos de la hebra orientada en el sentido del marco de lectura corresponde a un grupo diferencialmente modificado de nucleótidos de la hebra antisentido y viceversa. Por ejemplo, cuando se aparea la hebra orientada en el sentido del marco de lectura con la hebra antisentido en el dúplex de ARNcd, el motivo alternante en la hebra orientada en el sentido del marco de lectura puede comenzar con

“ABABAB” de 5'-3' de la hebra y el motivo alternante en la hebra antisentido puede comenzar con “BABABA” de 5'-3' de la hebra en la región dúplex. Como otro ejemplo, el motivo alternante en la hebra orientada en el sentido del marco de lectura puede comenzar con “AABBAABB” de 5'-3' de la hebra y el motivo alternante en la hebra antisentido puede comenzar con “BBAABBAA” de 5'-3' de la hebra en la región dúplex, de modo que hay un desplazamiento completo o parcial de los patrones de modificación entre la hebra orientada en el sentido del marco de lectura y la hebra antisentido.

En una forma de realización, el agente de ARNi comprende el patrón del motivo alternante de la modificación 2'-O-metilo y modificación 2'-F en la hebra orientada en el sentido del marco de lectura inicialmente que tiene un desplazamiento en relación al patrón del motivo alternante de la modificación 2'-O-metilo y la modificación 2'-F en la hebra antisentido inicialmente, es decir, el nucleótido modificado con 2'-O-metilo en la hebra orientada en el sentido del marco de lectura tiene un apareamiento de bases con un nucleótido modificado con 2'-F en la hebra antisentido y viceversa. La posición 1 de la hebra orientada en el sentido del marco de lectura puede comenzar con la modificación 2'-F, y la posición 1 de la hebra antisentido puede comenzar con la modificación 2'-O-metilo.

La introducción de uno o más motivos de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos en la hebra orientada en el sentido del marco de lectura y/o hebra antisentido interrumpe el patrón de modificación inicial presente en la hebra orientada en el sentido del marco de lectura y/o hebra antisentido. Esta interrupción del patrón de modificación de la hebra orientada en el sentido del marco de lectura y/o antisentido por introducción de uno o

más motivos de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos en la hebra orientada en el sentido del marco de lectura y/o antisentido sorprendentemente mejora la actividad silenciadora de genes sobre el gen blanco.

En una forma de realización, cuando se introduce el motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos a cualquiera de las hebras, la modificación del nucleótido siguiente al motivo es una modificación diferente de la modificación del motivo. Por ejemplo, la porción de la secuencia que contiene el motivo es "...N_aYYYN_b...", en donde "Y" representa la modificación del motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos, y "N_a" y "N_b" representan una modificación del nucleótido siguiente al motivo "YYY" que es diferente de la modificación de Y, y en donde N_a y N_b pueden ser las mismas o diferentes. Como alternativa, N_a y/o N_b pueden estar presentes o ausentes cuando hay presente una modificación por extensión.

El agente de ARNi además puede comprender por lo menos una unión internucleótido fosforotioato o metilfosfonato. La modificación de la unión internucleótido fosforotioato o metilfosfonato puede ocurrir en cualquier nucleótido de la hebra orientada en el sentido del marco de lectura o hebra antisentido o ambas en cualquier posición de la hebra. Por ejemplo, la modificación de la unión internucleótido puede ocurrir en cualquier nucleótido en la hebra orientada en el sentido del marco de lectura y/o hebra antisentido; cada modificación de unión internucleótido puede ocurrir en un patrón alternante sobre la hebra orientada en el sentido del marco de lectura o hebra antisentido; y/o la hebra orientada en el sentido del marco de lectura o hebra

antisentido pueden contener las dos modificaciones de unión internucleótido en un patrón alternante. El patrón alternante de la modificación de unión internucleótido en la hebra orientada en el sentido del marco de lectura puede ser el mismo o diferente de la hebra antisentido, y el patrón alternante de la modificación de unión internucleótido en la hebra orientada en el sentido del marco de lectura puede tener un desplazamiento en relación al patrón alternante de la modificación de unión internucleótido en la hebra antisentido.

En una forma de realización, el ARNi comprende la modificación de unión internucleótido fosforotioato o metilfosfonato en la región sobreextendida. Por ejemplo, la región sobreextendida puede contener dos nucleótidos que tiene una unión internucleótido fosforotioato o metilfosfonato entre los dos nucleótidos. Las modificaciones de unión Internucleótido también pueden ser hechas para unir los nucleótidos de la sobreextensión con los nucleótidos apareados terminales en la región dúplex. Por ejemplo, por lo menos 2, 3, 4, o todos los nucleótidos de la sobreextensión pueden estar unidos por medio de una unión internucleótido fosforotioato o metilfosfonato, y opcionalmente, puede haber uniones adicionales internucleótido fosforotioato o metilfosfonato que unan el nucleótido de la sobreextensión con un nucleótido apareado que es próximo al nucleótido de la sobreextensión. Por ejemplo, puede haber por lo menos dos uniones internucleótido fosforotioato entre los tres nucleótidos terminales, en donde dos de los tres nucleótidos son nucleótidos sobreextendidos, y el tercero es un nucleótido apareado próximo al nucleótido de la sobreextensión. Estos tres nucleótidos terminales pueden estar en el extremo 3' de la hebra antisentido, en el extremo 5' de la hebra antisentido y/o en el extremo 5' de la hebra orientada en el sentido del marco de lectura.

En una forma de realización, la sobreextensión de 2 nucleótidos se encuentra en el extremo 3' de la hebra antisentido y hay dos enlaces de fosforotioato entre los tres nucleótidos en el extremo, dos de los cuales pueden constituir la sobreextensión, mientras que el tercero puede estar unido a uno de los nucleótidos de salientes. Opcionalmente, el agente de ARNi también puede comprender dos enlaces de fosforotioato entre los tres nucleótidos en el extremo 5' de la hebra orientada en el sentido del marco de lectura y entre los tres nucleótidos en el extremo 5' de la hebra antisentido.

En una forma de realización, el agente de ARNi comprende no coincidencia(s) con el blanco, con el dúplex, o combinaciones de los mismos. Una “coincidencia errónea” puede comprender un apareamiento de bases no canónico o un apareamiento de nucleótidos distinto del canónico. La no coincidencia se puede producir en la región de sobreextensión o la región dúplex. El par de bases puede ser clasificado en base a su tendencia para promover la disociación o fusión (por ejemplo, en la energía libre de asociación o disociación de un apareamiento particular, la estrategia más simple es examinar los pares en base a un par individual, aunque también se puede usar análisis del vecino próximo o similar). En términos de promover la disociación: se prefiere A:U respecto a G:C; se prefiere G:U respecto a G:C; y se prefiere I:C respecto a G:C (I=inosina). Se prefieren las no coincidencias, por ejemplo, apareamientos no canónicos u otros diferentes de los canónicos (como se describe en otra parte en la presente) respecto a apareamientos canónicos (A:T, A:U, G:C); y se prefieren los apareamientos que incluyen una base universal respecto a apareamientos canónicos. Una “base universal” es una base que puede reemplazar cualquiera de las cuatro bases normales (G, C, A y

U) sin desestabilizar significativamente las interacciones de pares de bases vecinos o sin interrumpir la utilidad bioquímica funcional esperada del oligonucleótido modificado. Los ejemplos no limitantes de bases universales incluyen 2'-desoxiinosina (hipoxantina desoxinucleótido) o sus derivados, análogos nitroazol y bases hidrofóbicas, aromáticas que no forman puentes de hidrógeno.

En una forma de realización, el agente de ARNi comprende por lo menos uno de los primeros 1, 2, 3, 4 ó 5 pares de bases en las regiones dúplex del extremo 5' de la hebra antisentido que se pueden seleccionar de manera independiente del grupo de: A:U, G:U, I:C, y pares de no coincidencias, por ejemplo, apareamientos no canónicos u otros diferentes de los canónicos o apareamientos que incluyen una base universal, para promover la disociación de la hebra antisentido en el extremo 5' del dúplex.

En una forma de realización, el nucleótido en la posición 1 en la región dúplex del extremo 5' en la hebra antisentido se selecciona del grupo que consiste en A, dA, dU, U, y dT. Como alternativa, por lo menos uno de los primeros 1, 2 ó 3 pares de bases en la región dúplex del extremo 5' de la hebra antisentido es un par de bases AU. Por ejemplo, el primer par de bases en la región dúplex del extremo 5' de la hebra antisentido es un par de bases AU.

En otra forma de realización, el nucleótido del extremo 3' de la hebra orientada en el sentido del marco de lectura es desoxitimina (dT). En otra forma de realización, el nucleótido del extremo 3' de la hebra antisentido es desoxitimina (dT). En una forma de realización, hay una secuencia corta de nucleótidos con desoxitimina, por ejemplo, dos nucleótidos dT en el extremo 3' de la hebra orientada en el sentido del marco de lectura y/o de la hebra

antisentido.

En una forma de realización, la secuencia de la hebra orientada en el sentido del marco de lectura se puede representar por la fórmula (I):



en donde:

i y j son cada uno de manera independiente 0 ó 1;

p y q son cada uno de manera independiente 0-6;

cada N_a representa de manera independiente una secuencia de oligonucleótidos que comprende entre 0 y 25 nucleótidos modificados, en donde cada secuencia comprende por lo menos dos nucleótidos diferentemente modificados;

cada N_b representa de manera independiente una secuencia de oligonucleótidos que comprende entre 0 y 10 nucleótidos modificados;

cada n_p y n_q representan de manera independiente un nucleótido de sobreextensión;

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

XXX, YYY y ZZZ representan cada uno de manera independiente un motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos. Preferentemente, YYY son todos nucleótidos modificados con 2'-F.

En una forma de realización, los N_a y/o N_b comprenden modificaciones de patrón alternante.

En una forma de realización, el motivo YYY se encuentra en o cerca del sitio de clivaje de la hebra orientada en el sentido del marco de lectura. Por ejemplo, cuando el agente de ARNi tiene una región dúplex de entre 17 y 23 nucleótidos de longitud, el motivo YYY se puede encontrar en o en la vecindad

del sitio de clivaje (por ejemplo: se puede encontrar en las posiciones 6, 7, 8, 7, 8, 9, 8, 9, 10, 9, 10, 11, 10, 11, 12 u 11, 12, 13) de la hebra orientada en el sentido del marco de lectura, donde el conteo comienza a partir del 1^{er} nucleótido, del extremo 5'; u opcionalmente, el conteo comienza a partir del 1^{er} nucleótido apareado en la región dúplex, del extremo 5'.

En una forma de realización, i es 1 y j es 0, o i es 0 y j es 1, o ambos i y j son 1. La hebra orientada en el sentido del marco de lectura puede estar representada entonces por las siguientes fórmulas:

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

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

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

Cuando la hebra orientada en el sentido del marco de lectura está representada por la fórmula (lb), N_b representa una secuencia de oligonucleótidos que comprende entre 0 y 10, entre 0 y 7, entre 0 y 5, entre 0 y 4, entre 0 y 2 ó 0 nucleótidos modificados. Cada N_a puede representar de manera independiente una secuencia de oligonucleótidos que comprende entre 2 y 20, entre 2 y 15, o entre 2 y 10 nucleótidos modificados.

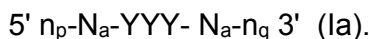
Cuando la hebra orientada en el sentido del marco de lectura está representada por la fórmula (lc), N_b representa una secuencia oligonucleotídica que comprende entre 0 y 10, entre 0 y 7, entre 0 y 10, entre 0 y 7, entre 0 y 5, entre 0 y 4, entre 0 y 2 ó 0 nucleótidos modificados. Cada N_a puede representar de manera independiente una secuencia oligonucleotídica que comprende entre 2 y 20, entre 2 y 15, o entre 2 y 10 nucleótidos modificados.

Cuando la hebra orientada en el sentido del marco de lectura está representada por la fórmula (ld), cada N_b representa de manera independiente

una secuencia oligonucleotídica que comprende entre 0 y 10, entre 0 y 7, entre 0 y 5, entre 0 y 4, entre 0 y 2 ó 0 nucleótidos modificados. Preferentemente, N_b es 0, 1, 2, 3, 4, 5 ó 6. Cada N_a puede representar de manera independiente una secuencia oligonucleotídica que comprende entre 2 y 20, entre 2 y 15, o entre 2 y 10 nucleótidos modificados.

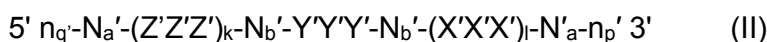
Cada uno de X, Y y Z pueden ser iguales o diferentes entre sí.

En otras formas de realización, i es 0 y j es 0, y la hebra orientada en el sentido del marco de lectura puede tener la fórmula:



Cuando la hebra orientada en el sentido del marco de lectura tiene la fórmula (Ia), cada N_a puede representar de manera independiente una secuencia oligonucleotídica que comprende 2-20, 2-15 ó 2-10 nucleótidos modificados.

En una forma de realización, la secuencia de la hebra antisentido del ARNi puede estar representada por la fórmula (II):



en donde:

k y l son cada uno de manera independiente 0 ó 1;

p' y q' son cada uno de manera independiente 0-6;

cada N_a' representa de manera independiente una secuencia oligonucleotídica que comprende entre 0 y 25 nucleótidos modificados, en donde cada secuencia comprende por lo menos dos nucleótidos diferentemente modificados;

cada N_b' representa de manera independiente una secuencia oligonucleotídica que comprende entre 0 y 10 nucleótidos modificados;

cada n_p' y n_q' representa de manera independiente un nucleótido de sobreextensión;

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

y

$X'X'X'$, $Y'Y'Y'$ y $Z'Z'Z'$ representan cada uno de manera independiente un motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos;

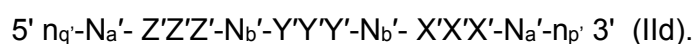
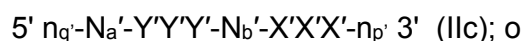
En una forma de realización, los N_a' y/o N_b' comprenden modificaciones de patrón alternado.

El motivo $Y'Y'Y'$ puede estar en o cerca del sitio de clivaje de la hebra antisentido. Por ejemplo, cuando el agente de ARNi tiene una región dúplex de entre 17 y 23 nucleótidos de longitud, el motivo $Y'Y'Y'$ puede estar en las posiciones 9, 10, 11; 10, 11, 12; 11, 12, 13; 12, 13, 14; o 13, 14, 15 de la hebra antisentido, con el conteo comenzando a partir del 1^{er} nucleótido, del extremo 5'; u opcionalmente, donde el conteo comienza a partir del 1^{er} nucleótido apareado en la región dúplex, del extremo 5'. Preferentemente, el motivo $Y'Y'Y'$ puede estar en las posiciones 11, 12, 13.

En una forma de realización, el motivo $Y'Y'Y'$ son todos nucleótidos modificados con 2'-OMe.

En una forma de realización, k es 1 y l es 0, o k es 0 y l es 1, o ambos k y l son 1.

La hebra antisentido puede estar representada entonces por las siguientes fórmulas:

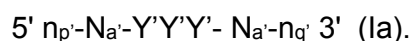


Cuando la hebra antisentido está representada por la fórmula (IIb), N_b' representa una secuencia oligonucleotídica que comprende entre 0 y 10, entre 0 y 7, entre 0 y 10, entre 0 y 7, entre 0 y 5, entre 0 y 4, entre 0 y 2 ó 0 nucleótidos modificados. Por otro lado, cada N_a' puede representar de manera independiente una secuencia oligonucleotídica que comprende 2-20, 2-15 ó 2-10 nucleótidos modificados.

Cuando la hebra antisentido tiene la fórmula (IIc), N_b' representa una secuencia oligonucleotídica que comprende 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 ó 0 nucleótidos modificados. Por otro lado, cada N_a' puede representar de manera independiente una secuencia oligonucleotídica que comprende 2-20, 2-15 ó 2-10 nucleótidos modificados.

Cuando la hebra antisentido está representada por la fórmula (IId), cada N_b' representa de manera independiente una secuencia oligonucleotídica que comprende 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 ó 0 nucleótidos modificados. Por otro lado, cada N_a' puede representar de manera independiente una secuencia oligonucleotídica que comprende 2-20, 2-15 ó 2-10 nucleótidos modificados. Preferiblemente, N_b es 0, 1, 2, 3, 4, 5 ó 6.

En otras formas de realización, k es 0, l es 0 y la hebra antisentido se puede representar con la fórmula:



Cuando la hebra orientada en el sentido del marco de lectura tiene la fórmula (Ia), cada N_a' puede representar de manera independiente una secuencia oligonucleotídica que comprende 2-20, 2-15 ó 2-10 nucleótidos modificados.

Cada uno de X' , Y' y Z' pueden ser iguales o diferentes entre sí.

Cada nucleótido de la hebra orientada en el sentido del marco de lectura y la hebra antisentido puede estar modificado de manera independiente con LNA, HNA, CeNA, 2'-metoxietilo, 2'-O-metilo, 2'-O-alilo, 2'-C- alilo, 2'-hidroxilo o 2'-fluoro. Por ejemplo, cada nucleótido de la hebra orientada en el sentido del marco de lectura y hebra antisentido está modificado de manera independiente con 2'-O-metilo o 2'-fluoro. Cada X, Y, Z, X', Y' y Z', en particular, puede representar una modificación 2'-O-metilo o una modificación 2'-fluoro.

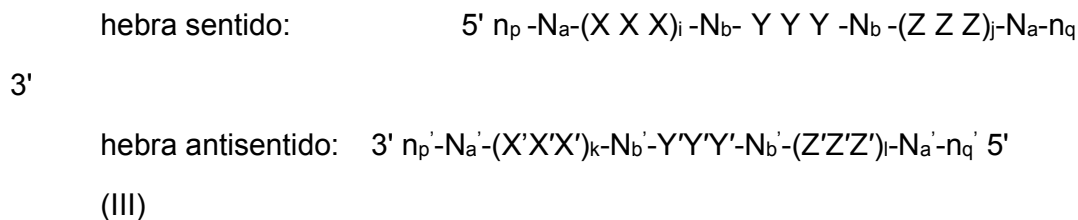
En una forma de realización, la hebra orientada en el sentido del marco de lectura del agente de ARNi puede contener el motivo YYY ocurriendo en las posiciones 9, 10 y 11 de la hebra cuando la región dúplex tiene 21 nucleótidos, el conteo comenzando a partir del 1^{er} nucleótido del extremo 5', u opcionalmente, el conteo comenzando a partir del 1^{er} nucleótido apareado en la región dúplex, del extremo 5'; e Y representa la modificación 2'-F. La hebra orientada en el sentido del marco de lectura puede contener además un motivo XXX o motivos ZZZ como modificaciones por extensión en el extremo opuesto de la región dúplex; y XXX y ZZZ representan cada uno en forma independiente una modificación 2'-OMe o una modificación 2'-F.

En una forma de realización la hebra antisentido puede contener un motivo Y'Y'Y' en las posiciones 11, 12, 13 de la hebra, comenzando la cuenta a partir del 1^o nucleótido desde el extremo 5', opcionalmente, comenzando la cuenta a partir del 1^o nucleótido apareado dentro de la región dúplex, desde el extremo 5'; e Y' representa una modificación 2'-O-metilo. La hebra antisentido además puede contener un motivo X'X'X' o motivos Z'Z'Z' como modificaciones por extensión en el extremo opuesto de la región dúplex; y cada X'X'X' y Z'Z'Z' representa en forma independiente una modificación 2'-OMe o una

modificación 2'-F.

La hebra orientada en el sentido del marco de lectura representada por una de las fórmulas anteriores (Ia), (Ib), (Ic) y (Id) forma un dúplex con una hebra antisentido representada por cualquiera de las fórmulas (IIa), (IIb), (IIc) y (IIId), respectivamente.

Por consiguiente, los agentes de ARNi que se pueden usar en los métodos de la invención pueden comprender una hebra orientada en el sentido del marco de lectura y una hebra antisentido, en donde cada hebra tiene entre 14 y 30 nucleótidos, en donde el dúplex de ARNi está representado por la fórmula (III):



en donde:

i, j, k y l son cada uno de manera independiente 0 ó 1;

p, p', q y q' son cada uno de manera independiente 0-6;

cada N_a y $N_{a'}$ representan de manera independiente una secuencia oligonucleotídica que comprende entre 0 y 25 nucleótidos modificados, en donde cada secuencia comprende por lo menos dos nucleótidos modificados de manera diferente;

cada uno de N_b y $N_{b'}$ representa en forma independiente una secuencia oligonucleotídica que comprende entre 0 y 10 nucleótidos modificados;

en donde

cada uno de $n_{p'}$, n_p , $n_{q'}$, y n_q , uno de los cuales puede o no estar

presente, representa en forma independiente un nucleótido sobreextendido; y

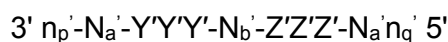
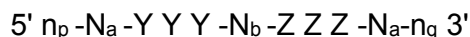
XXX, YYY, ZZZ, X'X'X', Y'Y'Y' y Z'Z'Z' representan cada uno de manera independiente un motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos;

En una forma de realización, i es 0 y j es 0; o i es 1 y j es 0; o i es 0 y j es 1; o tanto i como j son 0; o ambos i y j son 1. En otra forma de realización, k es 0 y l es 0; o k es 1 y l es 0; k es 0 e l es 1; o tanto k como l son 0; o ambos k y l son 1.

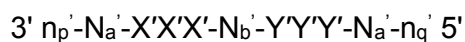
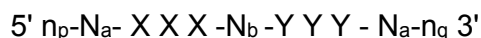
Los ejemplos de combinaciones de la hebra orientada en el sentido del marco de lectura y de la hebra antisentido que forman un dúplex de ARNi incluyen las siguientes fórmulas:



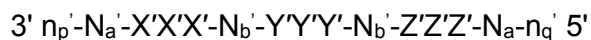
(IIIa)



(IIIb)



(IIIc)



(IIId)



(IIIe)

Cuando el agente de ARNi está representado por la fórmula (IIIa), cada N_a representa en forma independiente una secuencia oligonucleotídica que comprende entre 2 y 20, entre 2 y 15, o entre 2 y 10 nucleótidos modificados.

Cuando el agente de ARNi se representa con la fórmula (IIIb), cada N_b , representa en forma independiente una secuencia oligonucleotídica que comprende entre 1 y 10, entre 1 y 7, entre 1 y 5, o entre 1 y 4 nucleótidos modificados. Cada N_a representa de manera independiente una secuencia oligonucleotídica que comprende 2-20, 2-15 ó 2-10 nucleótidos modificados.

Cuando el agente de ARNi se representa como la fórmula (IIIc), cada N_b , N_b' representa en forma independiente una secuencia oligonucleotídica que comprende entre 0 y 10, entre 0 y 7, entre 0 y 10, entre 0 y 7, entre 0 y 5, entre 0 y 4, entre 0 y 2 o 0 nucleótidos modificados. Cada N_a representa de manera independiente una secuencia oligonucleotídica que comprende 2-20, 2-15 ó 2-10 nucleótidos modificados.

Cuando el agente de ARNi tiene la fórmula (IIId), cada uno de N_b y N_b' representa de manera independiente una secuencia oligonucleotídica que comprende 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 ó 0 nucleótidos modificados. Cada uno de N_a , N_a' representa en forma independiente una secuencia oligonucleotídica que comprende entre 2 y 20, entre 2 y 15, o entre 2 y 10 nucleótidos modificados. Cada uno de N_a , N_a' , N_b y N_b' comprende en forma independiente modificaciones de patrón alternante.

Cuando el agente de ARNi tiene la fórmula (IIId), cada uno de N_b y N_b' representa de manera independiente una secuencia oligonucleotídica que comprende 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 ó 0 nucleótidos modificados.

Cada uno de N_a , N_a' representa en forma independiente una secuencia oligonucleotídica que comprende entre 2 y 20, entre 2 y 15, o entre 2 y 10 nucleótidos modificados. Cada uno de N_a , N_a' , N_b y N_b' comprende en forma independiente modificaciones de patrón alternante.

Cuando el agente de ARNi se representa como la fórmula (IIIe), cada N_a y N_a' representa de manera independiente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 0-25 nucleótidos que están modificados o no modificados, o combinaciones de los mismos, donde cada secuencia comprende por lo menos dos nucleótidos modificados de manera diferente.

Cada uno de X, Y y Z en las fórmulas (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc), (IIId) y (IIIe) puede ser igual o diferente uno del otro.

Cuando el agente de ARNi está representado por la fórmula (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc), (IIId) y (IIIe), por lo menos uno de los nucleótidos Y puede formar un par de bases con uno de los nucleótidos Y'. Como alternativa, por lo menos dos de los nucleótidos Y forma 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 de ARNi está representado por la fórmula (IIIb) o (IIId), por lo menos uno de los nucleótidos Z puede formar un par de bases con uno de los nucleótidos Z'. Como alternativa, por lo 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 de ARNi se representa como la fórmula (IIIc) o (IIId), por lo menos uno de los nucleótidos X puede formar un par de bases con uno

de los nucleótidos X'. Como alternativa, por lo 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 forma de realización, la modificación del nucleótido Y es diferente de la modificación sobre el nucleótido Y', la modificación sobre el nucleótido Z es diferente de la modificación sobre el nucleótido Z', y/o la modificación sobre el nucleótido X es diferente de la modificación sobre el nucleótido X'.

En una forma de realización, cuando el agente de ARNi tiene la fórmula (IIId), las modificaciones en N_a son modificaciones de 2'-O-metilo o de 2'-fluoro. En otra forma de realización, cuando el agente de ARNi tiene la fórmula (IIId), las modificaciones en N_a son modificaciones de 2'-O-metilo o de 2'-fluoro, n_p' tiene un valor superior a 0 y por lo menos un n_p' está unido a un nucleótido cercano a través de un enlace de fosforotioato. En aun otra forma de realización, cuando el agente de ARNi tiene la fórmula (IIId), las modificaciones en N_a son modificaciones de 2'-O-metilo o de 2'-fluoro, n_p' tiene un valor superior a 0, por lo menos un n_p' está unido a un nucleótido cercano a través de un enlace de fosforotioato y la hebra orientada en el sentido del marco de lectura está conjugada con uno o más derivados de GalNAc, que están unidos por medio de conectores monovalentes, bivalentes o trivalentes ramificados. En otra forma de realización, cuando el agente de ARNi tiene la fórmula (IIId), las modificaciones en N_a son modificaciones de 2'-O-metilo o de 2'-fluoro, n_p' tiene un valor superior a 0, por lo menos un n_p' está unido a un nucleótido cercano a través de un enlace de fosforotioato y la hebra orientada en el

sentido del marco de lectura comprende por lo menos un enlace fosforotioato y está conjugada con uno o más derivados de GalNAc, que están unidos por medio de un conector monovalente, bivalente o trivalente ramificado.

En una forma de realización, cuando el agente de ARNi tiene la fórmula (IIIa), las modificaciones en N_a son modificaciones de 2'-O-metilo o de 2'-fluoro, n_p tiene un valor superior a 0, por lo menos un n_p está unido a un nucleótido cercano a través de un enlace de fosforotioato y la hebra orientada en el sentido del marco de lectura comprende por lo menos un enlace fosforotioato y está conjugada con uno o más derivados de GalNAc, que están unidos por medio de un conector monovalente, bivalente o trivalente ramificado.

En una forma de realización, el agente de ARNi es un multímero que contiene por lo menos dos dúplex que están representados por la fórmula (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc), (IIId) y (IIIE), en donde los dúplex se conectan mediante un conector. El conector puede ser clivable o no clivable. Opcionalmente, el multímero además comprende un ligando. Cada uno de los dúplex se puede dirigir al mismo gen o a dos genes diferentes; o cada uno de los dúplex puede dirigirse al mismo gen en dos sitios blanco diferentes.

En una forma de realización, el agente de ARNi es un multímero que contiene tres, cuatro, cinco, seis o más dúplex que están representados por la fórmula (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc), (IIId) y (IIIE), en donde los dúplex se conectan mediante un conector. El conector puede ser clivable o no clivable. Opcionalmente, el multímero además comprende un ligando. Cada uno de los dúplex se puede dirigir al mismo gen o a dos genes diferentes; o cada uno de los dúplex puede dirigirse al mismo gen en dos sitios blanco diferentes.

En una forma de realización, dos agentes de ARNi que están

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

Diferentes publicaciones describen agentes de ARNi multiméricos que pueden usarse en los métodos de la invención. Dichas publicaciones incluyen a WO2007/091269, Patente de los EEUU N°: 7858769, WO2010/141511, WO2007/117686, WO2009/014887 y WO2011/031520 los contenidos completos de cada una de las cuales se incorporan a la presente como referencia.

El agente de ARNi que contiene conjugaciones de uno o más grupos de hidrato de carbono a un agente de ARNi puede optimizar una o más propiedades del agente de ARNi. En muchos casos, el grupo de hidrato de carbono se unirá a una subunidad modificada del agente de ARNi. Por ejemplo, el azúcar ribosa de una o más subunidades de ribonucleótido de un agente ARNd_h se puede reemplazar por otro grupo, por ejemplo, un vehículo no hidrato de carbono (preferentemente cíclico) al que se une un ligando de hidrato de carbono. Una subunidad de ribonucleótido en la que se ha reemplazado el azúcar ribosa de la subunidad se denomina en la presente como a subunidad con modificación de reemplazo de ribosa (RRMS). Un vehículo cíclico puede ser un sistema de anillo carbocíclico, o sea, en donde todos los átomos de anillo son átomos de carbono, o un sistema de anillo heterocíclico, o sea, en donde uno o más átomos de anillo pueden ser un heteroátomo, por ejemplo, nitrógeno, oxígeno, azufre. El vehículo cíclico puede

ser un sistema de anillo monocíclico, o puede contener dos o más anillos, por ejemplo anillos fusionados. El vehículo cíclico puede ser un sistema de anillo totalmente saturado, o el mismo puede contener uno o más enlaces dobles.

El ligando puede estar unido al polinucleótido a través de un vehículo. Los vehículos incluyen a (i) por lo menos un “punto de unión a esqueleto,” preferentemente dos “puntos de unión a esqueleto” y (ii) por lo menos un “punto de unión de amarre.” Un “punto de unión a esqueleto” tal según se usa en la presente se refiere a un grupo funcional, por ejemplo un grupo hidroxilo, o en general, un enlace disponible para, y que es apropiado para la incorporación del vehículo en el esqueleto, por ejemplo, el fosfato, o fosfato modificado, por ejemplo, esqueleto que contiene azufre, de un ácido ribonucleico. Un “punto de unión de amarre” (TAP) en algunas formas de realización se refiere a un átomo constituyente del anillo del vehículo cíclico, por ejemplo, un átomo de carbono o un heteroátomo (distinto de un átomo que provee un punto de unión a esqueleto), que conecta a un grupo seleccionado. El grupo puede ser, por ejemplo, un hidrato de carbono, por ejemplo monosacárido, disacárido, trisacárido, tetrasacárido, oligosacárido y polisacárido. Opcionalmente, el grupo seleccionado se conecta mediante un amarre interpuesto al vehículo cíclico. Por consiguiente, el vehículo cíclico con frecuencia incluirá un grupo funcional, por ejemplo, un grupo amino, o en general, proveerá un enlace, que es adecuado para la incorporación o amarre de otra entidad química, por ejemplo, un ligando para el anillo constituyente.

Los agentes de ARNi se pueden conjugar a un ligando a través de un vehículo, en donde el vehículo puede ser un grupo cíclico o grupo no cíclico; preferentemente, el grupo cíclico se elige de pirrolidinilo, pirazolinilo,

pirazolidinilo, imidazolinilo, imidazolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, [1,3]dioxolano, oxazolidinilo, isoxazolidinilo, morfolinilo, tiazolidinilo, isotiazolidinilo, quinoxalinilo, piridazinonilo, tetrahidrofurilo y decalina; preferentemente, el grupo no cíclico se elige de esqueleto de serinol o esqueleto de dietanolamina.

En determinadas formas de realización específicas, el agente de ARNi para usar en los métodos de la invención es AT3SC-001 (AD-57213-Hebra sentido: 5'- GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf – 3' (SEQ ID N°: 13) y Hebra antisentido: 5'- usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg – 3' (SEQ ID N°: 14), en donde a, c, g y u son A, C, G o U 2'-O-metilo (2'-OMe); Af, Cf, Gf o Uf son A, C, G o U 2'-fluoro; y s es un enlace fosforotioato.

Estos agentes pueden comprender además un ligando.

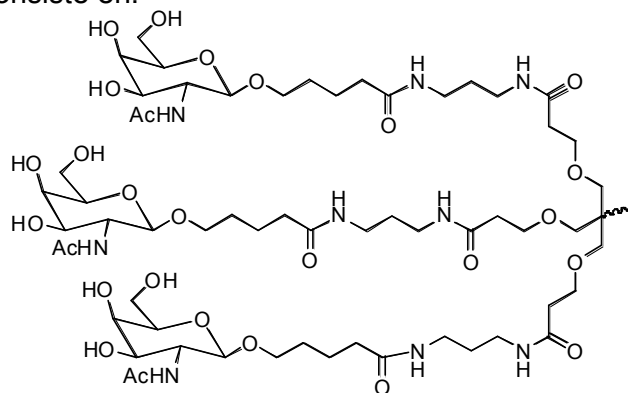
Ligandos

Los agentes de ARN de hebra doble (ARNcd) de la invención pueden estar conjugados opcionalmente con uno o más ligandos. El ligando puede estar unido a la hebra orientada en el sentido del marco de lectura, la hebra antisentido o a ambas hebras, en el extremo 3', el extremo 5' o ambos extremos. Por ejemplo, el ligando puede estar conjugado a la hebra orientada en el sentido del marco de lectura. En las formas de realización preferidas, el ligando está conjugado al extremo 3' de la hebra orientada en el sentido del marco de lectura.

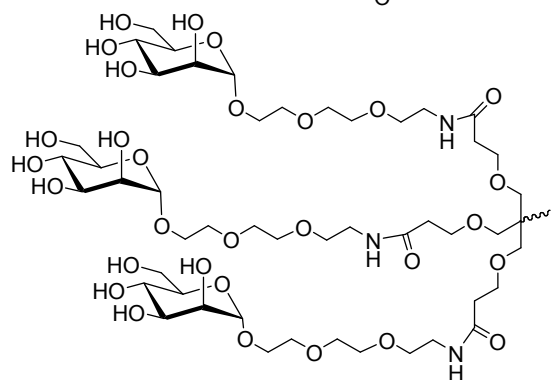
En una forma de realización, el ligando es un conjugado de carbohidratos, tal como un monosacárido. En una forma de realización, el ligando es N-acetilgalactosamina (GalNAc) GalNAc o un derivado de GalNAc. En determinadas formas de realización de la invención, la GalNAc o el derivado

de GalNAc está unido a un agente de ARNi de la invención por medio de un conector monovalente. En algunas formas de realización, la GalNAc o el derivado de GalNAc está unido a un agente de ARNi de la invención por medio de un conector bivalente. En aún otras formas de realización de la invención, la GalNAc o el derivado de GalNAc está unido a un agente de ARNi de la invención por medio de un conector trivalente.

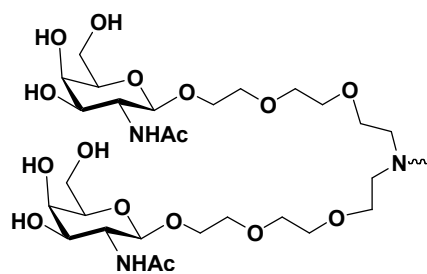
En una forma de realización, el conjugado de carbohidrato para su uso en las composiciones y los métodos de la invención se selecciona del grupo que consiste en:



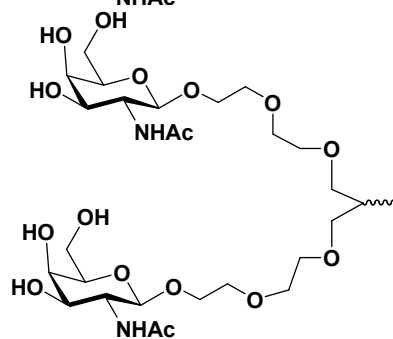
Fórmula II,



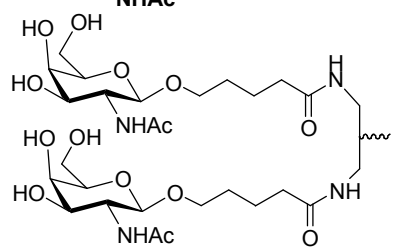
Fórmula III,



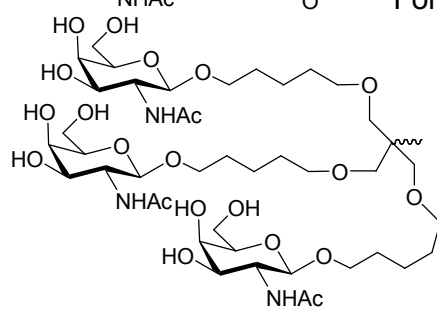
Fórmula IV,



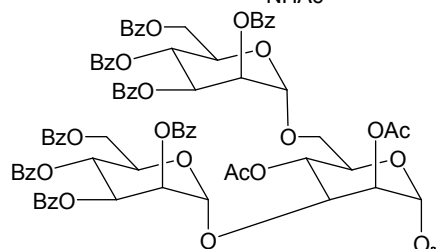
Fórmula V,



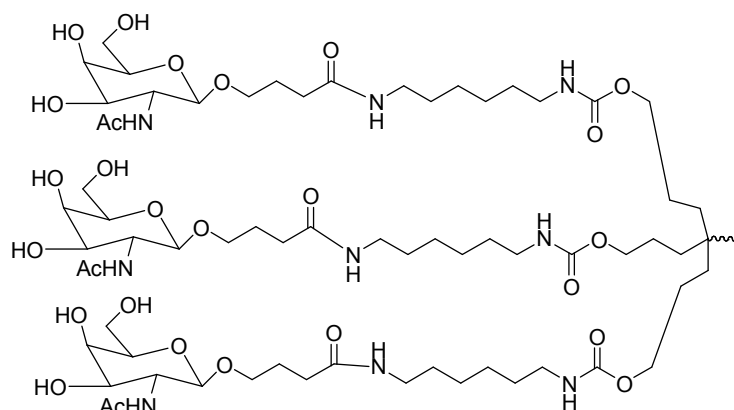
Fórmula VI,



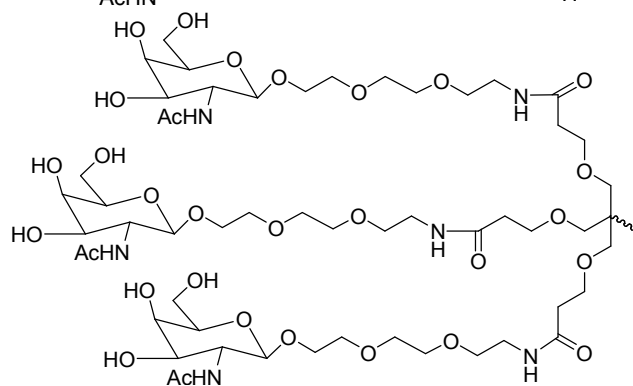
Fórmula VII,



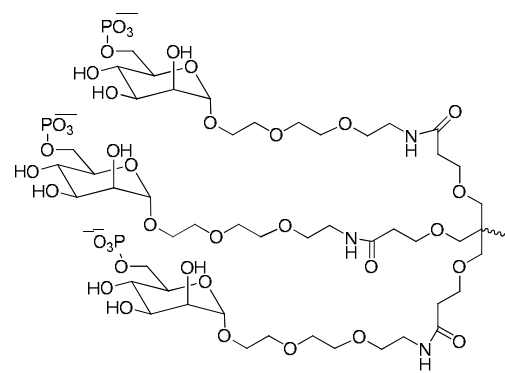
Fórmula VIII,



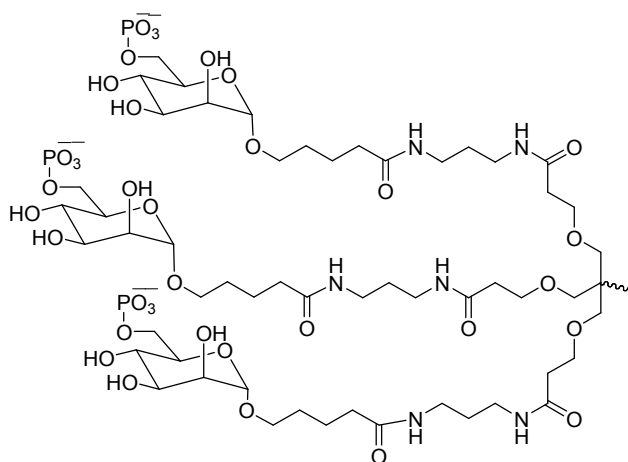
Fórmula IX,



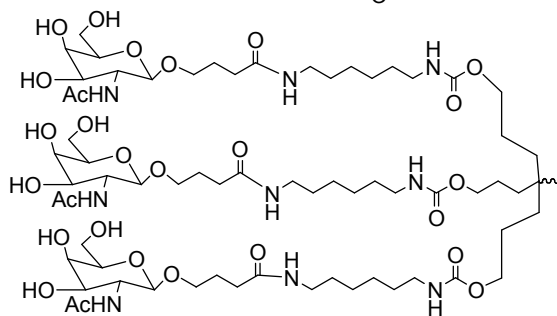
Fórmula X,



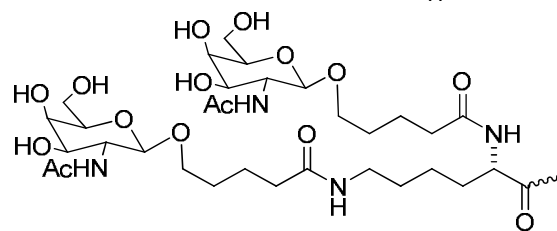
Fórmula XI,



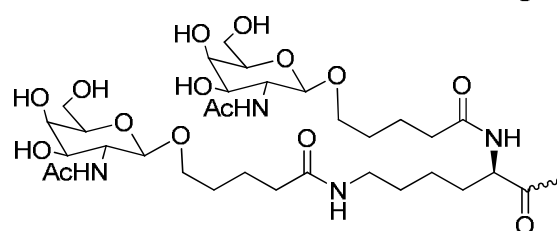
Fórmula XII,



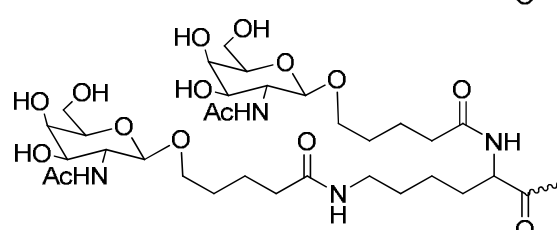
Fórmula XIII,



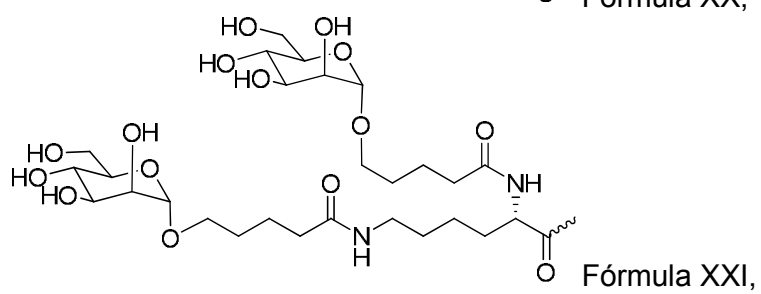
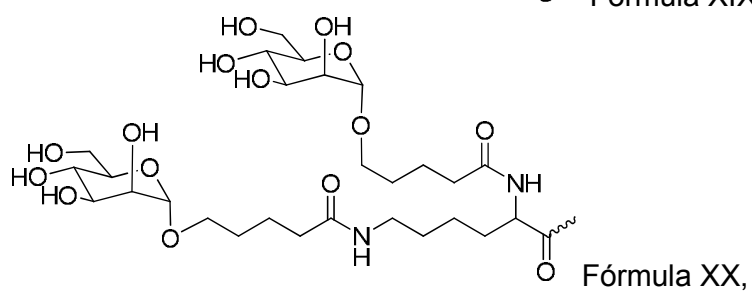
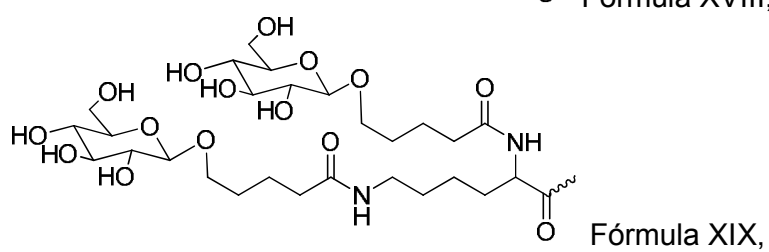
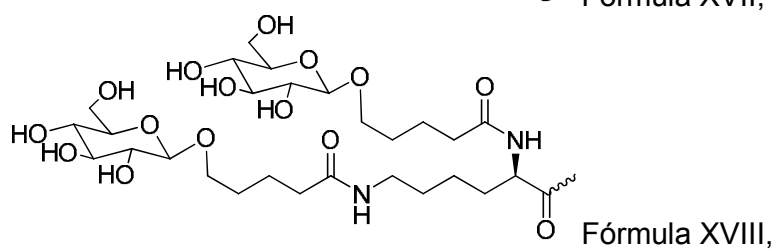
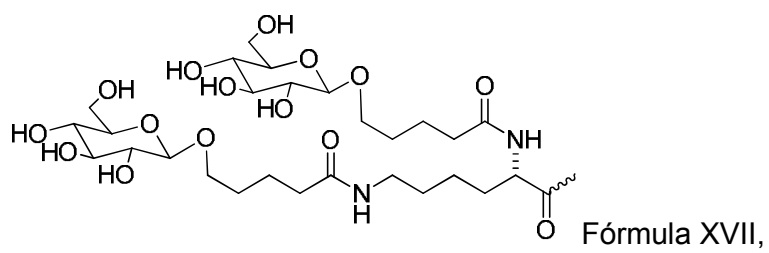
Fórmula XIV,

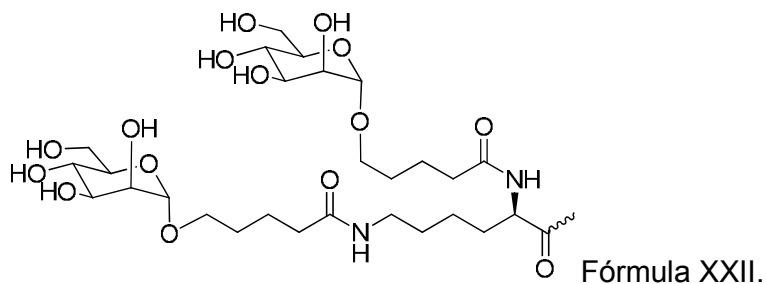


Fórmula XV,

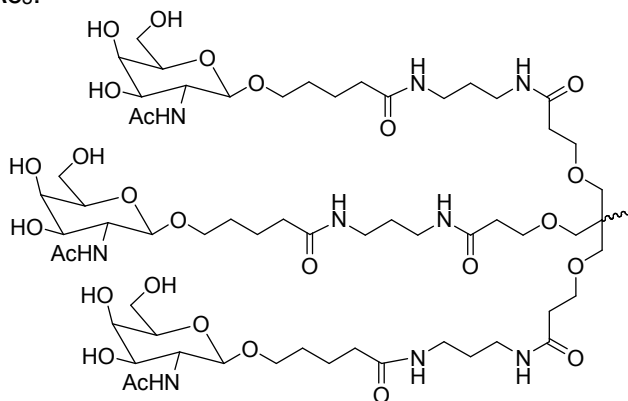


Fórmula XVI,

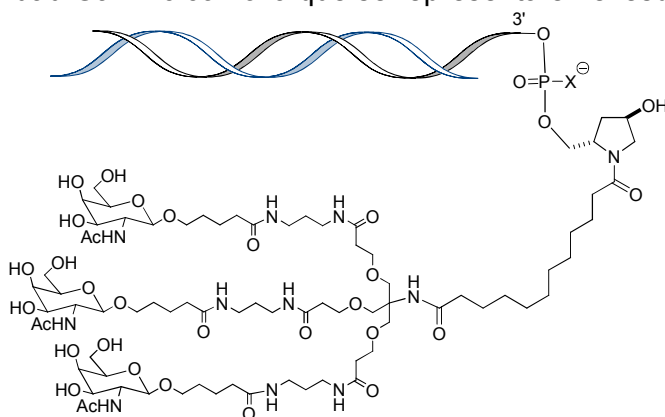




En una forma de realización, la GalNAc o un derivado de GalNAc es GalNAc₃:



En algunas formas de realización, el ligando, que puede ser una unidad GalNAc, está unido al extremo 3' del agente de ARNi. En una forma de realización, el agente de ARNi está conjugado con un ligando, que puede ser una unidad GalNAc como la que se representa en el esquema a continuación:



donde X es O o S. En una forma de realización, X es O.

Hay una amplia variedad de entidades que se pueden acoplar a los agentes de ARNi de la presente invención. Las unidades preferidas son ligandos, que están acoplados, preferiblemente de manera covalente, ya sea directa o indirectamente a través de un conector intermedio.

En las formas de realización preferidas, un ligando altera la distribución, direccionamiento hacia un blanco o el tiempo de vida de la molécula a la que se incorpora. En las formas de realización preferidas, un ligando provee una mayor afinidad por un blanco seleccionado, por ejemplo, molécula, célula o tipo de célula, compartimiento, receptor por ejemplo, un compartimiento celular o de un órgano, tejido, órgano o región del cuerpo, en comparación, por ejemplo, con una especie ausente, tal como un ligando. Los ligandos que proveen mayor afinidad por un blanco seleccionado también se denominan ligandos de direccionamiento hacia un blanco.

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 hacia el citoplasma de la célula. El ligando endosomolítico puede ser un péptido polianiónico o peptidomimético que muestra actividad de membrana dependiente del pH y fusogenicidad. En una forma de realización, el ligando endosomolítico asume su conformación activa al pH endosómico. La conformación “activa” es la conformación en la cual el ligando endosomolítico promueve la lisis del endosoma y/o el transporte de la composición de la invención, o sus componentes, desde el endosoma hacia el citoplasma de la célula. Algunos ligandos endosomolíticos indicativos incluyen al péptido GALA (Subbarao *et al.*, *Biochemistry*, 1987, 26: 2964-2972), al 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 forma de realización, el componente endosomolítico puede contener un grupo químico (por ejemplo, un aminoácido) que sufrirá un cambio de carga o protonación en respuesta a un cambio de pH. El componente endosomolítico puede ser lineal o ramificado.

Los ligandos pueden mejorar las propiedades de transporte, la hibridación, y especificidad y también pueden mejorar la resistencia a nucleasas del oligorribonucleótido natural o modificado que se obtiene como resultado, o una molécula polimérica que comprende cualquier combinación de los monómeros descritos aquí y/o ribonucleótidos naturales o modificados.

Los ligandos en general pueden incluir modificadores terapéuticos, por ejemplo, para intensificar la absorción; compuestos de diagnóstico o grupos informadores por ejemplo, para monitorear la distribución; agentes de entrecruzamiento; y unidades que confieren resistencia a nucleasas. Los ejemplos generales incluyen lípidos, esteroides, vitaminas, azúcares, proteínas, péptidos, poliaminas, y péptido miméticos.

Los ligandos pueden incluir una sustancia natural, tal como una proteína (por ejemplo, albúmina de suero humano (HSA), lipoproteína de baja densidad (LDL) o globulina); un carbohidrato (por ejemplo, un dextrano, pululano, quitina, quitosán, inulina, ciclodextrina, N-acetilgalactosamina o ácido hialurónico); o un lípido. El ligando también puede ser una molécula recombinante o sintética, tal como un polímero sintético, por ejemplo, un poliaminoácido sintético. Los ejemplos de poliaminoácidos incluyen una polilisina (PLL), ácido poli-L-aspartico, ácido poli L-glutámico, copolímero de estireno-anhídrido del ácido maleico, copolímero de poli(L-láctido-co-glicólido), copolímero de divinil éter-anhídrido maleico, copolímero de N-(2-

hidroxipropil)metacrilamida (HMPA), polietilenglicol (PEG), alcohol polivinílico (PVA), poliuretano, ácido poli(2-etilacrílico), polímeros de N-isopropilacrilamida o polifosfazina. Los ejemplos de poliaminas incluyen: polietilenimina, polilisina (PLL), espermina, espermidina, poliamina, pseudopéptido-poliamina, poliamina peptidomimético, poliamina dendrímero, arginina, amidina, protamina, lípido catiónico, porfirina catiónica, sal cuaternaria de una poliamina o un alfa-péptido helicoidal.

Los ligandos también pueden incluir grupos de direccionamiento, por ejemplo, un agente de direccionamiento hacia una célula o un tejido, por ejemplo, una lectina, una glicoproteína, un lípido o una proteína, por ejemplo, un anticuerpo, que se unirá a un tipo celular específico, tal como una célula de riñón. El grupo de direccionamiento puede ser una tirotopina, melanotropina, lectina, glicoproteína, proteína A tensioactiva, carbohidrato de mucina, lactosa multivalente, galactosa multivalente, N-acetil-galactosamina, N-acetil-glucosamina manosa multivalente, fucosa multivalente, poliaminoácidos glicosilados, galactosa multivalente, transferrina, bifosfonato, poliglutamato, poliaspartato, un lípido, colesterol, un esteroide, ácido biliar, folato, vitamina B12, vitamina A, biotina o un péptido RGD o un péptido mimético RGD.

Otros ejemplos de ligandos incluyen colorantes, agentes intercaladores (por ejemplo, acridinas), conectores cruzados (por ejemplo, psoraleno, mitomicina C), porfirinas (TPPC4, texafirina, sapfirina), hidrocarburos aromáticos policíclicos (por ejemplo, fenazina, dihidrofenazina), endonucleasas artificiales (por ejemplo, EDTA), moléculas lipofílicas, por ejemplo, colesterol, ácido cólico, ácido adamantanacético, ácido 1-pirenbutírico, dihidrotestosterona, 1,3-bi-O(hexadecil)glicerol, un grupo geraniloxihexilo, hexadecilglicerol, borneol, mentol, 1,3-propandiol, un grupo heptadecilo, ácido palmítico, ácido mirístico, ácido O3-(oleoil)litolcólico, ácido O3-(oleoil)colénico, dimetoxitritilo o fenoxazina) y conjugados de péptido (por ejemplo, el

péptido antenapedia, el péptido Tat), agentes alquilantes, fosfato, amino, mercapto, PEG (por ejemplo, PEG-40K), MPEG, [MPEG]₂, poliamino, alquilo, alquilo sustituido, marcadores radiomarcados, enzimas, haptenos (por ejemplo, biotina), facilitadores de transporte/absorción (por ejemplo, aspirina, vitamina E, ácido fólico), ribonucleasas sintéticas (por ejemplo, imidazol, bisimidazol, histamina, agrupaciones de imidazol, conjugados de acridina-imidazol, complejos Eu³⁺ de tetra-azamacrociclos), dinitrofenilo, HRP o AP.

Los ligandos pueden ser proteínas, por ejemplo, glicoproteínas, o péptidos, por ejemplo, moléculas que tienen una afinidad específica por un co-ligando, o anticuerpos por ejemplo, un anticuerpo, que se unen a un tipo celular específico, tal como una célula hepática. 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, N-acetil-glucosamina manosa multivalente, fucosa multivalente o aptámeros. El ligando puede ser, por ejemplo, un lipopolisacárido, un activador de la p38 MAP quinasa o un activador de NF-κB.

El ligando puede ser una sustancia, por ejemplo, una droga, que puede aumentar la captación del agente de ARNi en la célula, por ejemplo, por ruptura del citoesqueleto de la célula, por ejemplo, por ruptura de los microtúbulos de la célula, microfilamentos y/o filamentos intermedios. La droga puede ser, por ejemplo, taxona, vincristina, vinblastina, citocalasina, nocodazol, japaquinolida, latrunculina A, faloidina, swinholida A, indanocina o mioservina.

El ligando puede incrementar la absorción del oligonucleótido hacia el interior de la célula, por ejemplo, por activación de una respuesta inflamatoria. Algunos ligandos indicativos que pueden tener un efecto con dichas

características incluyen al factor alfa de necrosis tumoral (TNF α), interleuquina-1 beta, o interferón gamma.

En un aspecto, el ligando es un lípido o una molécula basada en un lípido. molécula de lípido o molécula basada en lípidos preferiblemente se une a una proteína de suero, por ejemplo, albúmina de suero humano (HSA). Un ligando que se une a HSA permite distribuir el conjugado en un tejido blanco, por ejemplo, un tejido corporal blanco distinto del renal. Por ejemplo, el tejido blanco puede ser el hígado, incluyendo las células parenquimáticas del hígado. También se pueden usar otras moléculas que se pueden unir a HSA. Por ejemplo, se puede usar naproxeno o aspirina. Un ligando de lípido o un ligando basado en lípidos puede (a) aumentar la resistencia a la degradación del conjugado, (b) aumentar el direccionamiento o el transporte en la célula o la membrana celular blanco y/o (c) usarse para ajustar la unión a una proteína del suero, por ejemplo, HSA.

El ligando basado en lípidos se puede usar para modular, por ejemplo, para controlar la unión del conjugado con un tejido blanco. Por ejemplo, es menos probable que un ligando de lípido o un ligando basado en lípidos que se une a HSA más fuertemente sea dirigido al riñón y por ello es menos probable que sea depurado del cuerpo. Un ligando de lípidos o un ligando basado en lípidos que se une a HSA menos fuertemente se puede usar para dirigir el conjugado al riñón.

En una forma de realización preferida, el ligando basado en lípidos se une a HSA. Preferiblemente, se une a HSA con una afinidad suficiente de modo tal que el conjugado preferiblemente se administrará en un tejido distinto del riñón. Sin embargo, se prefiere que la afinidad no sea tan fuerte como para que no se pueda revertir la unión de HSA-ligando.

En otra forma de realización preferida, el ligando basado en lípidos se une

débilmente HSA o no se une a HSA, de modo tal que el conjugado preferiblemente se administrará en el riñón. También se pueden usar otros grupos en lugar de o además del ligando basado en lípidos.

En otro aspecto, el ligando es un grupo, por ejemplo, una vitamina, que es captada por una célula blanco, por ejemplo, una célula en proliferación. Esto resulta de particular utilidad para tratar los trastornos caracterizados por una proliferación celular indeseada, por ejemplo, del tipo maligno o de tipo no maligno, por ejemplo, células de cáncer. Los ejemplos de vitaminas incluyen las vitaminas A, E y K. Otros ejemplos de vitaminas incluyen vitamina B, por ejemplo, ácido fólico, B12, riboflavina, biotina, piridoxal u otras vitaminas o nutrientes captados por las células blanco tales como células de hígado. También se incluye HSA, la lipoproteína de baja densidad (LDL) y la lipoproteína de alta densidad (HDL).

En otro aspecto, el ligando es un agente de permeación celular, preferiblemente una agente de permeación celular helicoidal. Preferiblemente, el agente es anfipático. Un ejemplo de una agente es un péptido tal como tat o antenapedia. Si el agente es un péptido, puede ser un péptido modificado, incluyendo un peptidomimético, invertómeros, con enlaces no peptídicos o pseudopeptídicos y con el uso de D-aminoácidos. El agente helicoidal preferiblemente es un agente alfa-helicoidal, que preferiblemente tiene una fase lipofílica y una fase lipofóbica.

El ligando puede ser un péptido o un peptidomimético. Un peptidomimético (también denominado oligopeptidomimético en la presente) es una molécula capaz de plegarse en una estructura tridimensional definida similar a un péptido natural. El péptido o la porción de peptidomimético puede ser de aproximadamente 5-50 aminoácidos de longitud, por ejemplo, de aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ó 50 aminoácidos de longitud.

Un péptido o un peptidomimético puede ser, por ejemplo, un péptido de permeación celular, un péptido catiónico, un péptido anfipático o un péptido hidrofóbico (por ejemplo, que consiste primariamente de Tyr, Trp o Phe). La porción peptídica puede ser un péptido dendrímero, un péptido restringido o un péptido entrecruzado. En otra alternativa, la porción peptídica puede incluir una secuencia de traslocación de membrana hidrofóbica (MTS). Un ejemplo de péptido que contiene una MTS hidrofóbica es RFGF cuya secuencia de aminoácidos es AAVALLPAVLLALLAP (SEQ ID N°: 9). Un análogo de RFGF (por ejemplo, la secuencia de aminoácidos AALLPVLLAAP (SEQ ID N°: 10) que contiene una MTS hidrofóbica también puede ser una porción de direccionamiento. La porción peptídica puede ser un péptido de “administración”, que puede llevar grandes moléculas polares incluyendo péptidos, oligonucleótidos y proteínas a través de las membranas celulares. Por ejemplo, se ha encontrado que las secuencias de la proteína Tat VIH (GRKKRRQRRRPPQ (SEQ ID N°: 11) y la proteína antenapedia de *Drosophila* (RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID N°: 12) pueden funcionar como péptidos de administración. El péptido o peptidomimético puede ser codificado por una secuencia de ADN aleatoria, tal como un péptido identificado en una biblioteca de expresión en fagos o en una biblioteca combinatoria de una-esfera-un-compuesto (OBOC) (Lam *et al.*, *Nature*, 354: 82-84, 1991). Preferiblemente el péptido o peptidomimético conectado a un agente de ARNi a través de una unidad de monómero incorporado es un péptido de direccionamiento hacia una célula tal como un péptido arginina-glicina-ácido aspártico (RGD), o mimético de RGD. La longitud de la porción peptídica puede variar en un rango de entre aproximadamente 5 aminoácidos y aproximadamente 40 aminoácidos. Los grupos peptídicos pueden presentar una modificación estructural, tal como para aumentar la estabilidad o para dirigir las propiedades de conformación.

Se puede utilizar cualquiera de las modificaciones estructurales que se describen a continuación.

Se puede utilizar una unidad péptido RGD para dirigir hacia una célula tumoral, como por ejemplo una célula tumoral del endotelio o una célula tumoral de cáncer de mama (Zitzmann *et al.*, *Cancer Res.*, 62: 5139-43, 2002). Un péptido RGD puede facilitar el direccionamiento hacia un blanco de un agente de ARNi hacia tumores de una variedad de otros tejidos, incluyendo pulmón, riñón, bazo, o hígado (Aoki *et al.*, *Cancer Gene Therapy* 8: 783-787, 2001). Preferiblemente, el péptido RGD facilitará el direccionamiento de un agente de ARNi al riñón. El péptido RGD puede ser lineal o cíclico y se puede modificar, por ejemplo, glicosilar o metilar para facilitar el direccionamiento a tejidos específicos. Por ejemplo, un péptido RGD glicosilado puede administrar un agente de ARNi en una célula tumoral que expresa $\alpha v \beta_3$ (Haubner *et al.*, *Jour. Nucl. Med.*, 42: 326-336, 2001). Se pueden utilizar péptidos dirigidos hacia células proliferativas enriquecidas en marcadores. Por ejemplo, se pueden dirigir péptidos y peptidomiméticos que contienen RGD hacia células cancerosas, en particular células que exhiben una integrina. Por lo tanto, se pueden utilizar péptidos RGD, péptidos cíclicos que contienen RGD, péptidos RGD que incluyen D-aminoácidos, así como RGD miméticos sintéticos. Además de RGD, se pueden usar otros grupos dirigidos al ligando de integrina. Generalmente, dichos ligandos se pueden utilizar para controlar célula proliferativas y angiogénesis. Los conjugados preferidos de este tipo de ligando se dirigen hacia PECAM-1, VEGF, u otro gen de cáncer, por ejemplo, un gen de cáncer descrito aquí.

Un “péptido que permea una célula” es capaz de permear una célula, como por

ejemplo, una célula microbiana, tal como una célula bacteriana o fúngica, o una célula de mamífero, tal como una célula humana. Un péptido que permea una célula microbiana puede ser, por ejemplo, un péptido lineal α -helicoidal (por ejemplo, LL-37 o Ceropina P1), un péptido que contiene un enlace disulfuro (por ejemplo, α -defensina, β -defensina o batenecina), o un péptido que solamente contiene uno o dos aminoácidos dominantes (por ejemplo, PR-39 o indolicidina). El péptido de permeación celular también puede incluir una señal de localización nuclear (NLS). Por ejemplo, el péptido de permeación celular puede ser un péptido anfipático bipartito, tal como MPG, que deriva del dominio del péptido de fusión de VIH-1 gp41 y la NLS del antígeno T grande SV40 (Simeoni *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 31: 2717-2724, 2003).

En una forma de realización, un péptido de direccionamiento hacia un blanco puede ser un péptido anfipático α -helicoidal. Los péptidos anfipáticos α -helicoidales indicativos incluyen, pero de manera no taxativa, cecropinas, licotoxinas, paradaxinas, buforina, CPF, péptido similar a bombinina (BLP), catelicidinas, ceratotoxinas, péptidos de *S. clava*, péptidos antimicrobianos intestinales de lamprea (HFIAP), magaininas, brevininas-2, dermaseptinas, melitinas, pleurocidina, péptidos H₂A, péptidos de *Xenopus*, esculentinas-1 y caerinas. Con preferencia se tomarán en consideración varios factores para mantener la integridad de la estabilidad de la hélice. Por ejemplo, se utilizará un máximo número de residuos estabilizadores de la hélice (por ejemplo, leu, ala, o lys), y se utilizará un mínimo número residuos desestabilizadores de la hélice (por ejemplo, prolina, o unidades monoméricas cíclicas. El residuo terminal se tomará en consideración (por ejemplo Gly es un residuo N terminal indicativo y/o se puede utilizar amidación C terminal para proveer una unión por puente H adicional para estabilizar la hélice. La formación de puentes salinos

entre residuos con cargas opuestas, separados por $i \pm 3$, o $i \pm 4$ posiciones pueden proveer estabilidad. Por ejemplo, los residuos catiónicos tales como lisina, arginina, homo-arginina, ornitina o histidina pueden formar puentes salinos con los residuos aniónicos glutamato o aspartato.

Los ligandos de péptidos y peptidomiméticos incluyen a aquellos con péptidos de origen natural o modificados, por ejemplo, péptidos D o L; péptidos α , β , o γ ; péptidos N-metilados; azapéptidos; péptidos con una o más amidas, *es decir*, conectores péptidos, reemplazados por una o más conexiones urea, tiourea, carbamato, o sulfonilurea; o péptidos cíclicos.

El ligando de direccionamiento hacia un blanco puede ser cualquier ligando que sea capaz de direccionar hacia un receptor específico. Estos serían algunos ejemplos: folato, GalNAc, galactosa, manosa, manosa-6P, agrupamientos de azúcares tales como agrupamiento GalNAc, agrupamiento de manosa, agrupamiento de galactosa, o un aptámero. Un agrupamiento es una combinación de dos o más unidades de azúcar. Los ligandos de direccionamiento hacia un blanco también incluyen a los ligandos del receptor de integrina, ligandos del receptor de quimioquina, ligandos de los receptores de transferrina, biotina, serotonina, ligandos de PSMA, endotelina, GCP II, somatostatina, LDL y HDL. Los ligandos también pueden ser basados en ácidos nucleicos, por ejemplo, un aptámero. El aptámero puede no estar modificado o puede tener cualquier combinación de modificaciones que se divulgan aquí.

Los agentes de liberación endosómica incluyen imidazoles, poli o oligoimidazoles, PEI, péptidos, péptidos fusogénicos, policaboxilatos, policationes, oligo o poli cationes o aniones enmascarados, acetales,

poliacetales, cetales/policetales, ortoésteres, polímeros con cargas catiónicas o aniónicas enmascaradas o no enmascaradas, dendrímeros con cargas catiónicas o aniónicas enmascaradas o no enmascaradas.

Un “modulador de la PK” significa un modulador de la farmacocinética. Los moduladores de la PK incluyen lipófilos, ácidos biliares, esteroides, análogos de fosfolípidos, péptidos, agentes de unión a proteínas, PEG, vitaminas etc. Los ejemplos de moduladores PK incluyen, pero en un sentido no taxativo, colesterol, ácidos grasos, ácido cólico, ácido litocólico, dialquilglicéridos, diacilglicérido, fosfolípidos, esfingolípidos, naproxeno, ibuprofeno, vitamina E, biotina, etc. Los oligonucleótidos que comprenden numerosos enlaces fosforotioato también se unen a las proteínas séricas, por lo cual los oligonucleótidos cortos, por ejemplo, oligonucleótidos de aproximadamente 5 bases, 10 bases, 15 bases o 20 bases, que comprenden múltiples de enlaces fosforotioato en el esqueleto también son adecuados en la presente invención como ligandos (por ejemplo, como ligandos moduladores de la PK).

Además, en la presente invención también se pueden utilizar aptámeros que se unen a componentes del suero (por ejemplo, proteínas del suero) como ligandos moduladores de la PK.

Otros ligando conjugados que se pueden utilizar en la presente invención se describen en la Solicitudes de Patente de los EEUU N°: 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, presentada 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

como referencia en su totalidad para todo fin.

Cuando hay dos o más ligandos, todos los ligandos pueden tener las mismas propiedades, todos pueden tener diferentes propiedades o algunos ligandos pueden tener las mismas propiedades mientras que otros tienen propiedades diferentes. Por ejemplo, un ligando puede tener propiedades de direccionamiento hacia un blanco, puede tener actividad endosomolítica o puede tener propiedades de modulador de la PK. En una forma de realización preferida, todos los ligandos tienen propiedades diferentes.

Los ligandos se pueden acoplar a los oligonucleótidos en diversos lugares, por ejemplo, en el extremo 3', el extremo 5', y/o en una posición interna. En las formas de realización preferidas, el ligando se une a los oligonucleótidos a través de un conector intermedio, por ejemplo, un vehículo descrito aquí. El ligando o el ligando conectado puede estar presente en un monómero cuando el monómero se incorpora a la hebra en crecimiento. En algunas formas de realización, el ligando se puede incorporar por acoplamiento a un monómero "precursor" luego de que el monómero "precursor" se ha incorporado a la hebra en crecimiento. Por ejemplo, se puede incorporar un monómero que tiene, por ejemplo, un conector terminado en amino (*es decir*, sin un ligando asociado), por ejemplo, $\text{TAP}-(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$ a una hebra de oligonucleótido en crecimiento. En una operación subsiguiente, *es decir*, luego de la incorporación del monómero precursor a la hebra, un ligando con un grupo electrofílico, por ejemplo, un éster pentafluorofenílico o un grupo aldehído, se puede unir subsiguientemente al monómero precursor por acoplamiento del grupo electrofílico del ligando con el grupo nucleofílico terminal del conector del monómero precursor.

En otro ejemplo, se puede incorporar un monómero con un grupo químico apropiado para formar parte de una reacción de Química Click, por ejemplo, un conector terminado en azida o alquino. En una operación subsiguiente, es *decir*, luego de la incorporación del monómero precursor a la hebra, se puede unir un ligando con un grupo químico complementario, por ejemplo un alquino o azida al monómero precursor acoplando al alquino y la azida entre sí.

Para los oligonucleótidos de hebra doble, los ligandos pueden estar unidos a una o a ambas hebras. En algunas formas de realización, un agente de ARNi de hebra doble contiene un ligando conjugado a la hebra orientada en el sentido del marco de lectura. En otras formas de realización, un agente de ARNi de hebra doble contiene un ligando conjugado a la hebra antisentido.

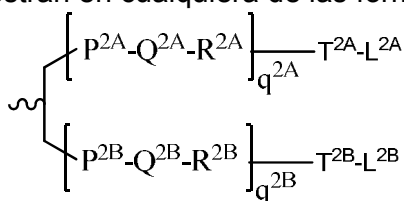
En algunas formas de realización, el ligando puede estar conjugado una nucleobases, unidades de azúcar, o conexiones internucleosídica de moléculas de ácidos nucleicos. La conjugación una nucleobases purina o derivados de las mismas puede ocurrir en cualquier posición incluyendo a los átomos endocíclicos y exocíclicos. En algunas formas de realización, las posiciones 2-, 6-, 7-, u 8- de una nucleobase purina están unidas a una unidad conjugada. La conjugación una nucleobases pirimidina o derivados de las mismas también pueden ocurrir en cualquier posición. En algunas formas de realización, las posiciones - 2-, 5-, y 6 de una nucleobase pirimidina pueden estar sustituidas con una unidad conjugada. La conjugación con unidades azúcar de los nucleósidos puede ocurrir en cualquier átomo de carbono. Los ejemplos de átomos de carbono de una unidad azúcar que pueden estar unidos a una unidad conjugada incluyen a los átomos de carbono 2', 3' y 5'. La posición 1'

también se puede unir a una unidad conjugada, como por ejemplo en un residuo abásico. Las conexiones internucleosídicas también pueden tener unidades conjugadas. Para conexiones que contienen fósforo (por ejemplo, fosfodiéster, fosforotioato, fosforoditiotato, fosforoamidato, y otros similares), la unidad conjugada puede estar unida directamente al átomo de fósforo o a un átomo de O, N o S unido al átomo de fósforo. Para las conexiones internucleosídicas que contienen amina o amida (por ejemplo, PNA), la unidad conjugada puede estar unida al átomo de nitrógeno de la amina o amida o a un átomo de carbono adyacente.

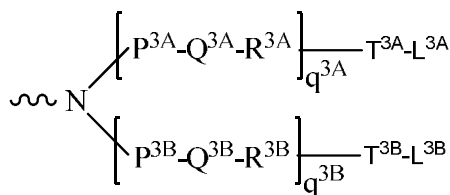
Se puede utilizar cualquier ligando apropiado en el campo de la interferencia de ARN, aunque el ligando es típicamente un carbohidrato por ejemplo, un monosacárido (tal como GalNAc), disacárido, trisacárido, tetrasacárido, polisacárido.

Los conectores que conjugan el ligando al ácido nucleico incluyen a aquellos que se expusieron anteriormente. Por ejemplo, el ligando puede ser uno o más derivados GalNAc (*N*-acetilglucosamina) unidos por medio de un conector ramificado monovalente, bivalente o trivalente.

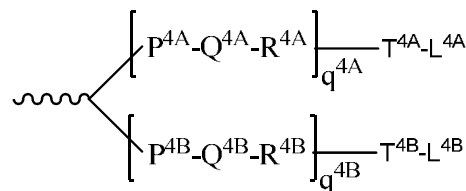
En una forma de realización, el ARNcd de la invención está conjugado a conectores ramificados bivalentes y trivalentes que incluyen a las estructuras que se muestran en cualquiera de las fórmulas (IV) – (VII):



Formula (IV)

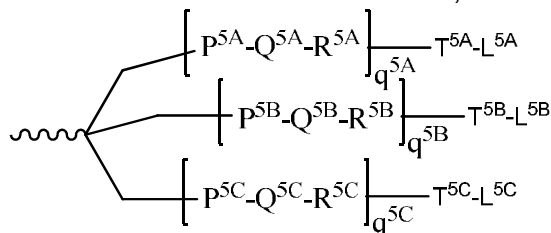


Formula (V)



Formula (VI)

O



Formula (VII)

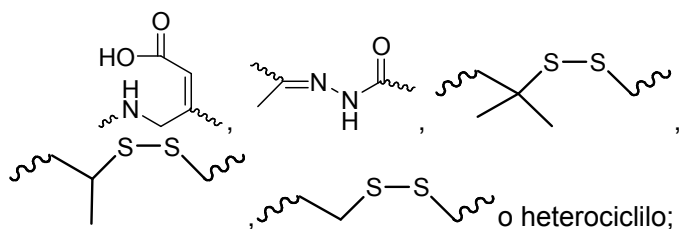
en donde:

q^{2A} , q^{2B} , q^{3A} , q^{3B} , q^{4A} , q^{4B} , q^{5A} , q^{5B} y q^{5C} representan de manera independiente en cada oportunidad 0-20 y en donde la unidad repetitiva puede ser igual o diferente;

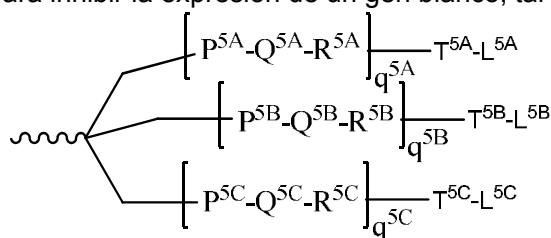
P^{2A} , P^{2B} , P^{3A} , P^{3B} , P^{4A} , P^{4B} , P^{5A} , P^{5B} , P^{5C} , T^{2A} , T^{2B} , T^{3A} , T^{3B} , T^{4A} , T^{4B} , T^{4A} , T^{5B} , T^{5C} , cada uno de manera independiente en cada oportunidad, están ausentes, o son CO, NH, O, S, OC(O), NHC(O), CH₂, CH₂NH o CH₂O;

Q^{2A} , Q^{2B} , Q^{3A} , Q^{3B} , Q^{4A} , Q^{4B} , Q^{5A} , Q^{5B} , Q^{5C} , de manera independiente en cada oportunidad, están ausentes, o son alquileo, alquileo sustituido en donde uno o más de los metilenos se puede interrumpir o terminar con uno o más de O, S, S(O), SO₂, 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} , cada uno de manera independiente en cada oportunidad, están ausente, o son NH, O, S, CH₂, C(O)O, C(O)NH, NHCH(R^a)C(O), -C(O)-CH(R^a)-NH-, CO, CH=N-O,



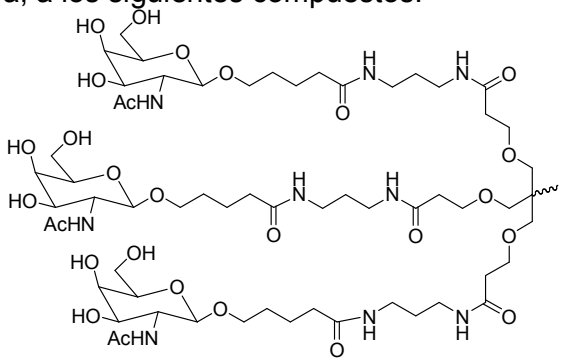
L^{2A} , L^{2B} , L^{3A} , L^{3B} , L^{4A} , L^{4B} , L^{5A} , L^{5B} y L^{5C} representan al ligando; es decir, cada uno es de manera independiente en cada oportunidad un monosacárido (tal como GalNAc), un disacárido, un trisacárido, un tetrasacárido, un oligosacárido o un polisacárido; y R^a es H o una cadena lateral de un aminoácido. Los derivados GalNAc de conjugación trivalente son de particular utilidad para su uso con los agentes de ARNi para inhibir la expresión de un gen blanco, tal como los de la fórmula (VII):

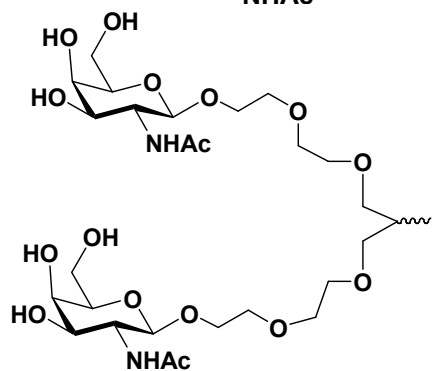
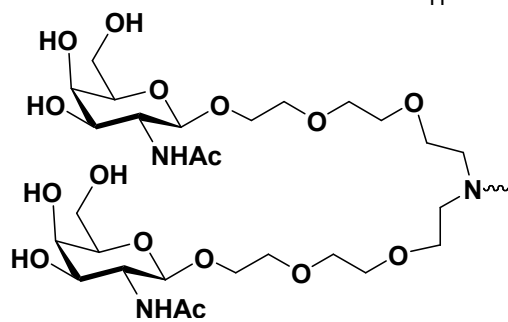
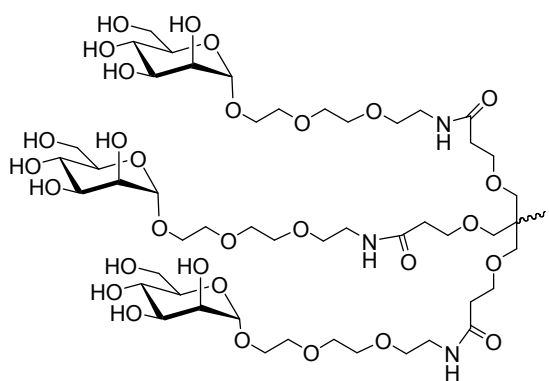
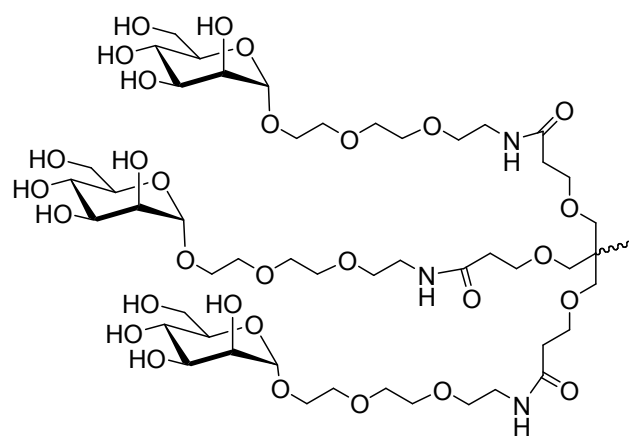


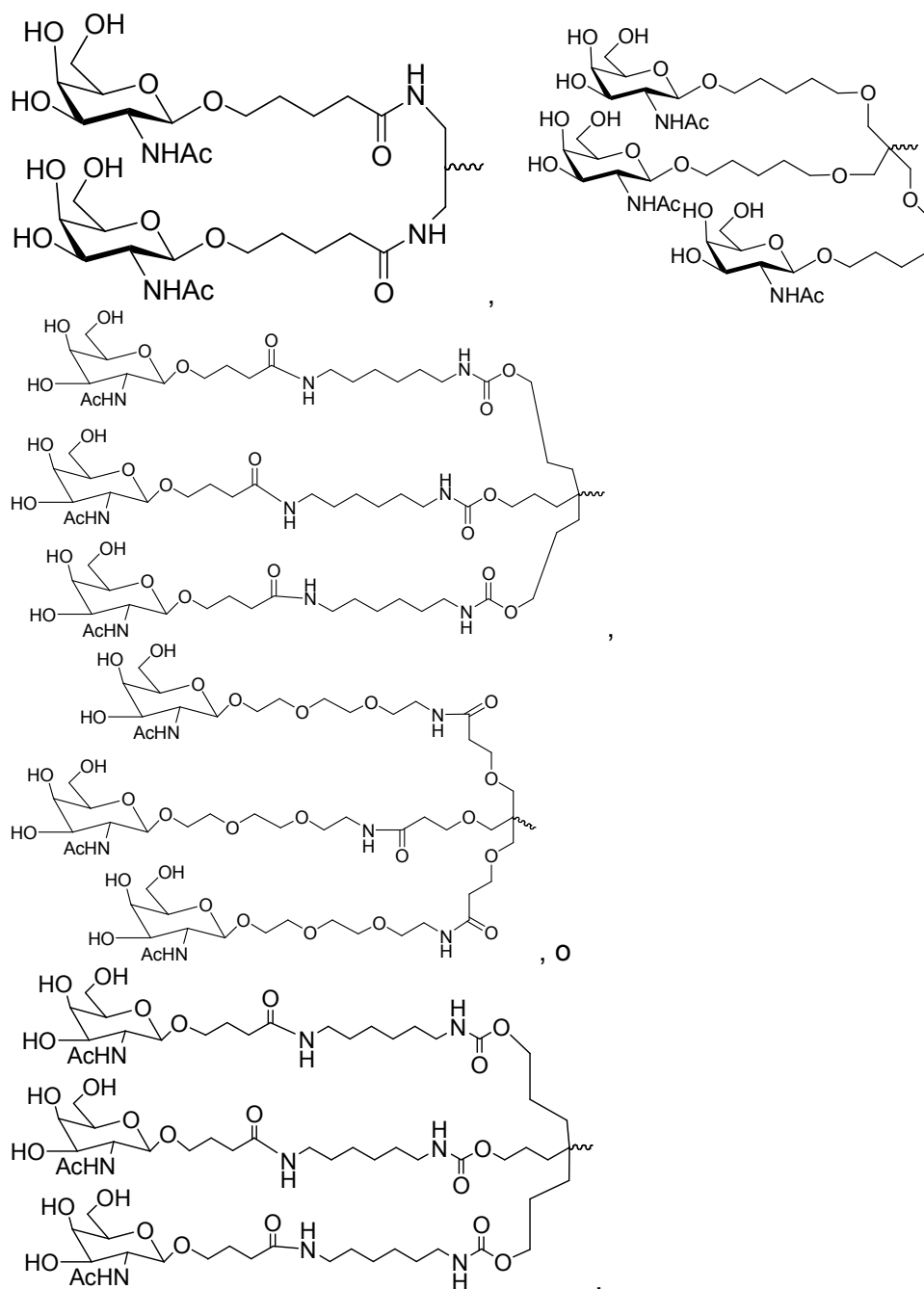
Formula (VII)

en donde L^{5A} , L^{5B} y L^{5C} representan un monosacárido, tal como un derivado GalNAc.

Los ejemplos de grupos conectores ramificados bivalentes y trivalentes apropiados que conjugan derivados GalNAc incluyen, pero de manera no taxativa, a los siguientes compuestos:







Las Patentes de los EE.UU. representativas que divulgan la preparación de ARN conjugados incluyen, pero en un sentido no taxativo, las Patentes de los EE.UU. N°: 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, cuyos contenidos completos se incorporan en la presente a
modo de referencia.

No es necesario que todas las posiciones en un compuesto dado se modifiquen de manera uniforme y de hecho más de uno de las modificaciones mencionadas previamente pueden incorporarse en un solo compuesto o aún en un solo nucleósido en un ARNi. La presente invención también incluye compuestos de ARNi que son compuestos quiméricos.

Los compuestos de ARNi “quiméricos” o “quimeras”, en el contexto de esta invención, son compuestos de ARNi, preferiblemente ARNcd, que contienen dos o más regiones químicamente distintas, cada una conformada por al menos una unidad monomérica, es decir, un nucleótido en el caso de un compuesto de ARNcd. Estos ARNi contienen típicamente al menos una región en donde el ARN está modificado para poder conferirle al ARNi una mayor resistencia a la degradación por nucleasas, una mayor captación celular y/o una mayor afinidad de unión por el ácido nucleico blanco. Una región adicional del ARNi puede servir como sustrato para las enzimas capaces de clivar híbridos de ARN:ADN o de ARN:ARN. A modo de ejemplo, la RNasa H es una endonucleasa celular que cliva la cadena de ARN de una dupla de

ARN:ADN. Por ello, la activación de la RNasa H da como resultado el clivaje del blanco de ARN, mejorando así la eficiencia de la inhibición por ARNi de la expresión del gen. En consecuencia, a menudo se pueden obtener resultados comparables con ARNi más cortos cuando se usan ARNcd quiméricos, en comparación con los desoxi-fosforotioato ARNcd que se hibridizan con la misma región blanco. El clivaje del blanco de ARN puede detectarse de manera rutinaria mediante electroforesis en gel y, si fuera necesario, mediante las técnicas de hibridación de ácidos nucleicos asociadas que son conocidas en el arte.

En determinados casos, el ARN de un ARNi se puede modificar con un grupo no ligando. Se ha conjugado numerosas moléculas de no ligandos con los ARNi con el fin de mejorar la actividad, la administración celular o la captación celular del ARNi, y los procedimientos para efectuar dichas conjugaciones se encuentran disponibles en la literatura científica. Tales grupos no ligando han incluido porciones de lípidos, tal como el 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, por ejemplo, hexil-S-tritiltiol (Manoharan *et al.*, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1992, 660: 306; Manoharan *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1993, 3: 2765), un tiocolesterol (Oberhauser *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 1992, 20: 533), una cadena alifática, por ejemplo, residuos dodecandiol o 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 fosfolípido, por ejemplo, di-hexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato de trietilamonio (Manoharan *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36: 3651; Shea *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 1990, 18: 3777), una cadena de poliamina o polietilenglicol (Manoharan *et al.*, *Nucleosides & Nucleotides*, 1995, 14: 969) o ácido adamantanacético (Manoharan

et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36: 3651), un grupo palmitilo (Mishra *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264: 229) o un grupo octadecilamina o hexilamino-carbonil-oxicolesterol (Crooke *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, 277: 923). Las Patentes de los EE.UU. representativas que divulgan la preparación de dichos conjugados de ARN ya se enumeraron precedentemente. Los típicos protocolos de conjugación comprenden la síntesis de ARN que contienen un conector amino en una o más posiciones de la secuencia. El grupo amino se hace reaccionar luego con la molécula que se está conjugando usando reactivos apropiados de acoplamiento o de activación. La reacción de conjugación se puede efectuar ya sea con el ARN aún unido al soporte sólido o después del clivaje del ARN, en fase solución. La purificación del conjugado de ARN por HPLC típicamente permite obtener el conjugado puro.

En algunas formas de realización, un agente de ARNi de hebra doble de la invención es AT3SC-001 (AD-57213).

VI. Administración de un ARNi de la invención

La administración de un ARNi de la invención a una célula, por ejemplo, una célula en un sujeto, tal como un sujeto humano (por ejemplo, un sujeto que lo necesita, tal como un sujeto que sufre de un trastorno de sangrado) se puede efectuar de numerosas maneras diferentes. Por ejemplo, la administración se puede efectuar poniendo una célula en contacto con un ARNi de la invención, ya sea *in vitro* o *in vivo*. La administración *in vivo* también se puede efectuar directamente administrando una composición que comprende un ARNi, por ejemplo, un ARNcd, a un sujeto. Como alternativa, la administración *in vivo* se puede efectuar indirectamente administrando uno o más vectores que codifican y dirigen la expresión del ARNi. Estas alternativas se describirán más adelante.

En general, se puede adaptar cualquier método de administración de una

molécula de ácido nucleico (*in vitro* o *in vivo*) para su uso con un ARNi de la invención (véase, por ejemplo, Akhtar S. y Julian RL., (1992) *Trends Cell. Biol.* 2(5): 139-144 y WO94/02595, que se incorporan por completo en la presente a modo de referencia). Para la administración *in vivo*, los factores a considerar con el fin de administrar una molécula de ARNi incluyen, por ejemplo, la estabilidad biológica de la molécula administrada, la prevención de efectos no específicos, y la acumulación de la molécula administrada en el tejido blanco. Los efectos no específicos de un ARNi se pueden minimizar por administración local, por ejemplo, por inyección o implantación directa en un tejido o por administración tópica de la preparación. La administración local en el sitio de tratamiento maximiza la concentración local del agente, limita la exposición del agente a los tejidos sistémicos que de lo contrario podrían sufrir daños debido al agente o que pueden degradar al agente y permite administrar una dosis total más baja de la molécula de ARNi. Diversos estudios han demostrado un noqueo exitoso de los productos genéticos cuando un ARNi se administra localmente. Por ejemplo, la administración intraocular de un ARNcd del VEGF por inyección intravítrea en monos cinomolgos (Tolentino, MJ., *et al* (2004) *Retina* 24: 132-138) y por inyecciones subretinales en ratones (Reich, SJ., *et al* (2003) *Mol. Vis.* 9: 210-216) demostraron en ambos casos que se prevenía la neovascularización en un modelo experimental de degeneración macular relacionada con la edad. Además, la inyección intratumoral directa de un ARNcd en ratones reduce el volumen tumoral (Pille, J., *et al* (2005) *Mol. Ther.* 11: 267-274) y puede prolongar la supervivencia de ratones con tumores (Kim, WJ., *et al* (2006) *Mol. Ther.* 14: 343-350; Li, S., *et al* (2007) *Mol. Ther.* 15: 515-523). La interferencia de ARN también ha resultado exitosa con la administración local al CNS 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 a 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 ARNi por vía sistémica para el tratamiento de una enfermedad, el ARN se puede modificar o, como alternativa, se puede administrar usando un sistema de administración de drogas; ambos métodos previenen la rápida degradación del ARNcd por las endo- y exo-nucleasas *in vivo*. La modificación del ARN o el vehículo farmacéutico también permite dirigir a la composición de ARNi hacia el tejido blanco y evitar los efectos indeseables fuera del blanco. Las moléculas de ARNi se pueden modificar mediante conjugación química a grupos lipofílicos, tal como el colesterol, para mejorar la captación celular y prevenir su degradación. Por ejemplo, se inyectó un ARNi dirigido contra ApoB conjugado a un grupo de colesterol lipofílico por vía sistémica en ratones y dio como resultado el noqueo del ARNm de apoB tanto en hígado como yeyuno (Soutschek, J., *et al* (2004) *Nature* 432: 173-178). Se ha demostrado que la conjugación de un ARNi a un aptámero inhibe el crecimiento tumoral e interviene en la regresión tumoral en un modelo de ratón de cáncer de próstata (McNamara, JO., *et al* (2006) *Nat. Biotechnol.* 24: 1005-1015). En una forma de realización alternativa, el ARNi se puede administrar usando sistemas de administración de drogas, tales como una nanopartícula, un dendrímero, un polímero, liposomas o un sistema de administración catiónico. Los sistemas de administración catiónicos de carga positiva facilitan la unión de una molécula de ARNi (de carga negativa) y también mejoran las interacciones en la membrana celular de carga negativa para permitir una captación eficiente de un ARNi por la célula. Los lípidos,

dendrimeros o polimeros catiónicos se pueden unir a un ARNi o inducir para formar una vesícula o micela (véase, por ejemplo, Kim SH., *et al* (2008) *Journal of Controlled Release* 129(2): 107-116) que encierra a un ARNi. La formación de vesículas o micelas previene además la degradación del ARNi cuando es administrado por vía sistémica. Los métodos para elaborar y administrar complejos de ARNi catiónicos son conocidos y propios del especialista en el arte (véase, por ejemplo, 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 por completo en la presente a modo de referencia). Algunos ejemplos no taxativos de sistemas de administración de drogas que son de utilidad para una administración sistémica de los ARNi incluyen DOTAP (Sorensen, DR., *et al* (2003), *supra*; Verma, UN., *et al* (2003), *supra*), oligofectamina, "partículas sólidas de lípido-ácido nucleico" (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.*, 16 de agosto, publicación en medio electrónico anterior a la impresión; 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 formas de realización, el ARNi forma un complejo con ciclodextrina para la administración sistémica. Los métodos de administración y las composiciones farmacéuticas de los ARNi y ciclodextrinas se pueden consultar en la Patente de los EE.UU. N°: 7.427.605, que se incorpora por completo en la presente a modo de referencia.

A. *ARNi codificados por vectores de la invención*

El ARNi dirigido al gen *Serpinc1* se puede expresar a partir de unidades de

transcripción insertadas en vectores de ADN o ARN (véase, por ejemplo, Couture, A, *et al.*, *TIG.*, (1996), 12: 5-10; Skillern, A., *et al.*, publicación PCT Internacional N°: WO 00/22113, Conrad, publicación PCT Internacional N°: WO 00/22114, y Conrad, Patente de los EE.UU. N°: 6.054.299). La expresión puede ser transitoria (en el orden de horas a semanas) o sostenida (semanas a meses o más), dependiendo de la construcción específica usada y el tejido o tipo celular blanco. Estos transgenes se pueden introducir como una construcción lineal, un plásmido circular o un vector viral, que puede ser un vector de integración o de no integración. El transgen también se puede construir para permitir que sea heredado como un plásmido extracromosómico (Gassmann, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1995) 92: 1292).

La o las cadenas individuales de un ARNi se pueden transcribir a partir de un promotor en un vector de expresión. Cuando se expresarán dos cadenas separadas para generar, por ejemplo, un ARNcd, se pueden co-introducir dos vectores de expresión separados (por ejemplo, por transfección o infección) en una célula blanco. Como alternativa, cada cadena individual de un ARNcd puede transcribirse por promotores, ambas localizadas en el mismo plásmido de expresión. En una forma de realización, el ARNcd se expresa como una repetición invertida de polinucleótidos unidos por una secuencia de polinucleótidos conectora de modo tal que el ARNcd tiene una estructura de tallo y bucle.

Los vectores de expresión de ARNi generalmente son ADN plasmídicos o vectores virales. Los vectores de expresión compatibles con células eucariotas, preferiblemente los que son compatibles con células de vertebrados, se pueden usar para producir construcciones recombinantes para la expresión de un ARNi descrito en la presente. Los vectores de expresión en células eucariotas son bien conocidos en la técnica y se encuentran disponibles de numerosas fuentes comerciales. Típicamente,

dichos vectores están provistos de sitios de restricción convenientes para la inserción del segmento de ácido nucleico deseado. La administración de vectores que expresan puede ser sistémica, tal como por administración intravenosa o intramuscular, por administración a las células blanco ex-plantadas del paciente seguido por reintroducción en el paciente o mediante cualquier otro medio que permita su introducción en una célula blanco deseada.

Los plásmidos de expresión de ARNi pueden transfectarse en las células blanco como un complejo con vehículos de lípidos catiónicos (por ejemplo, Oligofectamina) o vehículos de lípidos no catiónicos (por ejemplo, Transit-TKO™). La invención también contempla múltiples transfecciones de lípidos para el noqueo mediado por ARNi dirigido a diferentes regiones de un ARN blanco sobre un período de una semana o más. La introducción exitosa de vectores en las células huésped se puede monitorear usando diversos métodos conocidos. Por ejemplo, la transfección transitoria puede ser señalizada con un informante, tal como un marcador fluorescente, tal como la proteína fluorescente verde (GFP). Se puede asegurar una transfección estable de células *ex vivo* usando marcadores que proporcionan resistencia a la célula transfectada a factores específicos del entorno (por ejemplo, antibióticos y drogas), tal como resistencia a higromicina B.

Los sistemas de vectores virales que se pueden utilizar con los métodos y las composiciones que se describen en la presente incluyen, pero en un sentido no taxativo, (a) vectores de adenovirus; (b) vectores de retrovirus incluyendo, pero en un sentido no limitativo, vectores lentivirales, virus de leucemia murino Moloney, *etc.*; (c) vectores de virus adeno-asociados; (d) vectores del virus *Herpes simplex*; (e) vectores de SV 40; (f) vectores del virus polio; (g) vectores del virus papiloma; (h) vectores del picornavirus; (i) vectores del virus pox, tal como un ortopox, por ejemplo, vectores

del virus vaccinia o avipox, por ejemplo pox de canario o pox de aves de corral; y (j) un adenovirus dependiente de un ayudante o cobarde. También puede ser ventajoso emplear virus de replicación defectuosa. Los diferentes vectores se incorporarán, o no, en el genoma de la célula. Las construcciones pueden incluir secuencias virales para la transfección, si se desea. Como alternativa, la construcción se puede incorporar en vectores capaces de una replicación episómica, por ejemplo los vectores EPV y EBV. Las construcciones para la expresión recombinante de un ARNi generalmente necesitan elementos reguladores, por ejemplo, promotores, potenciadores, *etc.*, para asegurar la expresión del ARNi en las células blanco. Otros aspectos a considerar con los vectores y las construcciones se describirán a continuación.

Los vectores de utilidad para la administración de un ARNi incluirán elementos reguladores (promotor, mejorador, *etc.*) que sean suficientes para la expresión del ARNi en la célula o tejido blanco deseado. Los elementos reguladores se pueden seleccionar para que proporcionen una expresión constitutiva o regulada/inducible.

La expresión del ARNi se puede regular de manera precisa, por ejemplo, usando una secuencia reguladora inducible que sea sensible a determinados reguladores fisiológicos, por ejemplo, los niveles de glucosa en circulación, o de hormonas (Docherty *et al.*, 1994, *FASEB J.* 8: 20-24). Dichos sistemas de expresión inducibles, adecuados para controlar la expresión del ARNcd en células o en mamíferos incluyen, por ejemplo, regulación por ecdisona, por estrógenos, progesterona, tetraciclina, inductores químicos de dimerización e isopropil-beta-D1-tiogalactopiranosido (IPTG). Un especialista en el arte podrá seleccionar la secuencia reguladora/promotora apropiada basado en el uso pretendido del transgen de ARNi.

Se pueden usar vectores virales que contienen secuencias de ácido nucleico

que codifican un ARNi. Por ejemplo, se puede usar un vector retroviral (véase 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 ADN de la célula huésped. Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican un ARNi se clonan en uno o más vectores, lo cual facilita la administración del ácido nucleico en un paciente. Se pueden consultar más detalles acerca de vectores retrovirales, por ejemplo, en Boesen *et al.*, *Biotherapy* 6: 291-302 (1994), donde se describe el uso de un vector retroviral para administrar el gen *mdr1* en células madre hematopoyéticas para que las células madre se vuelvan más resistentes a una quimioterapia. Otras referencias que ilustran el uso de vectores retrovirales en una terapia génica son: Clowes *et al.*, *J. Clin. Invest.* 93: 644-651 (1994); Kiem *et al.*, *Blood* 83: 1467-1473 (1994); Salmons y Gunzberg, *Humane Gene Therapy* 4: 129-141 (1993); y Grossman y Wilson, *Curr. Opin. in Genetics and Devel.*, 3: 110-114 (1993). Los vectores lentivirales contemplados para su uso incluyen, por ejemplo, los vectores basados en VIH que se describen en las Patentes de los EE.UU. N°: 6.143.520; 5.665,557; y 5.981.276, que se incorporan en la presente a modo de referencia.

Los adenovirus también se contemplan para su uso en la administración de los ARNi de la invención. Los adenovirus son vehículos especialmente atractivos, por ejemplo, para administrar genes en el epitelio respiratorio. Los adenovirus infectan naturalmente el epitelio respiratorio, donde causan una enfermedad leve. Otros blancos de los sistemas de administración basados en adenovirus con el hígado, el sistema nervioso central, las células endoteliales y los músculos. Los adenovirus ofrecen la ventaja de poder infectar células que no están en división. Kozarsky y 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*. Otros casos del uso de adenovirus en terapias génicas se pueden consultar en Rosenfeld *et al.*, *Science* 252: 431-434 (1991); Rosenfeld *et al.*, *Cell* 68: 143-155 (1992); Mastrangeli *et al.*, *J. Clin. Invest.* 91: 225-234 (1993); 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 adecuado para expresar un ARNi presentado en la invención, un método para construir el vector AV recombinante y un método para administrar el vector en las células blanco.

También se pueden usar vectores de virus adeno-asociados (AAV) para administrar un ARNi de la invención (Walsh *et al.*, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 204: 289-300 (1993); Patente de los EE.UU. N°: 5.436.146). En una forma de realización, el ARNi se puede expresar como dos moléculas de ARN de cadena simple separadas, complementarias, a partir de un vector de AAV recombinante que contiene, por ejemplo, promotores de ARN U6 o H1 o el promotor de citomegalovirus (CMV). Los vectores de AAV adecuados para expresar el ARNcd presentado en la invención, los métodos para construir el vector de AV recombinante y los métodos para administrar los vectores en las células blanco 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 los EE.UU. N°: 5.252.479; Patente de los EE.UU. N°: 5.139.941; Solicitud de Patente Internacional N°: WO 94/13788; y Solicitud de Patente Internacional N°: WO 93/24641, cuyas divulgaciones completas se incorporan en la presente a modo de referencia.

Otro vector viral adecuado para la administración de un ARNi de la invención

es un virus pox, tal como un virus vaccinia, por ejemplo un vaccinia atenuado, tal como el virus Ankara modificado (MVA) o NYVAC, un avipox tal como el pox de aves de corral o pox de canaria.

El tropismo de los vectores virales se puede modificar mediante pseudotipificación de los vectores con proteínas de la envoltura u otros antígenos de la superficie de otros virus o mediante sustitución de diferentes proteínas de la cápside viral, según corresponda. Por ejemplo, los vectores lentivirales se pueden pseudotipificar con proteínas de la superficie del virus de estomatitis vesicular (VSV), de la rabia, de Ebola, de Mokola y semejantes. Los vectores AAV se pueden adaptar para dirigirlos a diferentes células mediante manipulación de los vectores para que expresen diferentes serotipos de las proteínas de la cápside; véase, por ejemplo, Rabinowitz J E *et al.*, (2002), *J Virol* 76: 791-801, cuya divulgación completa se incorpora en la presente a modo de referencia.

La preparación farmacéutica de un vector puede incluir al vector en un diluyente aceptable o puede incluir una matriz de liberación lenta en la cual se embebe el vehículo de administración del gen. Como alternativa, cuando el vector de administración del gen completo se puede producir intacto a partir de células recombinantes, por ejemplo, vectores retrovirales, la preparación farmacéutica puede incluir una o más células que producen al sistema de administración del gen.

V. Composiciones farmacéuticas de la invención

La presente invención también incluye composiciones farmacéuticas y formulaciones que incluyen a los ARNi de la invención. En una forma de realización, en la presente se proveen composiciones farmacéuticas que contienen un ARNi, descrito en la presente, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas que contienen al ARNi son de utilidad para tratar una

enfermedad o un trastorno asociado con la expresión o la actividad de un gen *Serpinc1*, por ejemplo una enfermedad asociada a *Serpinc1*. Dichas composiciones farmacéuticas se formulan sobre la base del modo de administración. Un ejemplo comprende composiciones que se formulan para una administración sistémica mediante una administración parenteral, por ejemplo, administración por vía subcutánea (SC) o intravenosa (IV). Otro ejemplo comprende composiciones que se formulan para una administración directa en el parénquima de cerebro, por ejemplo, por infusión en el cerebro, tal como mediante infusión con una bomba continua. Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden administrar en dosificaciones suficientes como para inhibir la expresión de un gen *Serpinc1*.

En determinadas formas de realización de la invención, por ejemplo, cuando una composición farmacéutica comprende un agente de ARNi de hebra doble incluye uno o más motivos de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos, inclusive un motivo tal en o cerca del sitio de clivaje del agente, seis enlaces fosforotioatos y un ligando GalNAc, dicha composición se administra a una dosis de entre 0,200 y aproximadamente 1,825 mg/kg, entre 0,200 y aproximadamente 1,800 mg/kg, entre aproximadamente 0,200 y aproximadamente 1,700 mg/kg, entre aproximadamente 0,200 y aproximadamente 1,600 mg/kg, entre aproximadamente 0,200 y aproximadamente 1,500 mg/kg, entre aproximadamente 0,200 y aproximadamente 1,400 mg/kg, entre aproximadamente 0,200 y aproximadamente 1,400 mg/kg, entre aproximadamente 0,200 y aproximadamente 1,200 mg/kg, entre aproximadamente 0,200 y aproximadamente 1,100 mg/kg, entre aproximadamente 0,200 y aproximadamente 1,000 mg/kg, entre

aproximadamente	0,200	y	aproximadamente	0,900	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,200	y	aproximadamente	0,800	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,200	y	aproximadamente	0,700	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,200	y	aproximadamente	0,600	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,200	y	aproximadamente	0,500	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,200	y	aproximadamente	0,400	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,225	y	aproximadamente	1,825	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,225	y	aproximadamente	1,800	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,225	y	aproximadamente	1,700	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,225	y	aproximadamente	1,600	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,225	y	aproximadamente	1,500	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,225	y	aproximadamente	1,400	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,225	y	aproximadamente	1,400	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,225	y	aproximadamente	1,200	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,225	y	aproximadamente	1,100	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,225	y	aproximadamente	1,000	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,225	y	aproximadamente	0,900	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,225	y	aproximadamente	0,800	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,225	y	aproximadamente	0,700	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,225	y	aproximadamente	0,600	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,225	y	aproximadamente	0,500	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,225	y	aproximadamente	0,400	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,250	y	aproximadamente	1,825	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,250	y	aproximadamente	1,800	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,250	y	aproximadamente	1,700	mg/kg,	entre

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

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

aproximadamente	0,475	y	aproximadamente	1,200	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,475	y	aproximadamente	1,100	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,475	y	aproximadamente	1,000	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,475	y	aproximadamente	0,900	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,475	y	aproximadamente	0,800	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,475	y	aproximadamente	0,700	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,475	y	aproximadamente	0,600	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,475	y	aproximadamente	0,500	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,875	y	aproximadamente	1,825	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,875	y	aproximadamente	1,800	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,875	y	aproximadamente	1,700	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,875	y	aproximadamente	1,600	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,875	y	aproximadamente	1,500	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,875	y	aproximadamente	1,400	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,875	y	aproximadamente	1,400	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,875	y	aproximadamente	1,200	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,875	y	aproximadamente	1,100	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,875	y	aproximadamente	1,000	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,875	y	aproximadamente	0,900	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,900	y	aproximadamente	1,825	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,900	y	aproximadamente	1,800	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,900	y	aproximadamente	1,700	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,900	y	aproximadamente	1,600	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,900	y	aproximadamente	1,500	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,900	y	aproximadamente	1,400	mg/kg,	entre

aproximadamente 0,900 y aproximadamente 1,400 mg/kg, entre
aproximadamente 0,900 y aproximadamente 1,200 mg/kg, entre
aproximadamente 0,900 y aproximadamente 1,100 mg/kg, entre
aproximadamente 0,900 y aproximadamente 1,000 mg/kg, entre
aproximadamente 0,925 y aproximadamente 1,825 mg/kg, entre
aproximadamente 0,925 y aproximadamente 1,800 mg/kg, entre
aproximadamente 0,925 y aproximadamente 1,700 mg/kg, entre
aproximadamente 0,925 y aproximadamente 1,600 mg/kg, entre
aproximadamente 0,925 y aproximadamente 1,500 mg/kg, entre
aproximadamente 0,925 y aproximadamente 1,400 mg/kg, entre
aproximadamente 0,925 y aproximadamente 1,400 mg/kg, entre
aproximadamente 0,925 y aproximadamente 1,200 mg/kg, entre
aproximadamente 0,925 y aproximadamente 1,100 mg/kg, o entre
aproximadamente 0,925 y aproximadamente 1,000 mg/kg. Los valores y
rangos intermedios de los valores indicados precedentemente también se
consideran como parte de esta invención, por ejemplo, el agente de ARNi se
puede administrar al sujeto a una dosis de entre aproximadamente 0,015 mg/kg
y aproximadamente 0,45 mg/mg.

Por ejemplo, el agente de ARNi, por ejemplo, el agente de ARNi en una
composición farmacéutica, se puede administrar a 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, aproximadamente 0,5 mg/kg, 0,525 mg/kg, 0,55 mg/kg,
0,575 mg/kg, 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 y rangos intermedios de los valores
indicados precedentemente también se consideran como parte de esta
invención.

En algunas formas de realización de la invención, por ejemplo,
cuando un agente de ARNi de hebra doble comprende una hebra sentido y una
hebra antisentido, la hebra antisentido comprende una región de
complementariedad con un ARNm que codifica Serpinc1 que comprende por lo
menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la
secuencia de nucleótidos de 5' - UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG – 3'
(SEQ ID N°: 15), en donde sustancialmente todos los nucleótidos de la hebra
sentido y sustancialmente todos los nucleótidos de la hebra antisentido son
nucleótidos modificados, y en donde la hebra sentido está conjugada con un
ligando unido al extremo 3'-terminal, dicho agente en una composición
farmacéutica se administra a una dosis de entre aproximadamente 0,200 y
aproximadamente 1,825 mg/kg, entre 0,200 y aproximadamente 1,800 mg/kg,
entre aproximadamente 0,200 y aproximadamente 1,700 mg/kg, entre

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

aproximadamente	0,225	y	aproximadamente	0,700	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,225	y	aproximadamente	0,600	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,225	y	aproximadamente	0,500	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,225	y	aproximadamente	0,400	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,250	y	aproximadamente	1,825	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,250	y	aproximadamente	1,800	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,250	y	aproximadamente	1,700	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,250	y	aproximadamente	1,600	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,250	y	aproximadamente	1,500	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,250	y	aproximadamente	1,400	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,250	y	aproximadamente	1,400	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,250	y	aproximadamente	1,200	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,250	y	aproximadamente	1,100	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,250	y	aproximadamente	1,000	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,250	y	aproximadamente	0,900	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,250	y	aproximadamente	0,800	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,250	y	aproximadamente	0,700	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,250	y	aproximadamente	0,600	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,250	y	aproximadamente	0,500	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,250	y	aproximadamente	0,400	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,425	y	aproximadamente	1,825	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,425	y	aproximadamente	1,800	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,425	y	aproximadamente	1,700	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,425	y	aproximadamente	1,600	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,425	y	aproximadamente	1,500	mg/kg,	entre

aproximadamente	0,425	y	aproximadamente	1,400	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,425	y	aproximadamente	1,400	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,425	y	aproximadamente	1,200	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,425	y	aproximadamente	1,100	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,425	y	aproximadamente	1,000	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,425	y	aproximadamente	0,900	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,425	y	aproximadamente	0,800	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,425	y	aproximadamente	0,700	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,425	y	aproximadamente	0,600	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,425	y	aproximadamente	0,500	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,450	y	aproximadamente	1,825	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,450	y	aproximadamente	1,800	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,450	y	aproximadamente	1,700	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,450	y	aproximadamente	1,600	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,450	y	aproximadamente	1,500	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,450	y	aproximadamente	1,400	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,450	y	aproximadamente	1,400	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,450	y	aproximadamente	1,200	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,450	y	aproximadamente	1,100	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,450	y	aproximadamente	1,000	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,450	y	aproximadamente	0,900	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,450	y	aproximadamente	0,800	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,450	y	aproximadamente	0,700	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,450	y	aproximadamente	0,600	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,450	y	aproximadamente	0,500	mg/kg,	entre

aproximadamente	0,475	y	aproximadamente	1,825	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,475	y	aproximadamente	1,800	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,475	y	aproximadamente	1,700	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,475	y	aproximadamente	1,600	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,475	y	aproximadamente	1,500	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,475	y	aproximadamente	1,400	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,475	y	aproximadamente	1,400	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,475	y	aproximadamente	1,200	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,475	y	aproximadamente	1,100	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,475	y	aproximadamente	1,000	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,475	y	aproximadamente	0,900	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,475	y	aproximadamente	0,800	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,475	y	aproximadamente	0,700	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,475	y	aproximadamente	0,600	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,475	y	aproximadamente	0,500	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,875	y	aproximadamente	1,825	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,875	y	aproximadamente	1,800	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,875	y	aproximadamente	1,700	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,875	y	aproximadamente	1,600	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,875	y	aproximadamente	1,500	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,875	y	aproximadamente	1,400	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,875	y	aproximadamente	1,400	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,875	y	aproximadamente	1,200	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,875	y	aproximadamente	1,100	mg/kg,	entre
aproximadamente	0,875	y	aproximadamente	1,000	mg/kg,	entre

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

Los valores y rangos intermedios de los valores indicados precedentemente también se consideran como parte de esta invención, por ejemplo, el agente de ARNi se puede administrar al sujeto a una dosis de entre aproximadamente 0,015 mg/kg y aproximadamente 0,45 mg/kg.

Por ejemplo, el agente de ARNi, por ejemplo, el agente de ARNi en una composición farmacéutica, se puede administrar a 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, aproximadamente 0,5 mg/kg, 0,525 mg/kg, 0,55 mg/kg, 0,575 mg/kg, 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 y rangos intermedios de los valores indicados precedentemente también se consideran como parte de esta invención.

En alguna forma de realización, una composición farmacéutica que comprende al agente de ARNi se administra a un sujeto a una dosis fija. Una “dosis fija” (por ejemplo, una dosis en mg) significa que se usa una dosis de un agente de ARNi para todos los sujetos independientemente de cualquier factor relacionado con el sujeto específico, tal como el peso. En una forma de realización particular, una dosis fija de un agente de ARNi de la invención se

basa en un peso o edad predeterminado.

En algunas formas de realización, la composición farmacéutica que comprende al agente de ARNi se administra a una dosis fija de entre aproximadamente 25 mg y aproximadamente 100 mg, por ejemplo, entre aproximadamente 25 mg y aproximadamente 95 mg, entre aproximadamente 25 mg y aproximadamente 90 mg, entre aproximadamente 25 mg y aproximadamente 85 mg, entre aproximadamente 25 mg y aproximadamente 80 mg, entre aproximadamente 25 mg y aproximadamente 75 mg, entre aproximadamente 25 mg y aproximadamente 70 mg, entre aproximadamente 25 mg y aproximadamente 65 mg, entre aproximadamente 25 mg y aproximadamente 60 mg, entre aproximadamente 25 mg y aproximadamente 50 mg, entre aproximadamente 50 mg y aproximadamente 100 mg, entre aproximadamente 50 mg y aproximadamente 95 mg, entre aproximadamente 50 mg y aproximadamente 90 mg, entre aproximadamente 50 mg y 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 y aproximadamente 90 mg, entre aproximadamente 40 mg y aproximadamente 80 mg, entre aproximadamente 60 mg y aproximadamente 100 mg, entre aproximadamente 60 mg y aproximadamente 90 mg,, entre aproximadamente 25 mg y aproximadamente 55 mg, entre aproximadamente 30 mg y aproximadamente 95 mg, entre aproximadamente 30 mg y aproximadamente 85 mg, entre aproximadamente 30 mg y aproximadamente 75 mg, entre aproximadamente

30 mg y aproximadamente 65 mg, entre aproximadamente 30 mg y aproximadamente 55 mg, entre aproximadamente 40 mg y aproximadamente 95 mg, entre aproximadamente 40 mg y aproximadamente 85 mg, entre aproximadamente 40 mg y aproximadamente 75 mg, entre aproximadamente 40 mg y aproximadamente 65 mg, entre aproximadamente 40 mg y aproximadamente 55 mg o entre aproximadamente 45 mg y aproximadamente 95 mg.

En algunas formas de realización, la composición farmacéutica que comprende al agente de ARNi se administra a una dosis fija de 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 al ARNi se puede administrar al sujeto aproximadamente una vez por mes, aproximadamente una vez cada cinco semanas, aproximadamente una vez cada seis semanas, aproximadamente una vez cada 2 meses o una vez cada tres meses.

Una composición farmacéutica que comprende al agente de ARNi se puede administrar a un sujeto como una o más dosis. En algunas formas de realización, las composiciones farmacéuticas que comprenden al agente de ARNi de hebra doble se puede administrar a un sujeto como una dosis mensual de entre aproximadamente 0,200 mg/kg y aproximadamente 0,250 mg/kg, una dosis mensual de entre aproximadamente 0,425 mg/kg y aproximadamente

0,475 mg/kg, una dosis mensual de entre aproximadamente 0,875 mg/kg y aproximadamente 0,925 mg/kg o una dosis mensual de entre aproximadamente 1,775 mg/kg y aproximadamente 1,825 mg/kg. En algunas formas de realización, las composiciones farmacéuticas que comprenden al agente de ARNi de hebra doble se puede administrar a un sujeto a una dosis fija de entre aproximadamente 25 mg y aproximadamente 100 mg, por ejemplo, de aproximadamente 25 mg, aproximadamente 50 mg, aproximadamente 80 mg o aproximadamente 100 mg.

La composición farmacéutica se puede administrar por infusión intravenosa sobre un período de tiempo, tal como sobre un período de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 y 21, 22, 23, 24 ó 25 minutos aproximadamente. La administración se puede repetir, por ejemplo, sobre una base regular, tal como una vez por semana, bisemanalmente (es decir, cada dos semanas) una vez por mes, cada dos meses, cada tres meses, cada cuatro meses o más. Después del régimen de tratamiento inicial, los tratamientos se pueden administrar sobre una base menos frecuente. Por ejemplo, después de una administración semanal o bisemanal por tres meses, la administración se puede repetir una vez por mes, durante seis meses o un año o por más tiempo.

La composición farmacéutica se puede administrar una vez por día o el ARNi se puede administrar como dos, tres o más subdosis a intervalos apropiados durante el día o aún usando una infusión continua o administración mediante una formulación de liberación controlada. En tal caso, el ARNi contenido en cada subdosis debe ser correspondientemente menor con el fin de obtener la dosificación diaria total. La unidad de dosificación también se puede adaptar para su administración sobre varios

días, por ejemplo, usando una formulación de liberación sostenida convencional que provee una liberación sostenida del ARNi sobre un período de varios días. Las formulaciones de liberación sostenida son bien conocidas en el arte y son de particular utilidad para la administración de agentes en un sitio particular, tal como el caso de los agentes de la presente invención. En esta forma de realización, la unidad de dosificación contiene un múltiplo correspondiente de la dosis diaria.

En otras formas de realización, una sola dosis de las composiciones farmacéuticas puede ser de duración prolongada, de manera tal que las dosis subsiguientes se administran a intervalos de no más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ú 8 semanas. En algunas formas de realización de la invención, la dosis individual de las composiciones farmacéuticas de la invención se administra una vez por mes.

El especialista podrá apreciar que existen determinados factores que pueden afectar la dosificación y el tiempo requeridos para tratar efectivamente a un sujeto, incluyendo pero en un sentido no limitativo la severidad de la enfermedad o el trastorno, tratamientos anteriores, el estado de salud general y/o la edad del sujeto, y la presencia de otras enfermedades. Aún más, el tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición puede incluir un tratamiento único o una serie de tratamientos. Se pueden efectuar estimaciones de las dosificaciones efectivas y la vida media *in vivo* para los ARNi individuales comprendidos por la invención usando metodologías convencional o sobre la base de pruebas *in vivo* usando un modelo en animales apropiado, según se describe en otra parte en la presente.

Los avances en la genética de ratones han generado numerosos modelos en ratón para el estudio de diversas enfermedades humanas, tal como un trastorno de sangrado, que pudieran verse beneficiadas con la reducción en la expresión de

Serpinc1. Dichos modelos se pueden usar para evaluar el ARNi *in vivo*, así como para determinar la dosis terapéuticamente eficaz. Los modelos de ratón adecuados son conocidos en el arte e incluyen, por ejemplo, modelos en ratón de Hemofilia A y modelos en ratón de Hemofilia B, por ejemplo, ratones que contienen un gen noqueado de un factor de coagulación, tales como los que se describen 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 USA* 94: 11563-6, y Jin, *et al.*, (2004) *Blood* 104: 1733.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar de numerosas maneras dependiendo de si se desea un tratamiento local o sistémico y del área a tratar. La administración puede ser tópica (por ejemplo, mediante un parche transdérmico), pulmonar, por ejemplo, por inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, incluyendo con un nebulizador; intratraqueal, intranasal, epidérmica y transdérmica, oral o parenteral. La administración parenteral incluye una administración intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal intramuscular o por inyección o infusión; subdérmica, por ejemplo, por medio de un dispositivo implantado; o intracraneal, por ejemplo, por administración intraparenquimática, intratecal o intraventricular. El ARNi se puede de una manera tal que permita tratar un tejido particular, tal como el hígado (por ejemplo, los hepatocitos del hígado). Las composiciones y las formulaciones farmacéuticas para una administración tópica pueden incluir parches transdérmicos, ungüentos, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, rocíos, líquidos y polvos. Puede ser necesario o deseable emplear vehículos farmacéuticos convencionales, bases acuosas, en polvo u oleosas, espesantes y semejantes. También pueden ser útiles los condones y los guantes recubiertos, y semejantes. Las formulaciones tópicas adecuadas incluyen aquellas en

donde los ARNi presentados en la invención se encuentran en una mezcla con un agente de administración tópica tales como lípidos, liposomas, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, esteroides, agentes quelantes y agentes tensioactivos. Las formulaciones tópicas se describen con detalle en la Patente de los EE.UU. N°: 6.747.014, que se incorpora en la presente a modo de referencia.

A. *Formulaciones adicionales*

i. *Emulsiones*

Las composiciones de la presente invención se pueden preparar y formular como emulsiones. Típicamente, las emulsiones son sistemas heterogéneos de un líquido disperso en otro en la forma de gotas que habitualmente exceden 0,1 μm de diámetro (véase, por ejemplo, *Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Allen, LV., Popovich NG., y Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8ª ed.), Nueva York, NY; Idson, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, página 199; Rosoff, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., Volumen 1, página 245; Block en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 2, página 335; Higuchi *et al.*, en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, página 301). A menudo las emulsiones son sistemas bifásicos que comprenden dos fases líquidas inmiscibles mezcladas íntimamente y una dispersa en la otra. En general, las emulsiones pueden ser de la variedad de agua-en-aceite (ag/ac) o de aceite-en-agua (ac/ag). Cuando la fase acuosa está finamente dividida y dispersa como gotas diminutas en una fase oleosa voluminosa, la composición resultante es una emulsión de agua-en-aceite (ag/ac). Como alternativa, cuando una fase oleosa se divide finamente y se dispersa

como gotas diminutas en una fase acuosa voluminosa, la composición resultante es una emulsión de aceite-en-agua (ac/ag). Las emulsiones pueden contener componentes adicionales además de las fases dispersas y la droga activa puede estar presente como una solución ya sea en la fase acuosa, en la fase oleosa o ella misma puede ser una fase separada. Las emulsiones también pueden contener excipientes farmacéuticos, tales como emulsionantes, estabilizantes, colorantes y anti-oxidantes, según necesidad. Las emulsiones farmacéuticas también pueden ser emulsiones múltiples compuestas por más de dos fases tal como, por ejemplo, es el caso de las emulsiones de aceite-en-agua-en-aceite (ac/ag/ac) y agua-en-aceite-en-agua (ag/ac/ag). Tales formulaciones complejas a menudo ofrecen determinadas ventajas que las simples emulsiones binarias no proporcionan. Las emulsiones múltiples en las cuales las gotas de aceite individuales de una emulsión de ac/ag encierran pequeñas gotas de agua constituyen una emulsión de ag/ac/ag. Asimismo un sistema de gotas de aceite encerradas en glóbulos de agua estabilizadas en una fase oleosa continua provee una emulsión de ac/ag/ac.

Las emulsiones se caracterizan por presentar poca o ninguna estabilidad termodinámica. A menudo, la fase dispersa o discontinua de la emulsión está bien dispersa en la fase externa o continua y se mantiene en esta forma por medio de emulsionantes o la viscosidad de la formulación. Cualquiera de las fases de la emulsión puede ser un semisólido o un sólido, como es el caso de las bases de ungüentos y cremas estilo emulsión. Otros medios para estabilizar emulsiones comprenden el uso de emulsionantes que se pueden incorporar en cualquiera de las fases de la emulsión. Los emulsionantes se pueden clasificar en términos generales en cuatro categorías: agentes tensioactivos sintéticos, emulsionantes naturales, bases de absorción y sólidos finamente dispersos (véase, por ejemplo, *Dosage Forms and*

Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., y Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8ª ed.), Nueva York, NY; Idson, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, página 199).

Los agentes tensioactivos sintéticos, también conocidos como agentes de superficie activa, tienen una amplia aplicabilidad en la formulación de emulsiones y se han revisado en la literatura (véase, por ejemplo, *Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Allen, LV., Popovich NG., y Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8ª ed.), Nueva York, NY; Rieger, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, página 285; Idson, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., 1988, volumen 1, página 199). Los agentes tensioactivos típicamente son anfifílicos y comprenden una porción hidrofílica y una porción hidrofóbica. La relación de la naturaleza hidrofílica a hidrofóbica del agente tensioactivo se ha denominado balance hidrófilo/lipófilo (HLB) y constituye una herramienta valiosa en la clasificación y selección de los agentes tensioactivos en la preparación de formulaciones. Los agentes tensioactivos se pueden clasificar en diferentes clases basado en la naturaleza del grupo hidrofílico: no iónico, aniónico, catiónico y anfotérico (véase, por ejemplo, *Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Allen, LV., Popovich NG., y Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8ª ed.), Nueva York, NY; Rieger, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, página 285).

Los emulsionantes naturales usados en las formulaciones de la emulsión incluyen lanolina, cera de abejas, fosfátidos, lecitina y acacia. Las bases de absorción tienen propiedades hidrofílicas de modo tal que pueden absorber agua para formar

emulsiones ag/ac y aún retener sus consistencias semisólidas, tal como lanolina anhidra y petrolato hidrofílica. Los sólidos finamente divididos también se han usado como buenos emulsionantes en especial en combinación con agentes tensioactivos y en preparaciones viscosas. Incluyen sólidos inorgánicos polares, tales como hidróxidos de metales pesados, arcillas no expansibles tal como bentonita, atapulgita, hectorita, caolín, montmorilonita, silicato de aluminio coloidal y silicato de aluminio y magnesio coloidal, pigmentos, y sólidos no polares tal como carbón o triestearato de glicerilo.

También se puede incluir una gran variedad de materiales no emulsionantes en las formulaciones en emulsión y contribuyen en las propiedades de las emulsiones. Incluyen grasas, aceites, ceras, ácidos grasos, alcoholes grasos, ésteres grasos, humectantes, coloides hidrofílicos, conservantes y antioxidantes (Block, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, página 335; Idson, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, página 199).

Los hidrocoloides o coloides hidrofílicos incluyen gomas naturales y polímeros sintéticos tales como polisacáridos (por ejemplo, acacia, agar, ácido alginico, carragenina, goma guar, goma de karaya y tragacanto), derivados de celulosa (por ejemplo, carboximetilcelulosa y carboxipropilcelulosa), y polímeros sintéticos (por ejemplo, carbómeros, éteres de celulosa y polímeros de carboxivinilo). Se dispersan o hinchan en agua para formar soluciones coloidales que estabilizan a las emulsiones por formación de fuertes películas interfase alrededor de las gotas de fase dispersa y por aumento de la viscosidad de la fase externa.

Dado que las emulsiones a menudo contienen numerosos ingredientes tales

como carbohidratos, proteínas, esteroides y fosfolípidos que fácilmente pueden sustentar el crecimiento de microbios, estas formulaciones a menudo incorporan conservantes. Los conservantes comúnmente usados incluidos en las formulaciones en emulsión incluyen metil parabeno, propil parabeno, sales de amonio cuaternario, cloruro de benzalconio, ésteres del ácido p-hidroxibenzoico y ácido bórico. Comúnmente, también se agregan antioxidantes a las formulaciones en emulsión para prevenir el deterioro de la formulación. Los antioxidantes usados pueden ser secuestrantes de radicales libres tales como tocoferoles, galatos de alquilo, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado o agentes reductores tal como ácido ascórbico y metabisulfito de sodio y sinergistas de antioxidantes tales como ácido cítrico, ácido tartárico y lecitina.

La aplicación de las formulaciones en emulsión por las rutas dermatológicas, orales y parenterales y los métodos para su elaboración se han revisado en la literatura (véase, por ejemplo, *Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Allen, LV., Popovich NG., y Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8ª ed.), Nueva York, NY; Idson, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, página 199). Las formulaciones en emulsión para la administración por vía oral se han utilizado ampliamente por la facilidad de su formulación, así como su eficacia desde el punto de vista de la absorción y biodisponibilidad (véase, por ejemplo, *Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Allen, LV., Popovich NG., y Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8ª ed.), Nueva York, NY; Rosoff, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, página 245; Idson, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, página 199).

Los laxantes con bases de aceite mineral, vitaminas solubles en aceite y las preparaciones nutritivas ricas en grasas se encuentran entre los materiales que se administran comúnmente por vía oral como emulsiones de ac/ag.

ii. *Microemulsiones*

En una forma de realización de la presente invención, las composiciones de los ARNi y ácidos nucleicos se formulan como microemulsiones. Una microemulsión se puede definir como un sistema de agua, aceite y anfifilo, que es una solución líquida simple ópticamente isotrópica y termodinámicamente estable (véase, por ejemplo, *Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Allen, LV., Popovich NG., y Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8ª ed.), Nueva York, NY; Rosoff, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, página 245). Típicamente, las microemulsiones son sistemas que se preparan dispersando primero un aceite en una solución tensioactiva acuosa y agregando luego una cantidad suficiente de un cuarto componente, generalmente un alcohol de longitud de cadena intermedia para formar un sistema transparente. Por ello, las microemulsiones también se han descrito como dispersiones termodinámicamente estables, isotrópicamente claras de dos líquidos inmiscibles que son estabilizados por películas interfaciales de moléculas de superficie activa (Leung y Shah, en: *Controlled Release of Drugs: Polymers and Aggregate Systems*, Rosoff, M., Ed., 1989, VCH Publishers, Nueva York, páginas 185-215). Las microemulsiones se preparan comúnmente mediante una combinación de tres a cinco componentes que incluyen aceite, agua, un agente tensioactivo, un agente co-tensioactivo y un electrolito. El hecho que la microemulsión sea de tipo agua-en-aceite (ag/ac) o aceite-en-agua (ac/ag) depende de las propiedades del aceite y agente tensioactivo usados y de la estructura y la forma geométrica de las cabezas polares y

las colas de hidrocarburos de las moléculas de agente tensioactivo (Schott, en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, página 271).

El enfoque fenomenológica que utiliza diagramas de fase se ha estudiado ampliamente y ha proporcionado un conocimiento comprensible al especialista en el arte acerca de cómo formular microemulsiones (véase, por ejemplo, *Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Allen, LV., Popovich NG., y Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8ª ed.), Nueva York, NY; Rosoff, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, página 245; Block, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, página 335). En comparación con las emulsiones convencionales, las microemulsiones ofrecen la ventaja de solubilizar las drogas insolubles en agua en una formulación de gotas termodinámicamente estables que se forman espontáneamente.

Los agentes tensioactivos usados en la preparación de microemulsiones incluyen, pero en un sentido no taxativo, agentes tensioactivos iónicos, agentes tensioactivos no iónicos, Brij 96, polioxietilenoleil éteres, poliglicerol ésteres de ácidos grasos, 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), solos o en combinación con agentes co-tensioactivos. El agente co-tensioactivo, habitualmente un alcohol de cadena corta, tal como etanol, 1-propanol y 1-butanol, sirve para aumentar la fluidez interfacial por penetración en la película de agente tensioactivo y en consecuencia crear una película desordenada debido al espacio

vacío generado entre las moléculas de agente tensioactivo. Sin embargo, las microemulsiones se pueden preparar sin el uso de agentes co-tensioactivos y en el arte se conocen sistemas de microemulsiones auto-emulsionantes libre de alcohol. La fase acuosa puede ser típicamente, pero en un sentido no limitativo, agua, una solución acuosa de la droga, glicerol, PEG300, PEG400, poligliceroles, propilenglicoles y derivados de etilenglicol. La fase de aceite puede incluir, pero en un sentido no limitativo, materiales tales como Captex 300, Captex 355, Capmul MCM, ésteres de ácidos grasos, mono, di y triglicéridos de cadena mediana (C8-C12), gliceril ésteres de ácidos grasos polioxietilados, alcoholes grasos, glicéridos poliglicolizados, C8-C10 glicéridos saturados poliglicolizados, aceites vegetales y aceite de silicona.

Las microemulsiones son de particular interés desde el punto de vista de la solubilización de la droga y la absorción mejorada de drogas. Se ha propuesto que las microemulsiones basadas en lípidos (tanto de ac/ag y ag/ac) mejoran la biodisponibilidad oral de drogas, incluyendo péptidos (véase, por ejemplo, las Patentes de los EE.UU. N°: 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 ofrecen ventajas de una solubilización mejorada de drogas, la protección de droga contra una hidrólisis enzimática, una posible mejora de la absorción de drogas debido a alteraciones inducidas por el agente tensioactivo en la fluidez y la permeabilidad de la membrana, facilidad de preparación, facilidad de administración oral ante las formas de dosificación sólidas, potencia clínica mejorada y mejor toxicidad (véase, por ejemplo, las Patentes de los EE.UU. N°: 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). Las microemulsiones a menudo se pueden formar

espontáneamente cuando sus componentes se reúnen a temperatura ambiente. Esto puede resultar particularmente ventajoso cuando se formulan drogas termolábiles, péptidos o ARNi. Las microemulsiones también son efectivas en la administración transdérmica de los componentes activos en aplicaciones tanto cosméticas como farmacéuticas. Se espera que las composiciones y formulaciones en microemulsión de la presente invención puedan facilitar una mayor absorción sistémica de los ARNi y ácidos nucleicos desde el tracto gastrointestinal, así como mejorarán la captación celular local de los ARNi 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 penetración para mejorar las propiedades de la formulación y para aumentar la absorción de los ARNi y ácidos nucleicos de la presente invención. Los potenciadores de penetración usados en las microemulsiones de la presente invención se pueden clasificar como pertenecientes a uno de cinco grandes categorías: agentes tensioactivos, ácidos grasos, sales biliares, agentes quelantes y agentes no quelantes no tensioactivos (Lee *et al.*, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, página 92). Cada una de estas clases ya se describió precedentemente.

iii. Micropartículas

El agente de ARNi de la invención se puede incorporar en una partícula, por ejemplo, una micropartícula. Las micropartículas se pueden producir mediante secado por aspersión, pero también se pueden producir mediante otros métodos incluyendo liofilización, evaporación, secado en lecho fluido, secado bajo vacío o una combinación de estas técnicas.

iv. Potenciadores de penetración

En una forma de realización, la presente invención emplea diversos potenciadores de penetración para lograr una administración eficiente de ácidos nucleicos, en particular de los ARNi, en la piel de animales. La mayoría de las drogas está presente en solución en ambas formas ionizada y no ionizada. Sin embargo, habitualmente sólo las drogas solubles en lípidos o lipofílicas pueden cruzar fácilmente las membranas celulares. Se ha descubierto que aún las drogas no lipofílicas pueden cruzar las membranas celulares si la membrana a cruzar es tratada con un potenciador de penetración. Además de ayudar en la difusión de drogas no lipofílicas a través de las membranas celulares, los potenciadores de penetración también mejoran la permeabilidad de las drogas lipofílicas.

Los potenciadores de penetración se pueden clasificar como pertenecientes a una de cinco grandes categorías, es decir, agentes tensioactivos, ácidos grasos, sales biliares, agentes quelantes y agentes no quelantes no tensioactivos (véase, por ejemplo, Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, Nueva York, NY, 2002; Lee *et al.*, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, página 92). Cada una de las clases de potenciadores de penetración mencionadas precedentemente se describirá a continuación con mayor detalle.

Los agentes tensioactivos (o "agentes de superficie activa") 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 mejora la absorción de los ARNi a través de la mucosa. Además de las sales biliares y los ácidos grasos, estos potenciadores de penetración incluyen, por ejemplo, laurilsulfato de sodio, polioxietilen-9-lauril éter y polioxietilen-20-cetil éter) (véase, por ejemplo, Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, Nueva York, NY, 2002; Lee *et al.*, *Critical Reviews in Therapeutic Drug*

Carrier Systems, 1991, página 92); y emulsiones perfluoroquímicos, tal como FC-43. Takahashi *et al.*, *J. Pharm. Pharmacol.*, 1988, 40, 252).

Los diversos ácidos grasos y sus derivados que actúan como potenciadores de 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, mono-oleína (1-mono-oleoil-rac-glicerol), dilaurina, ácido caprílico, ácido araquidónico, 1-monocaprato de glicerol, 1-dodecilazacicloheptan-2-ona, acilcarnitinas, acilcolinas, C₁₋₂₀ alquil ésteres de los mismos (por ejemplo, metil, isopropil y t-butil), y mono- y di-glicéridos de los mismos (es decir, oleato, laurato, caprato, miristato, palmitato, estearato, linoleato, *etc.*) (véase, por ejemplo, Touitou, E., *et al.*, *Enhancement in Drug Delivery*, CRC Press, Danvers, MA, 2006; Lee *et al.*, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, página 92; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33; El Hariri *et al.*, *J. Pharm. Pharmacol.*, 1992, 44, 651-654).

El rol fisiológico de la bilis incluye la facilitación de la dispersión y absorción de lípidos y vitaminas solubles en grasas (véase, por ejemplo, Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, Nueva York, NY, 2002; Brunton, Capítulo 38 en: Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9ª Ed., Hardman *et al.*, Eds., McGraw-Hill, Nueva York, 1996, páginas 934-935). Diversas sales biliares naturales, y sus derivados sintéticos, actúan como potenciadores de penetración. Por consiguiente, 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 farmacéuticamente aceptable de sodio, colato de sodio), ácido dehidrocólico (dehidrocolato de sodio), ácido desoxicólico (desoxicolato de sodio), ácido glucólico

(glucolato de sodio), ácido glicólico (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), tauro-24,25-dihidrofusidato de sodio (STDHF), glicodihidrofusidato de sodio y polioxietilen-9-lauril éter (POE) (véase, por ejemplo, Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, Nueva York, NY, 2002; Lee *et al.*, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, página 92; Swinyard, Capítulo 39, en: *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18ª Ed., Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990, páginas 782-783; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33; Yamamoto *et al.*, *J. Pharm. Exp. Ther.*, 1992, 263, 25; Yamashita *et al.*, *J. Pharm. Sci.*, 1990, 79, 579-583).

Los agentes quelantes, según se usan con relación a la presente invención, se pueden definir como compuestos que eliminan a los iones metálicos de una solución por formación de complejos con la misma, con el resultado que mejoran la absorción de los ARNi 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 también servir como un inhibidor de DNasa, ya que la mayoría de las ADN nucleasas caracterizadas requiere de un ion metálico divalente para la catálisis y por consiguiente son inhibidas por los agentes quelantes (Jarrett, *J. Chromatogr.*, 1993, 618, 315-339). Los agentes quelantes adecuado incluyen, pero en un sentido no taxativo, etilendiamintetraacetato disódico (EDTA), ácido cítrico, salicilatos (por ejemplo, salicilato, 5-metoxisalicilato y homovanilato de sodio), derivados N-acilo de colágeno, lauret-9 y derivados N-amino acilo de beta-dicetonas (enaminas)(véase, por ejemplo, Katdare, A. *et al.*, *Excipient development for pharmaceutical, biotechnology*,

and drug delivery, CRC Press, Danvers, MA, 2006; Lee *et al.*, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, página 92; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33; Buur *et al.*, *J. Control Rel.*, 1990, 14, 43-51).

Según se usan en la presente, los compuestos potenciadores de la penetración no quelantes no tensioactivos se pueden definir como compuestos que presentan una actividad insignificante como agentes quelantes o como agentes tensioactivos pero que no obstante mejoran la absorción de los ARNi por la mucosa alimentaria (véase, por ejemplo, Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33). Esta clase de potenciadores de penetración incluye, por ejemplo, ureas cíclicas insaturadas, derivados 1-alkil- y 1-alkenil-azaciclo-alcanona (Lee *et al.*, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, página 92); y agentes anti-inflamatorios no esteroideos tales como diclofenac sódico, indometacina y fenilbutazona (Yamashita *et al.*, *J. Pharm. Pharmacol.*, 1987, 39, 621-626).

Los agentes que mejoran la captación de los ARNi a nivel celular también se pueden agregar a las composiciones farmacéuticas y otras composiciones de la presente invención. Por ejemplo, también se sabe que los lípidos catiónicos, tal como lipofectina (Junichi *et al.*, Patente de los EE.UU. N°: 5.705.188), derivados de glicerol catiónicos y moléculas policationicas, tal como la polilisina (Lollo *et al.*, Solicitud PCT WO 97/30731) mejoran la captación celular de los ARNcd. Los ejemplos de reactivos de transfección disponibles comercialmente incluyen, por ejemplo Lipofectamina™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), Lipofectamina 2000™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), 293fectin™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), Cellfectin™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), DMRIE-C™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), FreeStyle™ MAX (Invitrogen; Carlsbad, CA), Lipofectamina™ 2000 CD (Invitrogen; Carlsbad, CA), Lipofectamina™ (Invitrogen;

Carlsbad, CA), RNAiMAX (Invitrogen; Carlsbad, CA), Oligofectamina™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), Optifect™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), reactivo de transfección XtremeGENE Q2 (Roche; Grenzacherstrasse, Suiza), reactivo de transfección liposómico DOTAP (Grenzacherstrasse, Suiza), reactivo de transfección liposómico 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; Madison, WI), DreamFect™ (OZ Biosciences; Marseille, Francia), EcoTransfect (OZ Biosciences; Marseille, Francia), reactivo de transfección TransPass^a D1 (New England Biolabs; Ipswich, MA, EE.UU.), LyoVec™/LipoGen™ (Invitrogen; San Diego, CA, EE.UU.), reactivo de transfección PerFectin (Genlantis; San Diego, CA, EE.UU.), reactivo de transfección NeuroPORTER (Genlantis; San Diego, CA, EE.UU.), reactivo de transfección GenePORTER (Genlantis; San Diego, CA, EE.UU.), reactivo de transfección GenePORTER 2 (Genlantis; San Diego, CA, EE.UU.), reactivo de transfección Citofectin (Genlantis; San Diego, CA, EE.UU.), reactivo de transfección BaculoPORTER (Genlantis; San Diego, CA, EE.UU.), reactivo de transfección TroganPORTER™ (Genlantis; San Diego, CA, EE.UU.), RiboFect (Bioline; Taunton, MA, EE.UU.), PlasFect (Bioline; Taunton, MA, EE.UU.), UniFECTOR (B-Bridge International; Mountain View, CA, EE.UU.), SureFECTOR (B-Bridge International; Mountain View, CA, EE.UU.) o HiFect™ (B-Bridge International, Mountain View, CA, EE.UU.), entre otros.

Se pueden utilizar otros agentes para mejorar la penetración de los ácidos nucleicos administrados, incluyendo glicoles tales como etilenglicol y propilenglicol, pirroles tales como 2-pirrol, azonas y terpenos tales como limoneno y mentona.

v. *Vehículos*

En determinadas composiciones de la presente invención también se incorporan compuestos de vehículo en la formulación. Según se usa en la presente, un “compuesto vehículo” o “vehículo” se refiere a un ácido nucleico, o un análogo del mismo, que es inerte (es decir, que no tiene actividad biológica *per se*) pero que es reconocido como un ácido nucleico por los procesos *in vivo* que reducen la biodisponibilidad de un ácido nucleico que tiene actividad biológica, por ejemplo, por degradación del ácido nucleico biológicamente activo o porque promueve su eliminación de la circulación. La co-administración de un ácido nucleico y un compuesto vehículo, típicamente con un exceso de esta última sustancia, puede dar como resultado una reducción sustancial de la cantidad de ácido nucleico recuperada en hígado, riñón u otros reservorios extracirculatorios, presumiblemente debido a la competencia entre el compuesto vehículo y el ácido nucleico por un receptor común. Por ejemplo, se puede reducir la recuperación de un ARNcd fosforotioato parcial en tejido hepático cuando se co-administra con ácido poliinosínico, sulfato de dextrano, ácido policítidico o ácido 4-acetamido-4'isotiociano-estilben-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

A diferencia de un compuesto vehículo, un “vehículo farmacéutico” o “excipiente” es un solvente, un agente de suspensión o cualquier otro vehículo farmacológicamente inerte farmacéuticamente aceptable para administrar uno o más ácidos nucleicos a un animal. El excipiente puede ser líquido o sólido y se selecciona, teniendo en mente la manera de administración, para proporcionar el volumen, la consistencia, etc, deseados cuando se combina con un ácido nucleico y con los demás componentes de una composición farmacéutica dada. Los vehículos farmacéuticos

típicos incluyen, pero en un sentido no taxativo, agentes de unión (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa, *etc.*); rellenos (por ejemplo, lactosa y otros azúcares, celulosa microcristalina, pectina, gelatina, sulfato de calcio, etilcelulosa, poliacrilatos o fosfato ácido de calcio, *etc.*); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco, sílica, dióxido de silicona coloidal, ácido esteárico, estearatos metálicos, aceites vegetales hidrogenados, almidón de maíz, polietilenglicoles, benzoato de sodio, acetato de sodio, *etc.*); desintegrantes (por ejemplo, almidón, almidón glicolado de sodio, *etc.*); y agentes humectantes (por ejemplo, laurilsulfato de sodio, *etc.*).

Los excipientes orgánicos o inorgánicos farmacéuticamente aceptables adecuados para una administración no parenteral que no reaccionan adversamente con ácidos nucleicos también se pueden usar para formular las composiciones de la presente invención. Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, pero en un sentido no taxativo, agua, soluciones de sales, alcoholes, polietilenglicoles, gelatina, lactosa, amilosa, estearato de magnesio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona y semejantes.

Las formulaciones para una 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 los ácidos nucleicos en bases de aceite líquidas o sólidas. Las soluciones también pueden contener soluciones amortiguadoras, diluyentes y otros aditivos adecuados. Se pueden usar excipientes orgánicos o inorgánicos farmacéuticamente aceptables adecuados para una administración no parenteral que no reaccionan adversamente con ácidos nucleicos.

Los excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, pero en un sentido no taxativo, agua, soluciones de sales, alcohol, polietilenglicoles, gelatina,

lactosa, amilosa, estearato de magnesio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona y semejantes.

vii. Otros componentes

Las composiciones de la presente invención pueden contener además otros componentes adjuntos presentes convencionalmente en las composiciones farmacéuticas, a los niveles de uso establecidos en el arte. Así, por ejemplo, las composiciones pueden contener materiales adicionales, compatibles, farmacéuticamente activas, tales como, por ejemplo, antiprurífticos, astringentes, anestésicos locales o agentes anti-inflamatorios, o pueden contener materiales adicional de utilidad en la formulación física de diversas formas de dosificación de las composiciones de la presente invención, tales como colorantes, agentes saborizantes, conservantes, antioxidantes, opacantes, agentes espesantes y estabilizantes. Sin embargo, cuando se agregan tales materiales, 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 deseara, mezclar con agentes auxiliares, por ejemplo, lubricantes, conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, sales para afectar la presión osmótica, soluciones amortiguadoras, colorantes, sustancias saborizantes y/o aromáticas y semejantes que no interactúan adversamente con los ácidos nucleicos de la formulación.

Las suspensiones acuosas pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión incluyendo, por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol y/o dextrano. La suspensión también puede contener estabilizantes.

En algunas formas de realización, las composiciones farmacéuticas presentadas en la invención incluyen (a) uno o más compuestos de ARNi y (b) uno o más agentes que funcionan mediante un mecanismo distinto del ARNi y que son de

utilidad en el tratamiento de un trastorno de sangrado. Los ejemplos de dichos agentes incluyen, pero en un sentido no taxativo, un agente anti-inflamatorio, un agente anti-esteatosis, un agente anti-viral y/o un agente anti-fibrosis. Además, también se pueden usar otras sustancias usadas comúnmente como hepatoprotectores, tal como silimarina, junto con los ARNi descritos en la presente. Otros agentes de utilidad para tratar enfermedades del hígado incluyen telbivudina, entecavir e inhibidores de proteasa tal como telaprevir y otros que se divulgan, por ejemplo, en Tung *et al.*, publicaciones de Solicitudes de Patente de los EE.UU. N°: 2005/0148548, 2004/0167116 y 2003/0144217; y en Hale *et al.*, publicación de Solicitud de Patente de los EE.UU. N°: 2004/0127488.

La toxicidad y la eficacia terapéutica de dichos compuestos se pueden determinar empleando procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o en animales experimentales, por ejemplo, para determinar la LD₅₀ (la dosis letal para el 50% de la población) y la ED₅₀ (la dosis con efectividad terapéutica en el 50% de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y se puede expresar con la relación LD₅₀ /ED₅₀. Se prefieren los compuestos con mayores índices terapéuticos.

Los datos obtenidos de dichos ensayos de cultivos celulares y estudios en animales se pueden utilizar para formular un rango de dosificación para utilizar en seres humanos. La dosificación de las composiciones presentadas en la presente invención generalmente se encuentra en un rango de concentraciones en circulación que incluyen a la ED₅₀ con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este rango dependiendo de la forma de dosificación empleada y la ruta de administración utilizada. Para cualquier compuesto de los que se utilizan en los métodos presentados en la invención, la dosis terapéuticamente eficaz se puede

estimar inicialmente a partir de ensayos de cultivos celulares. En los modelos en animales, la dosis se puede formular para obtener un rango de concentración circulante en plasma del compuesto o, cuando fuera apropiado, del producto polipeptídico de una secuencia blanco (por ejemplo, para obtener una menor concentración del polipéptido) que incluye al valor de IC50 (es decir, la concentración del compuesto de prueba que permite una inhibición medio máxima de los síntomas) determinada en un cultivo celular. Dicha información se puede utilizar para determinar más exactamente las dosis útiles en humanos. Los niveles en plasma se pueden medir, por ejemplo, con cromatografía líquida de alta presión.

Además de su administración, como se describió previamente, los ARNi presentados en la invención se pueden administrar en combinación con otros agentes conocidos que son efectivos en el tratamiento de procesos patológicos mediados por la expresión de Serpinc1. En cualquier caso, el médico a cargo de la administración puede ajustar la cantidad y el programa de administración de ARNi sobre la base de los resultados observados usando mediciones estándar de la eficacia conocidos en el arte o que se describen en la presente.

VI. Kits

La presente invención también provee kits para llevar a cabo cualquiera de los métodos de la invención. Dichos kits incluyen uno o más agentes de ARNi e instrucciones para su uso, por ejemplo, instrucciones para administrar una cantidad profilácticamente o terapéuticamente eficaz de uno o más agentes de ARNi. Los kits pueden comprender opcionalmente además medios para poner en contacto a la célula con el agente de ARNi (por ejemplo, un dispositivo de inyección), o medios para medir la inhibición de Serpina1 (por ejemplo, medios para medir la inhibición de ARNm de Serpinc1, proteínas

Serpinc1 y/o actividad de Serpinc1). Dichos medios para medir la inhibición de Serpinc1 pueden comprender medios para obtener una muestra de un sujeto, tal como, por ejemplo, una muestra de plasma. Los kits de la invención opcionalmente pueden comprender además medios para determinar dicha cantidad terapéuticamente eficaz o profilácticamente eficaz.

A menos que se definan de otro modo, todos los términos científicos y técnicos usados en la presente tienen el mismo significado que le dan los especialistas en la técnica a la que concierne esta invención. Aunque se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes de aquellos que se describen en la presente en la práctica o para evaluar los ARNi y los métodos presentados en la invención, más adelante se describen los métodos y los materiales adecuados. Todas las publicaciones, solicitudes de patente, patentes y otras referencias mencionadas aquí se incorporan por completo en la presente a modo de referencia. Además, los materiales, los métodos y los ejemplos solamente se ofrecen a efectos ilustrativos y no en un sentido limitativo.

EJEMPLOS

Tabla 1: Abreviaturas de los monómeros de nucleótidos usados en la representación de las secuencias de los ácidos nucleicos. Se comprenderá que estos monómeros, cuando están presentes en un oligonucleótido, están unidos mutuamente por medio de enlaces fosfodiéster 5'-3'.

Abreviatura	Nucleótido(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

Abreviatura	Nucleótido(s)
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 nucleótido (G, A, C, T o U)
a	2'-O-metiladenosina-3'-fosfato
as	2'-O-metiladenosina-3'- fosforotioato
c	2'-O-metilcitidina-3'-fosfato
cs	2'-O-metilcitidina-3'- fosforotioato
g	2'-O-metilguanosina-3'-fosfato
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-alquil)-amidodecanoil)]-4-hidroxiprolinol Hyp- (GalNAc-alquilo) ₃

Ejemplo 1: Administración de una dosis individual de AT3SC-001 a sujetos humanos sanos

A veinticuatro humanos sanos voluntarios, en cohortes de 3:1 (activo:placebo), se les administró una dosis individual de 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,6 mg/kg, o 1,0 mg/kg de AT3SC-001 (sentido (5' a 3'): GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAfL96 (SEQ ID N°: 13); antisentido (5' a 3'): usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg (SEQ ID N°: 14)). Se recolectaron muestras de plasma a los días 0, 1, 2, 3, 7, 10, 14, 21, 28, 42, 56, y 70 después de la administración para monitorear los niveles de proteína AT,

actividad de AT, y duración del silenciamiento de la proteína AT. Los niveles de proteína AT se monitorearon usando ELISA y los niveles de actividad de AT se monitorearon por generación de curvas de generación de trombina usando un Trombinoscopia Automatizado Calibrado (factor tisular = 1pM). Se calculó las veces de cambio en la trombina pico en relación al valor de trombina pico promedio para dos valores predosis para cada sujeto.

No hubo eventos adversos serios, hubo 3 eventos adversos leves que probablemente no estuvieron relacionados con la administración del agente, y 1 evento adverso leve (dolor de cabeza) que potencialmente estuvo relacionado con la administración del agente. Tampoco hubo reacciones en el sitio de inyección y los exámenes físicos, signos vitales, y electrocardiogramas de todos los sujetos estuvieron dentro de los límites normales. Además, todas las pruebas de función hepática, niveles de bilirrubina total, índices normalizados internacionales de tiempos de protrombina (PT/INR), recuento de plaquetas, niveles de hemoglobina, y pruebas de coagulación (es decir, tiempos de trombotoplastina parcial activada (APTT), tiempos de protrombina (PT), niveles de fibrinógeno, y niveles de dímeros D de fibrina) de todos los sujetos no cambiaron durante el curso del estudio y estuvieron dentro de los límites normales.

En las Figuras 1A – D y 2A – B se muestra que una dosis individual de 0,03 mg/kg de AT3SC-001 produjo aproximadamente un 20% y hasta un 33% de reducción en los niveles de proteína AT (Figuras 2A y 2B) y una correspondiente reducción en la actividad de AT (Figuras 1A – D) con una durabilidad de la disminución mayor a los 60 días.

En la Figura 3 también se demuestra que hay una asociación

significativa entre el noqueo de AT y la generación del pico de trombina. Específicamente, se observó un aumento de hasta 152% en la generación de trombina pico, con un aumento máximo medio de trombina pico de 138% $\pm$ 8,9% (media $\pm$ SEM). Además, y consistente con una generación de trombina aumentada con noqueo aumentado de AT, los niveles de Factor VIII o IX fueron normales.

Ejemplo 2: Administración de dosis múltiples de AT3SC-001 a pacientes humanos que padecen de hemofilia A o B

Fase I: Partes B, C y D del ensayo clínico

En la Parte B de un Ensayo clínico en Fase I de AT3SC-001 (sentido (5' a 3'): GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAfL96 (SEQ ID N°: 13); antisentido (5' a 3'): usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg (SEQ ID N°: 14)), se administró a tres pacientes que padecen hemofilia A (n=2) o B (n=1) de manera subcutánea 0,015 mg/kg por semana durante tres semanas (15 microgramos/kg qw x 3; 15 mcg/kg) de AT3SC-001; se administró a seis pacientes que padecen hemofilia A de manera subcutánea 0,045 mg/kg por semana durante tres semanas (45 microgramos/kg qw x 3; 45 mcg/kg) de AT3SC-001; y se administró a tres pacientes que padecen hemofilia A (n=2) o B (n=1) de manera subcutánea 0,075 mg/kg por semana durante tres semanas (75 microgramos/kg qw x 3; 75 mcg/kg) de AT3SC-001.

En la Parte C de un Ensayo clínico en Fase I de AT3SC-001 (sentido (5' a 3'): GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAfL96 (SEQ ID N°: 13); antisentido (5' a 3'): usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg (SEQ ID N°: 14)), se administró a tres pacientes que padecen hemofilia A (n=2) o B (n=1) de manera subcutánea una dosis mensual de 0,225 mg/kg de AT3SC-001 durante tres

meses (225 microgramos/kg qm x 3; 225 mcg/kg); se administró a tres pacientes que padecen hemofilia A (n=2) o B (n=1) de manera subcutánea una dosis mensual de 0,450 mg/kg de AT3SC-001 durante tres meses (450 microgramos/kg qm x 3; 450 mcg/kg); se administró a tres pacientes que padecen hemofilia A de manera subcutánea una dosis mensual de 0,900 mg/kg de AT3SC-001 durante tres meses (900 microgramos/kg qm x 3; 900 mcg/kg); se administró a tres pacientes que padecen hemofilia A de manera subcutánea una dosis mensual de 1,800 mg/kg de AT3SC-001 durante tres meses (1800 microgramos/kg qm x 3; 1800 mcg/kg); y se administró a seis pacientes que padecen hemofilia A (n=3) o B (n=3) de manera subcutánea una dosis fija mensual de 80 mg de AT3SC-001 durante tres meses (80 mg qM x 3).

En la Parte D de un Ensayo clínico en Fase I de AT3SC-001 (sentido (5' a 3'): GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAfL96 (SEQ ID N°: 13); antisentido (5' a 3'): usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg (SEQ ID N°: 14)), se administró a seis pacientes con inhibidores que padecen hemofilia A (n=5) o B (n=1) y que utilizan agentes de derivación (BPA) para el manejo del sangrado de manera subcutánea con una dosis fija de 50 mg de AT3SC-001 mensualmente durante tres meses (50 mg qM x 3); y se administró a 10 pacientes que padecen hemofilia A y que utilizan agentes de derivación (BPA) para el manejo del sangrado de manera subcutánea con una dosis fija de 80 mg de AT3SC-001 mensualmente durante tres meses (80 mg qM x 3).

Se recolectaron muestras de plasma después de la administración de AT3SC-001 para monitorear los niveles de proteína AT, actividad de AT, y duración del silenciamiento de la proteína AT. Los niveles de proteína AT se monitorearon usando ELISA y los niveles de actividad de AT se monitorearon

mediante la generación de curvas de generación de trombina usando un Trombinoscopio Automatizado Calibrado (factor tisular = 1pM). Se calculó las veces de cambio en la trombina pico en relación al valor de trombina pico promedio para dos valores predosis para cada sujeto.

Las características demográficas y basales de los pacientes que participaron en las Partes B, C, y D del estudio se proveen en la Tabla 2.

Tabla 2. Características demográficas y basales de los participantes en el estudio

	Parte B Subcutáneo Por semana × 3			Parte C Subcutáneo Mensualmente × 3				Parte D Subcutáneo Mensualmente × 3		
	15 mc g/kg g N=3	45 mc g/kg g N=6	75 mc g/kg g N=3	22 5 mc g/kg g N=3	450 mc g/kg g N=3	900 mc g/kg g N=3	180 0 mcg /kg N=3	80 mg N=6	50 mg N=6	80 mg N=10
Edad, media (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
Severa Moderada	3 0	6 0	3 0	2 1	3 0	2 1	3 0	5 1	6 0	10 0
Peso (kg) [media ± DE]	76 (10)	80 (22)	82 (8)	85 (12)	76 (16)	76 (2)	71 (12)	74 (10)	73 (17)	73
Historia clínica de Hepatitis C									3	9

Para las Partes B, C, y D del estudio, no hubo eventos adversos serios, no hubo discontinuaciones, no hubo reacciones en el sitio de inyección y los exámenes físicos, signos vitales, y electrocardiogramas de todos los pacientes estuvieron dentro de los límites normales. Además, todas las pruebas de la función hepática, y recuento sanguíneos completos de todos los pacientes no cambiaron durante el curso del estudio y estuvieron dentro de los límites normales. Tampoco hubo eventos tromboembólicos durante el curso de este estudio y no hubo aumentos clínicamente significativos en el nivel de dímero D de fibrina en cualquiera de los pacientes. Cualquier evento de sangrado fue manejado con éxito con administración de factor de reemplazo estándar o agente de derivación. Más aún, no hubo casos de formación de anticuerpo dirigido contra el fármaco (ADA).

El noqueo de los niveles de AT en las cohortes de 15 mcg/kg, 45 mcg/kg, y 75 mcg/kg, mostrado como la media del noqueo de AT en relación al nivel basal, se describe en la Figura 4. En la Figura 4 se demuestra que las dosis semanales de 0,015 mg/kg durante tres semanas de AT3SC-001 produjeron un noqueo de AT máximo medio de $29\% \pm 12\%$ (media $\pm$ SEM). El noqueo máximo de AT fue de hasta 53%. En la Figura 4 también se demuestra que las dosis semanales de 0,045 mg/kg durante tres semanas de AT3SC-001 produjeron un noqueo de AT máximo medio de $55 \pm 9\%$ (media $\pm$ SEM) y un noqueo máximo de AT de 86%. Además, en la Figura 4 también se demuestra que las dosis semanales de 0,075 mg/kg durante tres semanas de AT3SC-001 produjeron un noqueo de AT máximo medio de $61 \pm 8\%$ (media $\pm$ SEM) y un noqueo máximo de AT de 74%.

El noqueo de los niveles de AT en las cohortes de 225 mcg/kg, 450

mcg/kg, 900 mcg/kg, 1800 mcg/kg, y 80 mg, mostrado como un noqueo medio de AT en relación al nivel basal, se describe en la Figura 5A. En la Figura 5A se demuestra que las dosis mensuales de 0,225 mg/kg durante tres meses de AT3SC-001 produjeron un noqueo de AT máximo medio de $70\% \pm 9\%$ (media $\pm$ SEM). El noqueo máximo de AT fue de hasta 80%. En la Figura 5A también se demuestra que las dosis mensuales de 0,450 mg/kg durante tres meses de AT3SC-001 produjeron un noqueo de AT máximo medio de $77 \pm 5\%$ (media $\pm$ SEM) y un noqueo máximo de AT de 85%. Además, en la Figura 5A también se demuestra que las dosis mensuales de 0,900 mg/kg durante tres meses de AT3SC-001 produjeron un noqueo de AT máximo medio de $78 \pm 7\%$ (media $\pm$ SEM) y un noqueo máximo de AT de 88%. Además, en la Figura 5A se demuestra que las dosis mensuales de 1,800 mg/kg durante tres meses de AT3SC-001 produjeron un noqueo de AT máximo medio de $79 \pm 3\%$ (media $\pm$ SEM) y un noqueo máximo de AT de 84%. En la Figura 5A también se demuestra que las dosis mensuales de 80 mg durante tres meses de AT3SC-001 produjeron un noqueo de AT máximo medio de $87 \pm 1\%$ (media $\pm$ SEM).

Tal como se demuestra en la Figura 5B, en la cual se grafica la dosis de AT3SC-001 respecto al mínimo relativo de los niveles de proteína AT, la administración de AT3SC-001 a pacientes humanos disminuye los niveles de proteína AT de una manera dependiente de la dosis.

La evaluación de la generación de trombina en humanos sanos voluntarios (Ejemplo 1) y pacientes que padecen hemofilia A o B demostró que las dosis semanales de AT3SC-001 produjeron hasta un 334% de aumento (en relación al nivel basal) en la generación de trombina en pacientes con hemofilia con un aumento medio en la generación de trombina de $112 \pm 38\%$ ($p < 0,05$),

en relación al nivel basal cuando se noqueó AT en $\geq 50\%$ (Figura 6B). En la Figura 6A se demuestra que el pico máximo de trombina alcanzado en pacientes con Hemofilia A o B administrados con dosis semanales de AT3SC-001 estuvo en el rango bajo de generación de trombina en sujetos normales.

El análisis de tromboelastometría ROTEM® (véase, por ejemplo, Young, y col., (2013) *Blood* 121:1944) de sangre entera de un sujeto (sujeto 101-009) demuestra que la administración de AT3SC-001 a 0,045 mg/kg por semana durante tres semanas no solo produce un aumento en el pico de generación de trombina, sino que también produce una mejora marcada y durable en la formación de coágulo en sangre entera como lo demuestra la disminución en el tiempo de formación de coágulo y tiempo de coagulación (Figura 7). El sujeto 101-009 no ha tenido eventos de sangrado desde el día 2 y actualmente lleva 47 días libre de sangrado.

Un análisis post-hoc de generación de trombina por Cuartiles que disminuyen AT (Partes B y C) demuestra que, en el cuartil de disminución de AT más alto ($>75\%$ de disminución de AT), hay un aumento del 289% en la generación media de trombina con relación al nivel basal (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 AT3SC-001 y la administración de Factor VIII. Brevemente, se administró Factor VIII a cada uno de los tres pacientes y se recolectó plasma de los pacientes a las -0,5, 1, 2, 6, 24, y 48 horas posteriores a la administración. Las muestras de cada sujeto se analizaron para evaluar los niveles de Factor VIII y los niveles de generación de trombina y se usaron para

establecer relaciones individualizadas de Factor VIII-generación de trombina pico. Este dato se usó luego para la comparación con los niveles pico de generación de trombina obtenidos con la administración de AT3SC-001. Tal como se muestra en las Figuras 10A-10C, la administración de AT3SC-001 es suficiente para lograr niveles pico de generación de trombina en el sujeto y aproximadamente el mismo nivel obtenido por la administración al sujeto de Factor VIII y suficiente para lograr niveles mayores de generación de trombina pico que aproximadamente 40% en el sujeto.

Un análisis post-hoc de los eventos de sangrado por cuartil de disminución de AT (Partes B y C) demuestra que hay una tendencia reducida al sangrado al aumentar los niveles de disminución de AT, con una media estimada del índice de sangrado anual (ABR) de 5 ± 2 (mediana = 1) en el mayor cuartil de disminución de AT (Figura 11). Este análisis incluye más de 1100 días acumulados con disminución de AT >75% en 16 pacientes.

También se realizó un análisis post-hoc de los eventos de sangrado en la cohorte Parte C. En la Figura 12 se proveen los datos del paciente usados para este análisis. Tal como se demuestra en la Figura 13A, el ABR medio histórico de todos los pacientes enrolados en la Cohorte C y que recibieron factores de reemplazo profilácticos (PPx) fue 2, y el ABR medio histórico de todos los pacientes enrolados en la Cohorte C y que recibieron factores de reemplazo a demanda (OD) fue 28. La administración de AT3SC-001 a estos pacientes produjo una reducción significativa en la mediana del ABR. En particular, la administración de AT3SC-001 produjo una mediana de 53% de los pacientes sin informar sangrados durante el periodo de observación (día 29 hasta la última visita del estudio o la última dosis + 56 días, lo que ocurriese

primero) y una mediana de 82% de los pacientes no informaron sangrados espontáneos durante el periodo de observación. En la Figura 13B se demuestra que para los pacientes que recibieron dosis mensuales de 80 mg de AT3SC-001 en la Cohorte C y que recibieron factores de reemplazo profilácticos (PPx), la mediana histórica del ABR fue 6. Luego de la administración de AT3SC-001, sin embargo, la mediana del ABR durante el periodo de observación fue 0.

La Parte D del estudio de Fase I evaluó el efecto de la administración de AT3SC-001 en pacientes que padecen hemofilia A o B que han desarrollado anticuerpos (inhibidores) contra los factores de reemplazo suministrados a los mismos y que, por consiguiente, se han vuelto refractarios al factor de coagulación de reemplazo. Por lo tanto, con el objetivo de evaluar la respuesta de trombina pico de estos pacientes, antes de la administración de AT3SC-001, se administró su agente de derivación estándar (BPA) (por ejemplo, concentrado del complejo de protrombina activado (APCC) y/o FVII activado recombinante (rFVIIa)) a los pacientes enrolados en la cohorte de 50 mg, se recolectaron muestras de plasma a las -1, 2, 6, y 24 horas posteriores a la administración de BPA, y las muestras se analizaron para evaluar la generación de trombina. Tal como se muestra en las Figuras 14A-14F, la disminución de AT y la generación de trombina en pacientes con inhibidores que recibieron AT3SC-001 son comparables con la disminución de AT y la generación de trombina observadas luego de la administración de AT3SC-001 con dosis similares en pacientes sin inhibidores. Más aún, en las Figuras 14A-14F se demuestra que la generación de trombina luego de la administración de AT3SC-001 excede de manera consistente los niveles transitorios obtenidos

con la administración de BPA.

Tal como se demuestra en la Figura 15, la dosificación subcutánea mensual de AT3SC-001 a 50 mg y 80 mg logra disminuciones de AT dependientes de la dosis de aproximadamente 80% en pacientes con inhibidores con hemofilia. Más aún, tal como se demuestra en la Figura 16, el efecto de disminución de AT obtenido en pacientes administrados con AT3SC-001 se correlaciona con generación de trombina aumentada.

También se realizó un análisis post-hoc exploratorio de los eventos de sangrado en los pacientes en la Parte D del estudio. En la Figura 17A se muestra que la administración de AT3SC-001 a pacientes con inhibidores que padecen hemofilia A o B una vez por mes con una dosis de 50 mg o 80 mg produce una reducción significativa en el ABR previo al estudio. Más aún, como se demuestra en la Figura 17B, la mediana del índice de sangrado anual (ABR) es cero para todos los pacientes con inhibidores que recibieron AT3SC-001 en la Parte D de este estudio de Fase I, y 56% de los pacientes están libres de sangrado, y 69% de los pacientes no experimentaron ningún sangrados espontáneo.

En resumen, el AT3SC-001 es bien tolerado en pacientes con hemofilia A y B con y sin inhibidores. No hubo SAE relacionados con el fármaco del estudio y no hubo eventos tromboembólicos. Los datos demuestran que hay actividad clínica y corrección del fenotipo de hemofilia en pacientes sin inhibidores. Los datos además demuestran que hay una disminución de AT y aumento en la generación de trombina dependiente de la dosis, con un régimen de dosis subcutánea una vez por mes y que la administración de una dosis fija de 50 mg o 80 mg de AT3SC-001 provee una disminución consistente de AT

de aproximadamente 80%.

Más aún, los datos demuestran que la administración de AT3SC-001 a pacientes con inhibidores resulta en la disminución de AT y generación aumentada de trombina consistente con los pacientes sin inhibidores y que los aumentos en la generación de trombina excedieron consistentemente aquellos obtenidos de manera transitoria con la administración de BPA.

Ejemplo 3: Administración de dosis múltiples de AT3SC-001 a pacientes humanos que padecen hemofilia A o B

Ensayo clínico de extensión abierto de Fase II (OLE)

En un estudio OLE de Fase II de AT3SC-001 (sentido (5' a 3'): GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAfL96 (SEQ ID N°: 13); antisentido (5' a 3'): usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg (SEQ ID N°: 14)), los pacientes con o sin inhibidores previamente administrados con AT3SC-001 en las Partes B y C de ensayos clínicos de Fase I descritos precedentemente, fueron elegibles para ser enrolados en un estudio de extensión abierto (OLE) de Fase II. A quince pacientes del estudio parte B de Fase I que padecen hemofilia A o B sin inhibidores que habían sido administrados de manera subcutánea con 0,015 mg/kg por semana durante tres semanas (15 microgramos/kg qw x 3; 15 mcg/kg) de AT3SC-001; o que habían sido administrados de manera subcutánea 0,045 mg/kg por semana durante tres semanas (45 microgramos/kg qw x 3; 45 mcg/kg) de AT3SC-001; o que habían sido administrados de manera subcutánea 0,075 mg/kg por semana durante tres semanas (75 microgramos/kg qw x 3; 75 mcg/kg) de AT3SC-001; y 18 pacientes del estudio Parte C de Fase I que padecen hemofilia A o B sin inhibidores que habían sido administrados de manera subcutánea con una

dosis mensual de 0,225 mg/kg de AT3SC-001 durante tres meses (225 microgramos/kg qm x 3; 225 mcg/kg); o que habían sido administrados de manera subcutánea con una dosis mensual de 0,450 mg/kg de AT3SC-001 durante tres meses (450 microgramos/kg qm x 3; 450 mcg/kg); o que habían sido administrados de manera subcutánea con una dosis mensual 0,900 mg/kg de AT3SC-001 durante tres meses (900 microgramos/kg qm x 3; 900 mcg/kg); o que habían sido administrados de manera subcutánea con una dosis mensual de 1,800 mg/kg de AT3SC-001 durante tres meses (1800 microgramos/kg qm x 3; 1800 mcg/kg); o que habían sido administrados de manera subcutánea con una dosis fija mensual de 80 mg de AT3SC-001 durante tres meses (80 mg qM x 3); y 16 pacientes del estudio Parte D de Fase I que padecen hemofilia A o B con inhibidores que habían sido administrados de manera subcutánea con una dosis fija mensual de 50 mg de AT3SC-001 durante tres meses (50 mg qM x 3); o que habían sido administrados de manera subcutánea con una dosis fija mensual de 80 mg de AT3SC-001 durante tres meses (80 mg qM x 3) fueron elegibles para ser enrolados en este estudio.

Se enrolaron treinta y tres pacientes en este estudio con 29 pacientes que continuaron el estudio y 5 pacientes que discontinuaron (4 debido a retiro del consentimiento y 1 debido a AE). Diez pacientes que padecen hemofilia A (n=7) o Hemofilia B (n=3) sin inhibidores fueron administrados de manera subcutánea con una dosis mensual fija de 50 mg de AT3SC-001 durante tres meses (50 mg qM x 3); y 9 pacientes que padecen hemofilia A (n=7) o Hemofilia B (n=2) sin inhibidores, fueron administrados de manera subcutánea con una dosis mensual fija de 80 mg de AT3SC-001 durante tres meses (50 mg

qM x 3). De manera similar, 3 pacientes que padecen hemofilia A (n=3) con inhibidores fueron administrados de manera subcutánea con una dosis mensual fija de 50 mg de AT3SC-001 durante tres meses (50 mg qM x 3); y 11 pacientes que padecen hemofilia A (n=11) o Hemofilia B (n=1) con inhibidores fueron administrados de manera subcutánea con una dosis mensual fija de 80 mg de AT3SC-001 durante tres meses (50 mg qM x 3). Las características demográficas y basales y la duración de la exposición a AT3SC-001 de los pacientes enrolados en este estudio se muestran en la Tabla 3 a continuación.

Tabla 3. Características demográficas y basales de los participantes en el estudio

	Pacientes sin Inhibidores		Pacientes con Inhibidores	
	50 mg [†] N=10	80 mg [†] N = 9	50 mg [†] N=3	80 mg [†] N=11
Edad, años; media (rango)	36 (19 – 61)	40 (24 – 58)	31 (22 – 36)	34 (21 – 41)
Peso, kg; media (rango)	78 (58 – 94)	73 (58 – 80)	82 (70 – 100)	72 (52 – 108)
Hemofilia A Hemofilia B	7 3	7 2	3 -	10 1
Severa Moderada	9 1	7 2	3 -	11 -
Historia clínica positiva de hepatitis C	8	8	2	9
Exposición, meses; mediana (rango)	13 (5 – 20)	14 (3 – 18)	11 (5 – 12)	6 (0 – 12)

En general, el AT3SC-001 fue bien tolerado en los pacientes sin inhibidores en el estudio OLE de Fase II. Seis pacientes informaron eventos adversos serios (SAE) con 2 SAE considerados posiblemente relacionados con

la administración de AT3SC-001; un sujeto con infección crónica por HCV experimentó elevación de ALT y AST y subsiguientemente discontinuó el estudio, y un sujeto con una historia de trastorno convulsivo experimentó una convulsión con confusión en el paciente. No hubo eventos tromboembólicos o evidencia de laboratorio de formación patológica de coágulos. La mayoría de los eventos adversos (AE) tuvieron una severidad leve o moderada, y no estuvieron relacionados con la administración de AT3SC-001. Se observaron incrementos asintomáticos de alanina aminotransferasa (ALT) mayores de 3 veces el límite superior del valor normal (ULN), sin elevaciones concurrentes de bilirrubina mayores de 2 veces el ULN, en 11 pacientes, todos los cuales tienen una historia médica de infección por hepatitis C. Todos los eventos de sangrado entre administraciones fueron manejados exitosamente con el factor de reemplazo o el agente de derivación. Más aún, no hubo casos de formación de anticuerpos anti-fármaco (ADA).

Las Figuras 18, 19A y 19B demuestran adicionalmente la actividad clínica de la administración del AT3SC-001. Específicamente, según se demuestra en la Figura 18, una dosificación subcutánea mensual de AT3SC-001 a 80 mg consiguió consistentemente una disminución de la AT. Según se demuestra en la Figura 19A, una dosificación subcutánea mensual de AT3SC-001 a 50 mg o 80 mg consigue una disminución de AT dependiente de la dosis de ~80% con baja variabilidad inter paciente, y como se demuestra en la Figura 19B, una dosificación subcutánea mensual de AT3SC-001 a 50 mg o 80 mg consigue niveles de generación de trombina que se acercan al nivel inferior del rango normal.

También se llevó a cabo un análisis exploratorio post-hoc de los eventos

de sangrado en los pacientes con inhibidores y sin inhibidores en el estudio OLE de Fase II. En la Figura 20A se muestra que la administración de AT3SC-001 a los pacientes que padecen hemofilia A o B sin inhibidores una vez por mes a una dosis de 50 mg o bien de 80 mg resulta en una reducción significativa en la ABR previa al estudio, y en la Figura 20B se muestra que la administración de AT3SC-001 a los pacientes que padecen hemofilia A o B con inhibidores una vez por mes a una dosis de 50 mg o bien de 80 mg resulta en una reducción significativa en la ABR previa al estudio. Resumiendo las medianas de ABR en todos los pacientes que participan del estudio OLE, el 48% (16/33) de los pacientes estuvieron libres de sangrado durante el periodo de observación y la mediana de ABR global durante el periodo de observación fue de 1. Además, el 67% de los pacientes no informaron sangrados espontáneos durante el periodo de observación y, en forma global, la ABR durante el periodo de observación fue de 0. Las características de los eventos de sangrado experimentados por los pacientes con y sin inhibidores durante el estudio OLE se muestran en la Figura 21. Los eventos de sangrado en los sujetos se evaluaron cuando la disminución de antitrombina fue $\geq 75\%$.

En la Figura 22 se proveen los detalles del manejo de los eventos de sangrado experimentados por los pacientes con Hemofilia A o B sin inhibidores, y en la Figura 23 se proveen los detalles del manejo de los eventos de sangrado experimentados por los pacientes con Hemofilia A o B con inhibidor. En forma sorprendente, los sujetos que padecen hemofilia A o B sin inhibidores y los pacientes que padecen hemofilia A o B con inhibidores que recibieron administración de AT3SC-001 una vez por mes a una dosis de 50 mg o bien de 80 mg y que experimentaron un evento de sangrado requirieron dosis

significativamente menores de factores de reemplazo o de agente de derivación en comparación con la dosis recomendada para tratar el sangrado, por ejemplo, una dosis menor de Factor VIII o una dosis menor de aPCC.

En resumen, en general el AT3SC-001 fue bien tolerado en los pacientes con hemofilia A y B con y sin inhibidores. Además, los datos demuestran que el AT3SC-001 tiene actividad clínica debido a que la dosificación subcutánea una vez por mes a 50 mg y 80 mg consigue una disminución de AT dependiente de la dosis de ~80%, con baja variabilidad inter paciente y con niveles de generación de trombina acercándose al extremo inferior del rango normal. Más aún, el análisis exploratorio post-hoc de los eventos de sangrado en los pacientes que padecen hemofilia A o B con o sin inhibidores demuestra que la administración de AT3SC-001 redujo la mediana de ABR a 1 y la mediana de tasa de sangrado espontáneo anualizado (AsBR) a cero. Dieciséis de treinta y tres (48%) pacientes estuvieron libres de sangrado y veintidós de treinta y tres (67%) pacientes no experimentaron sangrados espontáneos durante el periodo de observación. Todos los eventos de sangrado fueron manejados exitosamente con el factor de reemplazo o el agente de derivación.

Ejemplo 4: Guía Actualizada de Dosificaciones para el Manejo del Sangrado: Reducción de Dosis de Factor de Reemplazo/Agente de Derivación

Los datos obtenidos a partir de los estudios OLE de Fase I y Fase I/II que se presentaron anteriormente, demuestran que una dosificación subcutánea de vez por mes a una dosis fija de 50 mg o 80 mg de AT3SC-001 provee una disminución consistente de la AT de aproximadamente 80% y que

hay una disminución de la AT dependiente de la dosis y un incremento de la generación de trombina en los sujetos que padecen hemofilia A o B, con y sin inhibidores.

Los datos del modelado *in silico* apoyan estas observaciones, prediciendo que existe una mayor generación de trombina en respuesta a las disminuciones de los niveles de AT, incluyendo, en algunas formas de realización, disminuciones de los niveles de AT de aproximadamente 75% o menos. Los datos obtenidos de las muestras de plasma de los pacientes con hemofilia A y B, con y sin inhibidores, muestran respuestas de mayor generación de trombina ante los factores de reemplazo y los agentes de derivación después de la dosificación de los pacientes con AT3SC-001. Más aún, los datos clínicos demuestran que los pacientes que padecen hemofilia A o B sin inhibidores (Figura 22) y los pacientes que padecen hemofilia A o B con inhibidores (Figura 23) que reciben administración de AT3SC-001 una vez por mes a una dosis de 50 mg o bien de 80 mg y que experimentaron un evento de sangrado, usaron menores dosis de factores de reemplazo o de agente de derivación en comparación con la dosis recomendada para tratar un sangrado, por ejemplo, una menor dosis de Factor VIII, o una menor dosis de Factor IX, o una menor dosis de factor IX de vida media extendida, o una menor dosis de Factor VIIa recombinante, o una menor dosis de aPCC.

Los datos clínicos adicionales de manejo de sangrado que se presentan en las Figuras 24A-24D demuestran además un tratamiento exitoso de los sangrados en los sujetos administrados con AT3SC-001 con menores cantidades de factor de reemplazo o de agente de derivación.

Por lo tanto, los datos presentados en la presente apoyan la

administración de menores dosis de factor de reemplazo o de agente de derivación a los sujetos administrados con AT3SC-001, es decir, administrados con una dosis subcutánea mensual fija de 50 mg o 80 mg, por ejemplo, en donde la administración del agente de ARNhd al sujeto disminuye la actividad de Serpinc1 en aproximadamente un 75% o más. Por ello, como se establece en la Tabla 4, se ha actualizado la guía para el manejo del sangrado en sujetos que reciben una dosis subcutánea mensual de 50 mg o 80 mg de AT3SC-001 y dichos sangrados se manejarán usando menores dosis de factor de reemplazo o de agente de derivación.

Por ejemplo, la cantidad eficaz recomendada de factor de reemplazo (Factor VIII) para tratar un sangrado, por ejemplo, un sangrado moderado o un sangrado mayor, en un sujeto que padece hemofilia A, sin inhibidores, es de aproximadamente entre 30 y 50 UI/kg. Sin embargo, un sangrado, por ejemplo, un sangrado moderado o un sangrado mayor, en un sujeto que padece hemofilia A y que se administró con una dosis subcutánea fija mensual de 50 mg o 80 mg de AT3SC-001, por ejemplo, en donde la administración del agente de ARNhd al sujeto disminuye la actividad de Serpinc1 en aproximadamente un 75% o más, se puede tratar con una dosis de entre aproximadamente 5 y aproximadamente 20 UI/kg de Factor VIII. Para los sujetos que padecen hemofilia B, sin inhibidores, la cantidad eficaz recomendada de factor de reemplazo (Factor IX o Factor IX de vida media extendida) para tratar un sangrado, por ejemplo, un sangrado mayor, es de aproximadamente entre 65 y 130 UI/kg. Sin embargo, un sangrado, por ejemplo, un sangrado mayor, en un sujeto que padece hemofilia B y que se administró con una dosis subcutánea fija mensual de 50 mg o 80 mg de AT3SC-001, por ejemplo, en donde la

administración del agente de ARNhd al sujeto disminuye la actividad de Serpinc1 en aproximadamente un 75% o más, se puede tratar con una dosis de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 30 UI/kg de Factor IX o de Factor IX de vida media extendida. Para los sujetos que padecen hemofilia A o B, con inhibidores, la cantidad eficaz recomendada del agente de derivación (concentrado del complejo de protrombina activado; aPCC) para tratar un sangrado, por ejemplo, un sangrado moderado o un sangrado mayor, es de aproximadamente 100 U/kg. Sin embargo, un sangrado, por ejemplo, un sangrado moderado o un sangrado mayor, en un sujeto que padece hemofilia A o B, con inhibidores, y que se administró con una dosis subcutánea fija mensual de 50 mg o 80 mg de AT3SC-001, por ejemplo, en donde la administración del agente de ARNhd al sujeto disminuye la actividad de Serpinc1 en aproximadamente un 75% o más, se puede tratar con una dosis de entre aproximadamente 30 y aproximadamente 50 U/kg de aPCC. Para los sujetos que padecen hemofilia A o B, con inhibidores, la cantidad eficaz recomendada del agente de derivación (Factor VIIa recombinante; rFVIIa) para tratar un sangrado, por ejemplo, un sangrado moderado o un sangrado mayor, es de aproximadamente 90 microgramos/kg. Sin embargo, un sangrado, por ejemplo, un sangrado moderado o un sangrado mayor, en un sujeto que padece hemofilia A o B, con inhibidores, y que se administró con una dosis subcutánea fija mensual de 50 mg o 80 mg de AT3SC-001, por ejemplo, en donde la administración del agente de ARNhd al sujeto disminuye la actividad de Serpinc1 en aproximadamente un 75% o más, se puede tratar con una dosis de rFVIIa de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 45 µg/kg.

Tabla 4. Guía Actualizada para el Manejo del Sangrado

	Factor VIII	Factor IX de vida media estándar	Factor IX de vida media extendida	aPCC	Factor VIIa recombinante
Dosis individual recomendada de	10 UI/Kg	20 UI/Kg	20 UI/Kg	30 U/Kg	≤45 µg/Kg
La dosis individual no debe exceder	20 UI/Kg	30 UI/Kg	30 UI/Kg	50 U/Kg	45 µg/Kg
Instrucciones de repetición de dosis	Obligación de llamar al centro de estudios clínicos antes de la segunda dosis. Considerar evaluación y tratamiento en el centro de estudios clínicos (ver sección 5.4)				Obligación de llamar al sitio antes de la tercera dosis
	No se debe repetir antes de las 24 horas	No se debe repetir antes de las 24 horas	No se debe repetir antes de los 5 a 7 días.	No se debe repetir antes de las 24 horas	No se debe repetir antes de las 2 horas
	Debe ser visto en el sitio entre las 48 y 72 horas si se requieren más de dos dosis (ver SOA para evaluaciones)				Debe ser visto en el sitio entre las

		48 y 72 horas si se requieren más de tres dosis
Para las situaciones que requieren dosis mayores, una administración más frecuente, múltiples dosis repetidas, se recomienda una discusión con el Monitor Médico y el Asesor Clínico, y se debe considerar un reemplazo de AT. No usar antifibrinolíticos en combinación con factor o BPA. Nota: para completar se incluyen las dosis de rFVIIa y aPCC. El manejo complementario de los episodios de sangrado se debe llevar a cabo según los estándares de cuidado. Se espera que estos pacientes sin inhibidores sean manejados de rutina con FVIII y FIX.		

Ejemplo 5: Respuesta de generación de trombina con el agregado de agentes de derivación en plasma de pacientes humanos tratados con AT3SC-001, para el tratamiento de Hemofilia A

Como se indicó en el Ejemplo 4, los datos obtenidos de las muestras de plasma de los pacientes con hemofilia A, con y sin inhibidores, muestran mayores respuestas de generación de trombina ante los factores de reemplazo y los agentes de derivación (BPA) después de la dosificación de los pacientes con AT3SC-001. En particular, los datos obtenidos del estudio OLE de Fase II, demuestran que la dosificación subcutánea de AT3SC-001 provee una mayor generación de trombina en las muestras de plasma posteriores a la dosis en

comparación con las muestras de plasma previas a la dosis con el agregado de BPA; lo que sugiere que potencialmente se pueden usar menores dosis de BPA para conseguir un efecto hemostático similar.

Para investigar la respuesta de generación de trombina a los BPA en muestras de plasma seleccionadas de pacientes con disminución de AT mediada por AT3SC-001, se recolectó plasma con bajo contenido de plaquetas a partir de 8 pacientes con hemofilia A (7 sin inhibidores, 1 con inhibidores), tanto antes como después del tratamiento con AT3SC-001. Se midió la actividad de AT en el plasma de los pacientes y se normalizó según el plasma normal agrupado mediante un ensayo cromogénico en base a la actividad de FXa (Antitrombina SIEMENS INNOVANCE®). Se agregaron al plasma *ex vivo* diferentes dosis de BPAs: aPCC (0,5 o 1 U/mL; correspondiendo a dosis de 37,5 y 75 U/kg, respectivamente) o rFVIIa (0,75, 1,75 o 2,5 µg/mL; correspondiendo a dosis de 27, 63 y 90 µg/kg). La respuesta de generación de trombina y los niveles de actividad de AT se monitorearon mediante la generación de curvas de generación de trombina usando un Trombinoscopio Automatizado Calibrado (factor tisular = 1 pM). Todos los reactivos, incluyendo el calibrador de trombina, el kit FluCa, y el PPP-Reagent-Low (factor tisular [TF] 1 pM y fosfolípido 4 µM) se obtuvieron de Thrombinoscope BV.

Los datos que se presentan en las Figuras 25A-26N demuestran una mayor generación de trombina en las muestras de plasma obtenidas de los sujetos después de conseguir la disminución de AT mediante la administración de AT3SC-001. De hecho, la disminución de AT por sí sola resultó en una mayor generación de trombina pico. Tanto el aPCC como el rFVIIa produjeron incrementos lineales en la generación de trombina pico cuando se agregaron al

plasma de los pacientes tratados con AT3SC-001. Las dosis inferiores de aPCC fueron suficientes para producir niveles de generación de trombina pico equivalentes a los que se logran con una dosificación completa de aPCC en el plasma previo al agregado de AT3SC-001 en los pacientes con hemofilia A con inhibidores (Figuras 25A y 25B) o sin inhibidores (Figuras 26A-26N). En el plasma de todos los pacientes, la generación de trombina se aproximó al límite inferior del rango normal (LLN), aunque quedó por debajo del mismo, con el agregado de todas las cantidades de rFVIIa al plasma con disminución de AT.

En resumen, se logró un aumento de la generación de trombina con la administración de AT3SC-001 en las muestras de plasma posteriores a la dosis, en comparación con las muestras de plasma previas a la dosis, con el agregado de los agentes de derivación. Estos resultados apoyan adicionalmente el uso de menores dosis de agentes de derivación en comparación con las dosis recomendadas para lograr la hemostasia en los pacientes que experimentaron un sangrado entre administraciones durante el tratamiento con AT3SC-001, como se describió en el Ejemplo 4 anterior, incluyendo, por ejemplo, menores dosis iniciales de factor de reemplazo o de agente de derivación y una dosis máxima reducida de factor de reemplazo o agente de derivación, un intervalo mínimo entre dosis, y ninguna repetición de dosificación de factor de reemplazo o de agente de derivación en un intervalo menor a 24 horas (excepto para el rFVIIa).

Ejemplo 6: Farmacología de Sistemas Cuantitativa (QSP) para predecir la generación de trombina con reducción concomitante de AT y reemplazo de factor

La hemofilia A y B son trastornos del sangrado que se caracterizan por una insuficiente generación de trombina debido a deficiencias de los factores VIII y IX, respectivamente. Como se describió previamente, el AT3SC-001 es un terapéutico de ARNi de investigación que se administra por vía subcutánea una vez por mes y que se direcciona contra la antitrombina (AT), como medio para mejorar la generación de trombina y promover la hemostasia en los pacientes con hemofilia A y hemofilia B, con o sin inhibidores. Los pacientes que reciben AT3SC-001 pueden, sin embargo, experimentar un sangrado entre administraciones que puede requerir de un tratamiento con factor de reemplazo. Como se describió previamente, los datos clínicos y los datos de mezclado *ex vivo* apoyan el uso de menores dosis de agentes de derivación y de factores de reemplazo en comparación con las dosis recomendadas para lograr la hemostasia en los pacientes que experimentan sangrado entre administraciones durante el tratamiento con AT3SC-001.

Con el objetivo de apoyar aún más el uso de menores dosis de agentes de derivación y factores de reemplazo en comparación con las dosis recomendadas para lograr la hemostasia en los pacientes que experimentan sangrado entre administraciones durante el tratamiento con AT3SC-001, así como también para proveer una comprensión más profunda de la relación entre el nivel de AT, la dosificación de factores, y la generación de trombina (TG), se usó un modelo cinético *in silico* de Farmacología de Sistemas Cuantitativa (QSP) que describe la cascada de coagulación (Nayak, y col. (2015) *CPT: pharmacometrics & systems pharmacology* 4.7: 396-405) para simular un ensayo *ex vivo* de generación de trombina (TG). En particular, el modelo fue descrito por 66 reacciones y 106 parámetros, y las concentraciones iniciales de

factores plasmáticos se variaron para simular una hemofilia y otros trastornos raros de sangrado. Además, debido a que las concentraciones de factores plasmáticos varían $\pm 50\%$ entre los individuos, se aplicaron métodos de Monte Carlo para simular el rango normal de TG: Media – 140 nM; Rango entre 50 y 250 nM.

La Tabla siguiente provee las concentraciones de entrada para los factores que se usaron para el modelo bajo diversas condiciones de enfermedad.

Factor	Valor basal, nM (paciente normal sano)	Condición	Simulaciones probadas (% de valor basal)
ATIII	3400	Tratamiento con Fitusiran	1-100
VIII	0,7 (100 IU/dL)	Hemofilia A	0,1; 0,5; 1; 2; 5; 10; 100
IX	90 (100 IU/dL)	Hemofilia B	0,1; 0,5; 1; 2; 5; 10; 100
V	20 (100 U/dL)	Deficiencia de Factor V	0,1; 0,5; 1; 2; 5; 10; 100
VII	10 (100 U/dL)	Deficiencia de Factor VII	0,1; 0,5; 1; 2; 5; 10; 100

X	160 (100 U/dL)	Deficiencia de Factor X	0,1; 0,5; 1; 2; 5; 10; 100
---	----------------	----------------------------	-------------------------------

Como se representa en las Figuras 27A-27C, los datos generados usando el modelo de QSP fueron predictivos de la generación de trombina (TG) con disminución de AT. Específicamente, el rango normal clínico de TG se alineó con las predicciones de QSP y se observó una correlación entre la TG medida clínicamente y la predicha por el modelo para los pacientes con disminución de AT. En la Figura 27A se representa la TG medida a partir de los resultados de Fase I intermedia (Partes A-C) y en la Figura 27B se representa la TG simulada (en base al silenciamiento de la AT), en cada caso agrupando por cuartiles de disminución de AT. La Figura 27C es un diagrama de dispersión que representa la fuerte correlación entre los datos de TG simulada y los datos de TG medida.

El modelo de QSP *in silico* también se aplicó para cuantificar la relación no lineal entre la TG, la disminución de AT, y la dosis de Factor VIII para hemofilia A severa (Figura 28A). La representación de mapa de calor de la TG con la disminución de AT y la dosificación de Factor VIII demuestra que un nivel de entre 5 y 10 IU/kg de factor VIII a los niveles de AT observados con el AT3SC-001 (entre 10 y 25%) puede ser suficiente para normalizar la TG (Figura 28B). De forma similar, la representación de mapa de calor de la TG con la disminución de AT y la dosificación del Factor IX demuestra que un nivel de entre 10 y 20 IU/kg de Factor IX, a entre 10 y 25% de AT, puede ser suficiente para normalizar la TG (Figura 28C).

La farmacocinética de los factores (modelo de un compartimento) y el

modelo de QSP se integraron para simular el potencial de trombina pico (PTP) en función del tiempo después de la dosis de factor. En la Figura 29B (20% de valor basal de AT) en relación con la Figura 29A (100% de AT) se representa el impacto del curso temporal de la dosificación de factor en los pacientes con hemofilia A severa, y se demuestra que la disminución de AT aumenta la generación de trombina tanto para los puntos de tiempo de pico como de valle después de la administración de FVIII, para los episodios de sangrado entre administraciones.