

COMPOSICIONES DE ARNⁱ DE SERPINC1 Y MÉTODOS DE USO DE LAS MISMAS

Solicitudes Relacionadas

Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad a la Solicitud Provisional de Estados Unidos Núm. 62/793.020, presentada el 16 de enero de 2019, cuyo contenido completo se incorpora a la presente memoria como referencia.

Esta solicitud está relacionada con la Solicitud Internacional Núm. PCT/US2018/041400, presentada el 10 de julio de 2018, la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos Núm.: 62/530.518, presentada el 10 de julio de 2017, la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos Núm.: 62/599.223, presentada el 15 de diciembre de 2017, la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos Núm.: 62/614.111, presentada el 5 de enero de 2018, y la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos Núm.: 62/673.424, presentada el 18 de mayo de 2018. El contenido completo de cada una de las solicitudes de patente anteriores se incorpora a la presente memoria como referencia.

Esta solicitud también está relacionada con la Solicitud de Patente de EE. UU. Núm.: 15/371.300, presentada el 7 de diciembre de 2016, la Solicitud Internacional Núm. PCT/US2016/065245, presentada el 7 de diciembre de 2016, con la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos Núm. 62/264.013, presentada el 7 de diciembre de 2015, con la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos Núm.: 62/315.228, presentada el 30 de marzo de 2016, con la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos Núm. 62/366.304, presentada el 25 de julio de 2016, y con la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos Núm. 62/429.241, presentada el 2 de diciembre de 2016. El contenido completo de cada una de las solicitudes de patente anteriores se incorpora a la presente memoria como referencia.

Asimismo, esta solicitud está relacionada con la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos Núm.: 61/992.057, presentada el 12 de mayo de 2014, la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos Núm.: 62/089.018, presentada el 8 de diciembre de 2014, la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos Núm.: 62/102.281, presentada el 12 de enero de 2015, y la Solicitud Internacional Núm. PCT/US2015/030337, presentada el 12 de mayo de 2015. El contenido completo de cada una de las solicitudes de patente anteriores se incorpora a la presente memoria como referencia.

Esta solicitud también está relacionada con la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos Núm.: 61/638.952, presentada el 26 de abril de 2012, la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos Núm.: 61/669.249, presentada el 9 de julio de 2012, Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos Núm.: 61/734.573, presentada el 7 de diciembre de 2012, la Solicitud de Patente de EE. UU. Núm.: 13/837.129, presentada el 15 de marzo de 2013, ahora

Patente de EE. UU. Núm.: 9,127,274, la Solicitud de patente de EE. UU. Núm.: 14/806.084, presentada el 22 de julio, 2015, ahora Patente de EE. UU. Núm.: 9.376.680, la Solicitud de Patente de EE. UU. Núm.: 15/070.358, presentada el 15 de marzo de 2016, la Solicitud de Patente de EE. UU. Núm.: 15/955.873, presentada el 18 de abril de 2018, la Solicitud de Patente de EE. UU. Núm.: 16/220.157, presentada el 14 de diciembre de 2018, y la Solicitud Internacional Núm. PCT/US2013/038218, presentada el 25 de abril de 2013. Esta solicitud también está relacionada con la Solicitud Internacional Núm. PCT/US2012/065601, presentada el 16 de noviembre de 2012. El contenido completo de cada una de las solicitudes de patente anteriores se incorpora a la presente memoria como referencia.

10

Lista de Secuencias

La presente solicitud contiene una lista de secuencias que se ha enviado electrónicamente en formato ASCII y se incorpora a la presente como referencia en su totalidad. Dicha copia ASCII, creada el 7 de enero de 2020, se denomina 117811_03020_SL.TXT y tiene un tamaño de 20.997 bytes.

15

Antecedentes de la Invención

Serpinc1 es un miembro de la superfamilia de inhibidores de proteinasa de serina (serpina). Serpinc1 es un inhibidor de la proteasa plasmática 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 tanto, regula la cascada de la coagulación sanguínea. La actividad anticoagulante de Serpinc1 se ve reforzada por la presencia de heparina y otros glicosaminoglicanos relacionados que catalizan la formación de complejos de trombina:antitrombina (TAT).

20

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

30

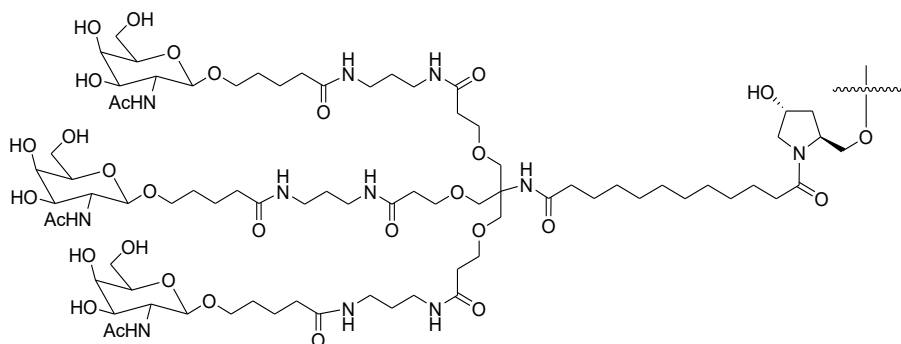
Aunque en la actualidad no existe cura para la hemofilia, se puede controlar con infusiones regulares del factor de coagulación deficiente, p. ej., Factor VIII en la hemofilia A. Sin embargo, algunos hemofílicos desarrollan anticuerpos (inhibidores) contra los factores de reemplazo que se les administran y, por lo tanto, se vuelven refractarios al factor de coagulación de reemplazo. Por consiguiente, los sangrados en tales sujetos pueden no ser controlados adecuadamente.

Un agente terapéutico de iARN bajo investigación, administrado subcutáneamente, una vez al mes, que se dirige a antitrombina (AT), Fitusiran, se ha desarrollado recientemente para el tratamiento de la hemofilia A y B, con y sin inhibidores, y se necesitan composiciones farmacéuticas estables que comprendan tal agente terapéutico en la técnica como tratamientos alternativos para sujetos que padecen un trastorno hemorrágico, tal como hemofilia.

Compendio de la Invención

La presente invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de composiciones farmacéuticas estables que comprenden un agente de ácido ribonucleico de doble hebra (ARNdh) que inhibe la expresión de un gen de Serpinc1 que tiene una mejor estabilidad, eficacia, durabilidad y facilidad de administración. en comparación con otras composiciones que comprenden un agente de ARNdh que inhibe la expresión de un gen de Serpinc1. Tales composiciones farmacéuticas son útiles para tratar sujetos que tienen un trastorno hemorrágico, tal como una hemofilia.

Por consiguiente, en un aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para inhibir la expresión de un gen de Serpinc1, que comprende un agente de ácido ribonucleico de doble hebra (ARNdh) a una concentración de aproximadamente 50 mg/mL a aproximadamente 200 mg/mL y solución salina tamponada con fosfato (PBS) a una concentración de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 10 mM, en donde el pH de la composición farmacéutica es adecuado para la administración subcutánea a un sujeto, en donde el agente de ARNdh tiene una hebra efectora que consiste en la secuencia de nucleótidos 5'-GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf- 3' (SEQ ID NO: 941) y una hebra antisentido que consiste en la secuencia de nucleótidos 5'-usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg- 3' (SEQ ID NO: 960), en donde a, g, c y u son 2'-O-metilo (2'-OMe) A, G, C y U; Af, Gf, Cf y Uf son 2'-fluoro A, G, C, U; y s es un enlace fosforotioato, y en donde un ligando está conjugado al extremo 3' de la hebra efectora a través de un conector, y en donde el ligando y el conector tienen la siguiente estructura:



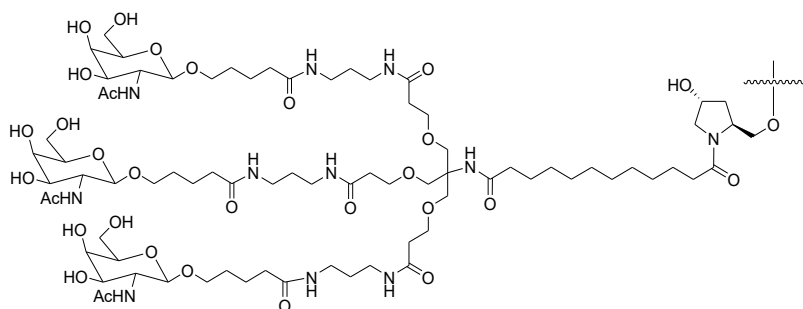
, en donde el agente

de ARNdh está en forma de ácido libre.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para inhibir la expresión de un gen de *Serpinc1*, que comprende un agente de ácido ribonucleico de doble hebra (ARNdh) a una concentración de aproximadamente 50 mg/mL a aproximadamente 200 mg/mL y solución salina tamponada con fosfato (PBS) a una concentración de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 10 mM, en donde el pH de la composición farmacéutica es adecuado para la administración subcutánea a un sujeto, en donde el agente de ARNdh tiene una hebra efectora que consiste en la secuencia de nucleótidos 5'-

GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf- 3' (SEQ ID NO: 941) y una hebra antisentido que consiste en la secuencia de nucleótidos 5'- usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg SEQ ID NO: 960), en donde a, g, c y u son 2'-O-metilo (2'-OMe) A, G, C y U; Af, Gf, Cf y Uf son 2'-fluoro A, G, C, U; y s es un enlace fosforotioato, y en donde un ligando está conjugado con el extremo 3' de la hebra efectora a través de un conector, y en donde el ligando y el conector

tienen la siguiente estructura:



, en donde el agente de

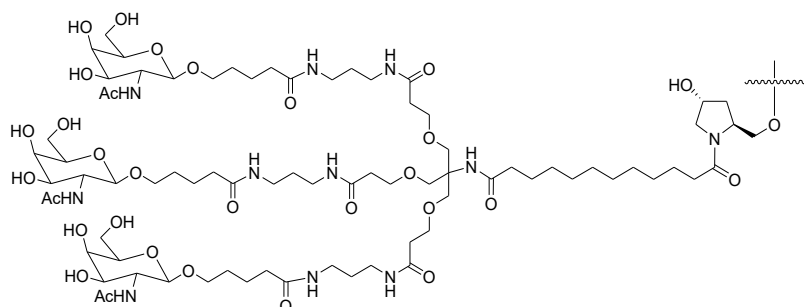
ARNdh está en forma de sal.

En un aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para inhibir la expresión de un gen de *Serpinc1*, que comprende un agente de ácido ribonucleico de doble hebra (ARNdh) a una concentración de aproximadamente 50 mg/mL a aproximadamente 200 mg/mL y solución salina tamponada con fosfato (PBS) a una concentración de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 10 mM, en donde el pH y la osmolalidad de la composición farmacéutica son adecuados para la administración subcutánea a un sujeto, en donde el agente de ARNdh tiene una hebra efectora que consiste en la secuencia de nucleótidos

5'- GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf - 3' (SEQ ID NO: 941) y una hebra antisentido

que consiste en la secuencia de nucleótidos 5'- usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg- 3' (SEQ ID NO: 960), en donde a, g, c y u son 2'-O-metilo (2'-OMe) A, G, C y U; Af, Gf, Cf y Uf son 2'-fluoro A, G, C, U; y s es un enlace fosforotioato, y en donde un ligando está conjugado con el extremo 3' de la hebra efectora a través de un conector, y en donde el ligando y el

5 conector tienen la siguiente estructura:

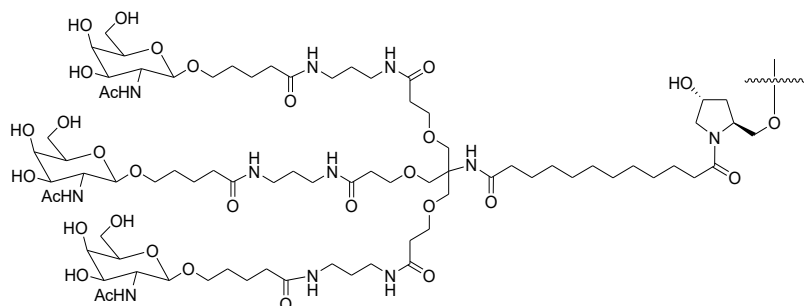


, en donde el agente de

ARNdh está en forma de ácido libre.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para inhibir la expresión de un gen de Serpinc1, que comprende un agente de ácido ribonucleico de doble hebra. (ARNdh) a una concentración de aproximadamente 50 mg/mL a aproximadamente 200 mg/mL y solución salina tamponada con fosfato (PBS) a una concentración de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 10 mM, en donde el pH y la osmolalidad de la composición farmacéutica son adecuados para la administración subcutánea a un sujeto, en donde el agente de ARNdh tiene una hebra efectora que consiste en la secuencia de nucleótidos 5'- GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf - 3' (SEQ ID NO: 941) y una hebra antisentido que consiste en la secuencia de nucleótidos 5'- usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg- 3' (SEQ ID NO: 960), en donde a, g, c y u son 2'-O-metilo (2'-OMe) A, G, C y U; Af, Gf, Cf y Uf son 2'-fluoro A, G, C, U; y s es un enlace fosforotioato, y en donde un ligando está conjugado con el extremo 3' de la hebra efectora a través de un conector, y en donde el ligando y el

20 conector tienen la siguiente estructura:



, en donde el agente de

ARNdh está en forma de sal.

La forma de sal del ARNdh puede ser una forma de sal de sodio.

En una realización, sustancialmente todos los grupos fosfodiéster y/o fosforotiotato en el agente comprenden un contraión de sodio. En otra realización, todos los grupos fosfodiéster y/o fosforotiotato en el agente comprenden un contraión de sodio.

La concentración de PBS en la composición farmacéutica puede estar entre
5 aproximadamente 2 mM y aproximadamente 7 mM; entre aproximadamente 3 y
aproximadamente 6 mM; o aproximadamente 5 mM.

El pH de la composición farmacéutica puede estar entre aproximadamente 5,0 y
aproximadamente 8,0; entre aproximadamente 6,0 y aproximadamente 8,0; entre
aproximadamente 6,5 y aproximadamente 7,5; o entre aproximadamente 6,8 y aproximadamente
10 7,2.

La osmolalidad de la composición farmacéutica puede estar entre aproximadamente 50 y
aproximadamente 400 mOsm/kg; entre aproximadamente 100 y aproximadamente 400
mOsm/kg; entre aproximadamente 240 y aproximadamente 390 mOsm/kg; o entre
aproximadamente 290 y aproximadamente 320 mOsm/kg.

La concentración del agente de ARNdh en la composición farmacéutica puede estar entre
15 aproximadamente 50 mg/mL y aproximadamente 150 mg/mL; entre aproximadamente 80
mg/mL y aproximadamente 110 mg/mL; o aproximadamente 100 mg/mL.

En una realización, la composición es estable entre aproximadamente 6 meses y
aproximadamente 36 meses cuando se almacena entre aproximadamente 2°C y aproximadamente
20 8°C. En otra realización, la composición es estable entre aproximadamente 6 meses y
aproximadamente 36 meses cuando se almacena a aproximadamente 25°C y 60% de humedad
relativa (HR). En otra realización más, la composición es estable durante aproximadamente 6
meses cuando se almacena a aproximadamente 40°C y 75% de humedad relativa (HR).

En otra realización, la composición es estable hasta aproximadamente 36 meses cuando
25 se almacena entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 8°C. En otra realización, la
composición es estable hasta aproximadamente 36 meses cuando se almacena a
aproximadamente 25°C y 60% de humedad relativa (HR). En otra realización más, la
composición es estable hasta aproximadamente 6 meses cuando se almacena a aproximadamente
40°C y 75% de humedad relativa (HR).

En una realización, la composición comprende no menos de (“NLT en sus siglas en
30 inglés”) aproximadamente 95,0% de área del dúplex y no más de (“NMT en sus siglas en
inglés”) aproximadamente 5% de área de impurezas totales del dúplex según se determina
mediante IPRP-HPLC no desnaturalizante de pureza.

En una realización, la composición comprende no menos de (NLT) aproximadamente 85,0% de área total de hebras sencillas según se determina mediante AX-HPLC desnaturalizante de pureza.

En una realización, la composición comprende no menos de (NLT) aproximadamente 80,0% de área total de hebras sencillas según se determina mediante IPRP-HPLC desnaturalizante de pureza.

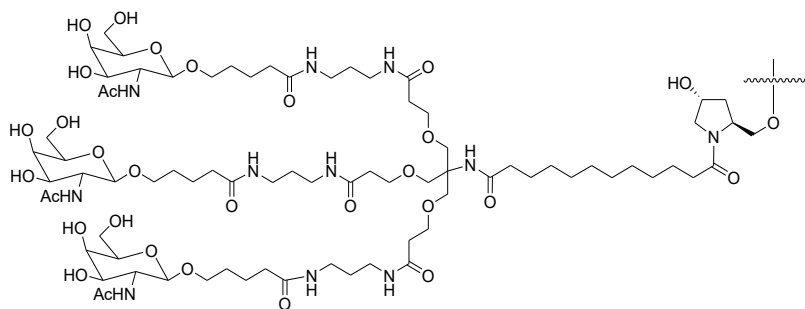
La presente invención también proporciona viales y jeringas que comprenden las composiciones farmacéuticas de la invención.

Los viales pueden incluir de aproximadamente 0,5 mL a aproximadamente 2,0 mL de la composición farmacéutica; o aproximadamente 0,8 mL de la composición farmacéutica.

Las jeringas de la invención pueden ser una jeringa de 1 mL; o una jeringa de 3 mL. En una realización, la jeringa es una jeringa de un solo uso de 1 mL.

Las jeringas de la invención pueden incluir una aguja 29 G; o una aguja 30 G. En una realización, la aguja es una aguja 29G.

En un aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para inhibir la expresión de un gen de *Serpinc1*, que comprende un agente de ácido ribonucleico de doble hebra (ARNdh) a una concentración de aproximadamente 100 mg/mL y solución salina tamponada con fosfato (PBS) a una concentración aproximadamente 5 mM, en donde el pH de la composición farmacéutica es de aproximadamente 6,8 a aproximadamente 7,2, en donde el agente de ARNdh tiene una hebra efectora que consiste en la secuencia de nucleótidos 5'-GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf - 3' (SEQ ID NO: 941) y una hebra antisentido que consiste en la secuencia de nucleótidos 5'-usUfsgAfaGfuAfaAfuUfgUfuAfaCfcsasg- 3' (SEQ ID NO: 960), en donde a, g, c y u son 2'-O-metilo (2'-OMe) A, G, C y U; Af, Gf, Cf y Uf son 2'-fluoro A, G, C, U; y s es un enlace fosforotioato, y en donde un ligando está conjugado con el extremo 3' de la hebra efectora a través de un conector, y en donde el ligando y el conector tienen la siguiente estructura:



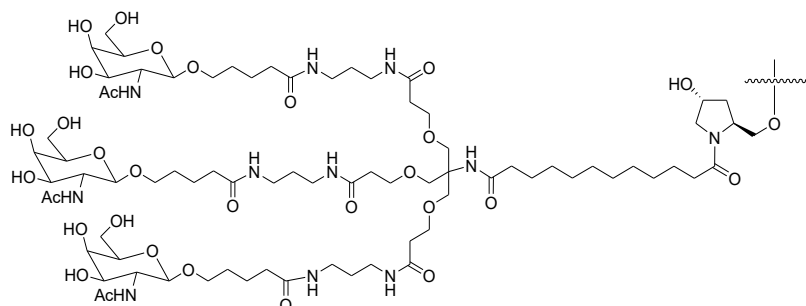
, en donde el agente de

ARNdh está en forma de ácido libre.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para inhibir la expresión de un gen de *Serpinc1*, que comprende un agente ácido ribonucleico de doble

hebra (ARNdh) a una concentración de aproximadamente 106 mg/mL y solución salina tamponada con fosfato (PBS) a una concentración de aproximadamente 5 mM, en donde el pH de la composición farmacéutica es de aproximadamente 6,8 a aproximadamente 7,2, en donde el agente de ARNdh tiene una hebra efectora que consiste en la secuencia de nucleótidos 5'-

- 5 GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf - 3' (SEQ ID NO: 941) y una hebra antisentido que consiste en la secuencia de nucleótidos 5'- usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg- 3' (SEQ ID NO: 960), en donde a, g, c y u son 2'-O-metilo (2'-OMe) A, G, C y U; Af, Gf, Cf y Uf son 2'-fluoro A, G, C, U; y s es un enlace fosforotioato, y en donde un ligando está conjugado con el extremo 3' de la hebra efectora a través de un conector, y en donde el ligando y el conector
- 10 tienen la siguiente estructura:



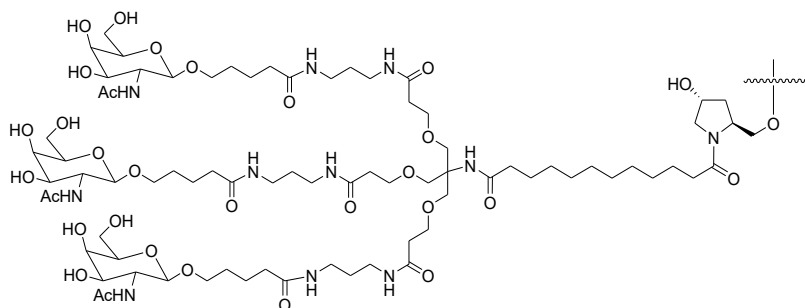
, en donde el agente de

ARNdh está en forma de sal.

En un aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para inhibir la expresión de un gen de Serpinc1, que comprende un agente de ácido ribonucleico de

15 doble hebra (ARNdh) a una concentración de aproximadamente 100 mg/mL y solución salina tamponada con fosfato (PBS) a una concentración de aproximadamente 5 mM, en donde el pH de la composición farmacéutica es de aproximadamente 6,8 a aproximadamente 7,2, en donde la osmolalidad de la composición farmacéutica es de aproximadamente 300 mOsm/kg, en donde el agente de ARNdh tiene una hebra efectora que consiste en la secuencia de nucleótidos 5'-

- 20 GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf - 3' (SEQ ID NO: 941) y una hebra antisentido que consiste en la secuencia de nucleótidos 5'- usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg- 3' (SEQ ID NO: 960), en donde a, g, c y u son 2'-O-metilo (2'-OMe) A, G, C y U; Af, Gf, Cf y Uf son 2'-fluoro A, G, C, U; y s es un enlace fosforotioato, y en donde un ligando está conjugado con el extremo 3' de la hebra efectora a través de un conector, y en donde el ligando y el conector
- 25 tienen la siguiente estructura:



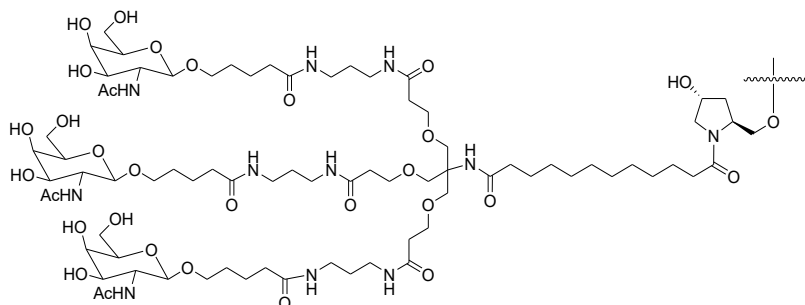
, en donde el agente de

ARNdh está en forma de ácido libre.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para inhibir la expresión de un gen de Serpinc1, que comprende un agente de ácido ribonucleico de doble hebra (ARNdh) a una concentración de aproximadamente 106 mg/mL y solución salina tamponada con fosfato (PBS) a una concentración de aproximadamente 5 mM, en donde el pH de la composición farmacéutica es aproximadamente 6,8 a aproximadamente 7,2, en donde la osmolalidad de la composición farmacéutica es de aproximadamente 300 mOsm/kg, en donde el agente de ARNdh tiene una hebra efectora que consiste en la secuencia de nucleótidos 5'-

GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf - 3' (SEQ ID NO: 941) y una hebra antisentido que consiste en la secuencia de nucleótidos 5'- usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg- 3' (SEQ ID NO: 960), en donde a, g, c y u son 2'-O-metilo (2'-OMe) A, G, C y U; Af, Gf, Cf y Uf son 2'-fluoro A, G, C, U; y s es un enlace fosforotioato, y en donde un ligando está conjugado con el extremo 3' de la hebra efectora a través de un conector, y en donde el ligando y el conector

tienen la siguiente estructura:



, en donde el agente de

ARNdh está en forma de sal.

En una realización, la forma de sal es una forma de sal de sodio.

En una realización, sustancialmente todos los grupos fosfodiéster y/o fosforotiotato en el agente comprenden un contraión de sodio. En otra realización, todos los grupos fosfodiéster y/o fosforotiotato en el agente comprenden un contraión de sodio.

En una realización, la composición es estable entre aproximadamente 6 meses y aproximadamente 36 meses cuando se almacena entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 8°C. En otra realización, la composición es estable entre aproximadamente 6 meses y aproximadamente 36 meses cuando se almacena a aproximadamente 25°C y 60% de humedad

relativa (HR). En otra realización más, la composición es estable durante aproximadamente 6 meses cuando se almacena a aproximadamente 40°C y 75% de humedad relativa (HR).

En una realización, la composición es estable hasta aproximadamente 36 meses cuando se almacena entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 8°C. En otra realización, la

5 composición es estable hasta aproximadamente 36 meses cuando se almacena a aproximadamente 25°C y 60% de humedad relativa (HR). En otra realización más, la composición es estable hasta durante 6 meses cuando se almacena a aproximadamente 40°C y 75% de humedad relativa (RH).

10 En una realización, la composición comprende no menos de (NLT) aproximadamente 95,0% de área del dúplex y no más de (NMT) aproximadamente 5% de área de impurezas totales del dúplex según se determina mediante IPRP-HPLC no desnaturalizante de pureza.

En una realización, la composición comprende no menos de (NLT) aproximadamente 85,0% de área total de hebras sencillas según se determina mediante AX-HPLC desnaturalizante de pureza.

15 En una realización, la composición comprende no menos de (NLT) aproximadamente 80,0% de área total de hebras sencillas según se determina mediante IPRP-HPLC desnaturalizante de pureza.

La presente invención también proporciona un vial que comprende las composiciones farmacéuticas anteriores. Los viales pueden incluir de aproximadamente 0,5 mL a
20 aproximadamente 2,0 mL de la composición farmacéutica; o aproximadamente 0,8 mL de la composición farmacéutica.

La presente invención proporciona adicionalmente una jeringa que comprende las composiciones farmacéuticas anteriores.

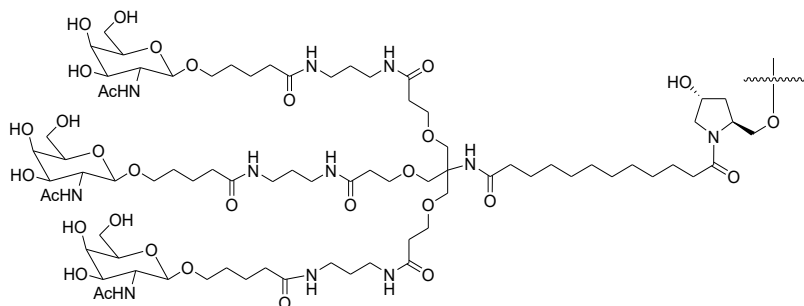
25 Las jeringas de la invención pueden ser una jeringa de 1 mL; o una jeringa de 3 mL. En una realización, la jeringa es una jeringa de un solo uso de 1 mL.

Las jeringas de la invención pueden incluir una aguja 29 G; o una aguja 30 G. En una realización, la aguja es una aguja 29G.

En una realización, la jeringa es una jeringa precargada.

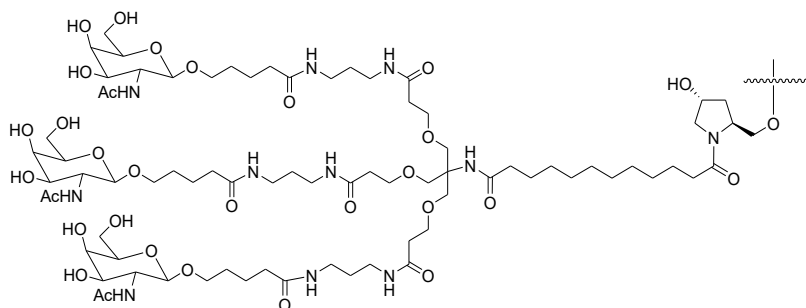
30 En otro aspecto, la presente invención proporciona un vial de 2 mL que comprende aproximadamente 0,8 mL de una composición farmacéutica para inhibir la expresión de un gen de *Serpinc1*, en donde la composición farmacéutica comprende un agente de ácido ribonucleico de doble hebra (ARNdh) a una concentración de aproximadamente 106 mg/mL y solución salina tamponada con fosfato (PBS) a una concentración de aproximadamente 5 mM, en donde el pH de la composición farmacéutica es de aproximadamente 6,8 a aproximadamente 7,2, en donde la
35 osmolalidad de la composición farmacéutica es de aproximadamente 300 mOsm/kg, en donde el

agente de ARNdh tiene una hebra efectora que consiste en la secuencia de nucleótidos 5'- GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf - 3' (SEQ ID NO: 941) y una hebra antisentido que consiste en la secuencia de nucleótidos 5'- usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg- 3' (SEQ ID NO: 960), en donde a, g, c y u son 2'-O-metilo (2'-OMe) A, G, C y U; Af, Gf, Cf y Uf son 2'-fluoro A, G, C, U; y s es un enlace fosforotioato, y en donde un ligando está conjugado con el extremo 3' de la hebra efectora a través de un conector, y en donde el ligando y el conector tienen la siguiente estructura:



, en donde el agente de ARNdh está en forma de sal de sodio y todos los grupos fosfodiéster y/o fosforotioato en el agente comprenden un contraión de sodio.

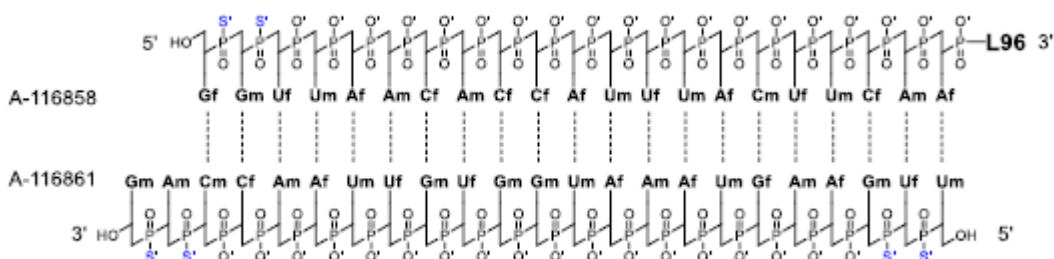
En otro aspecto, la presente invención proporciona una jeringa de un solo uso precargada de 1 mL que comprende una aguja 29G, en donde la jeringa comprende aproximadamente 0,8 mL de una composición farmacéutica para inhibir la expresión de un gen de Serpinc1, en donde la composición farmacéutica comprende un agente de ácido ribonucleico de doble hebra (ARNdh) a una concentración de aproximadamente 106 mg/mL y solución salina tamponada con fosfato (PBS) a una concentración de aproximadamente 5 mM, en donde el pH de la composición farmacéutica es de aproximadamente 6,8 a aproximadamente 7,2, en donde la osmolalidad de la composición farmacéutica es de aproximadamente 300 mOsm/kg, en donde el agente de ARNdh tiene una hebra efectora que consiste en la secuencia de nucleótidos 5'- GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf - 3' (SEQ ID NO: 941) y una hebra antisentido que consiste en la secuencia de nucleótidos 5'- usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg- 3' (SEQ ID NO: 960), en donde a, g, c y u son 2'-O-metilo (2'-OMe) A, G, C y U; Af, Gf, Cf y Uf son 2'-fluoro A, G, C, U; y s es un enlace fosforotioato, y en donde un ligando está conjugado con el extremo 3' de la hebra efectora a través de un conector, y en donde el ligando y el conector tienen la siguiente estructura:



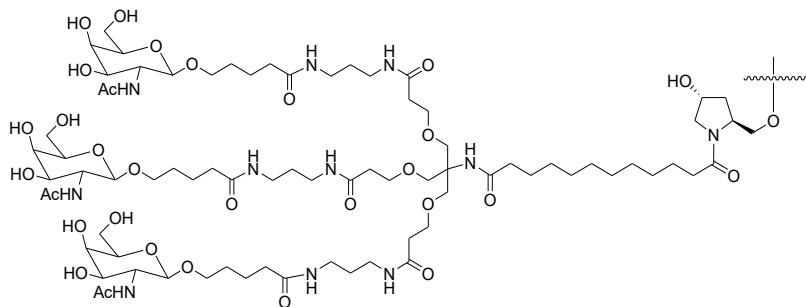
, en donde el agente de ARNdh

está en forma de sal de sodio y todos los grupos fosfodiéster y/o fosforotioato en el agente comprenden un contraión de sodio.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un vial de 2 mL que comprende
 5 aproximadamente 0,8 mL de una composición farmacéutica para inhibir la expresión de un gen de *Serpinc1*, en donde la composición farmacéutica comprende un agente de ácido ribonucleico de doble hebra (ARNdh) a una concentración de aproximadamente 106 mg/mL y solución salina tamponada con fosfato (PBS) a una concentración de aproximadamente 5 mM, en donde el pH de la composición farmacéutica es de aproximadamente 6,8 a aproximadamente 7,2, en donde la
 10 osmolalidad de la composición farmacéutica es de aproximadamente 300 mOsm/kg, en donde el agente de ARNdh tiene la estructura

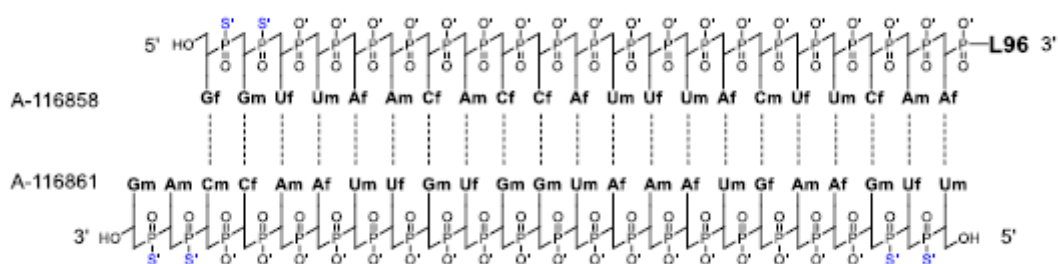


en donde Am, Gm, Cm y Um son 2'-O-metilo (2'-OMe) A, G, C y U; Af, Gf, Cf y Uf son 2'-fluoro A, G, C, U; s es un enlace fosforotioato; y en donde L96 es un ligando y conector que
 15 tiene la siguiente estructura:

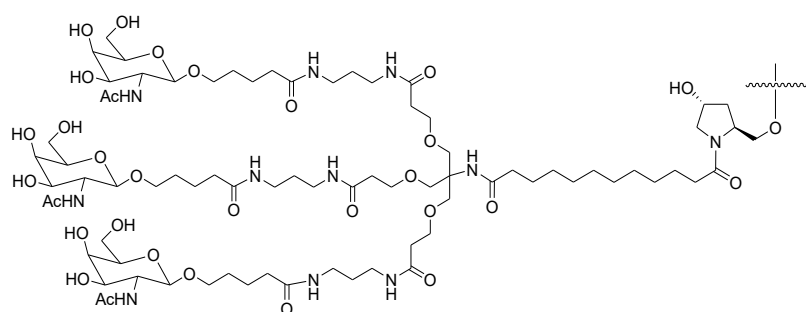


en donde el agente de ARNdh está en forma de sal de sodio y todos los grupos fosfodiéster y/o fosforotioato en el agente comprenden un contraión de sodio.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una jeringa precargada de un solo uso de 1 mL que comprende una aguja 29G, en donde la jeringa comprende aproximadamente 0,8 mL de una composición farmacéutica para inhibir la expresión de un gen de *Serpinc1*, en donde la composición farmacéutica comprende un agente de ácido ribonucleico de doble hebra (ARNdh) a una concentración de aproximadamente 106 mg/mL y solución salina tamponada con fosfato (PBS) a una concentración de aproximadamente 5 mM, en donde el pH de la composición farmacéutica es de aproximadamente 6,8 a aproximadamente 7,2, en donde la osmolalidad de la composición farmacéutica es de aproximadamente 300 mOsm/kg, en donde el agente de ARNdh tiene la estructura



en donde Am, Gm, Cm y Um son 2'-O-metilo (2'-OMe) A, G, C y U; Af, Gf, Cf y Uf son 2'-fluoro A, G, C, U; s es un enlace fosforotioato; y en donde L96 es un ligando y conector que tiene la siguiente estructura:

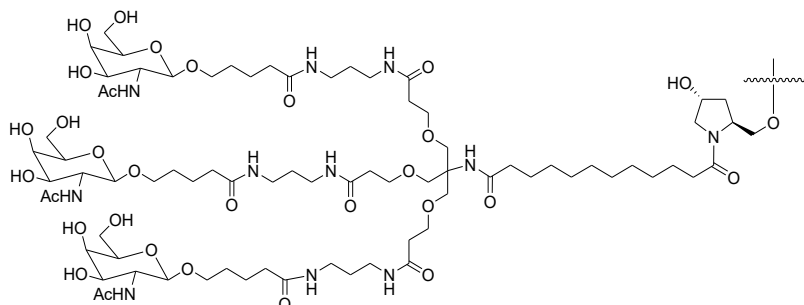


en donde el agente de ARNdh está en forma de sal de sodio y todos los grupos fosfodiéster y/o fosforotioato en el agente comprenden un contraión de sodio.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un vial de 2 mL que comprende aproximadamente 0,8 mL de una composición farmacéutica para inhibir la expresión de un gen de *Serpinc1*, en donde la composición farmacéutica comprende un agente de ácido ribonucleico de doble hebra (ARNdh) a una concentración de aproximadamente 106 mg/mL y solución salina tamponada con fosfato (PBS) a una concentración de aproximadamente 5 mM, en donde el pH de la composición farmacéutica es de aproximadamente 6,8 a aproximadamente 7,2, en donde el agente de ARNdh tiene una hebra efectora que consiste en la secuencia de nucleótidos 5'-GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf - 3' (SEQ ID NO: 941) y una hebra antisentido que

consiste en la secuencia de nucleótidos 5'- usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg- 3' (SEQ ID NO: 960), en donde a, g, c y u son 2'-O-metilo (2'-OMe) A, G, C y U; Af, Gf, Cf y Uf son 2'-fluoro A, G, C, U; y s es un enlace fosforotioato, y en donde un ligando está conjugado con el extremo 3' de la hebra efectora a través de un conector, y en donde el ligando y el conector

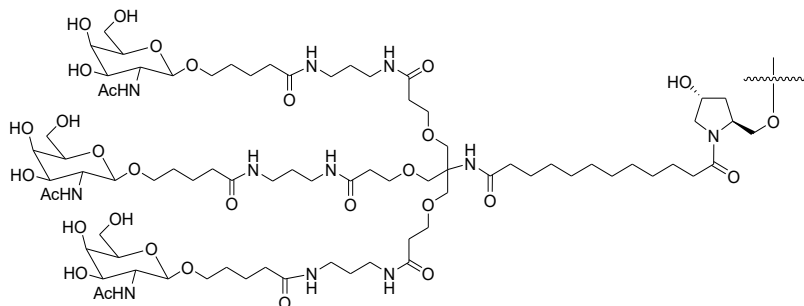
5 tienen la siguiente estructura:



, en donde el agente de ARNdh

está en forma de sal de sodio y todos los grupos fosfodiéster y/o fosforotioato en el agente comprenden un contraión de sodio.

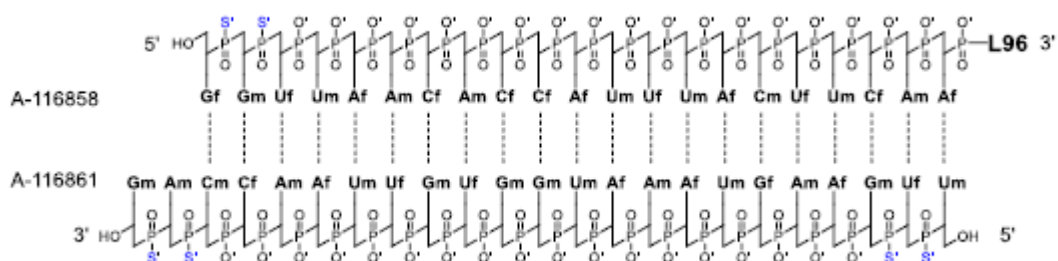
En otro aspecto, la presente invención proporciona una jeringa precargada de un solo uso
10 de 1 mL que comprende una aguja 29G, en donde la jeringa comprende aproximadamente 0,8 mL de una composición farmacéutica para inhibir la expresión de un gen de Serpinc1, en donde la composición farmacéutica comprende un agente de ácido ribonucleico de doble hebra (ARNdh) a una concentración de aproximadamente 106 mg/mL y solución salina tamponada con fosfato (PBS) a una concentración de aproximadamente 5 mM, en donde el pH de la
15 composición farmacéutica es de aproximadamente 6,8 a aproximadamente 7,2, en donde el agente de ARNdh tiene una hebra efectora que consiste en la secuencia de nucleótidos 5'- GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf - 3' (SEQ ID NO: 941) y una hebra antisentido que consiste en la secuencia de nucleótidos 5'- usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg- 3' (SEQ ID NO: 960), en donde a, g, c y u son 2'-O-metilo (2'-OMe) A, G, C y U; Af, Gf, Cf y Uf son 2'-
20 fluoro A, G, C, U; y s es un enlace fosforotioato, y en donde un ligando está conjugado con el extremo 3' de la hebra efectora a través de un conector, y en donde el ligando y el conector tienen la siguiente estructura:



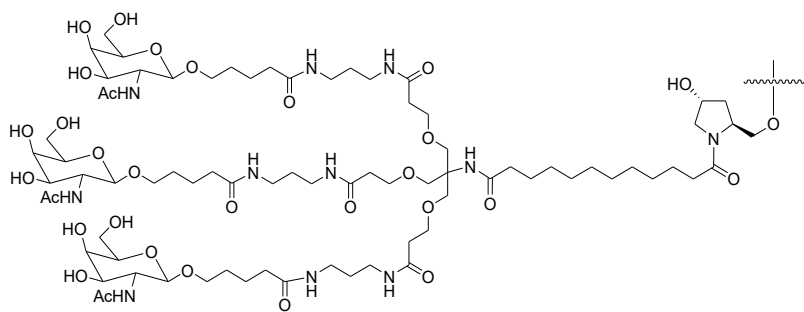
,

en donde el agente de ARNdh está en forma de sal de sodio y todos los grupos
25 fosfodiéster y/o fosforotioato en el agente comprenden un contraión de sodio.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un vial de 2 mL que comprende aproximadamente 0,8 mL de una composición farmacéutica para inhibir la expresión de un gen de Serpincl, en donde la composición farmacéutica comprende un agente de ácido ribonucleico de doble hebra (ARNdh) a una concentración de aproximadamente 106 mg/mL y solución salina tamponada con fosfato (PBS) a una concentración de aproximadamente 5 mM, en donde el pH de la composición farmacéutica es de aproximadamente 6,8 a aproximadamente 7,2, en donde el agente de ARNdh tiene la estructura

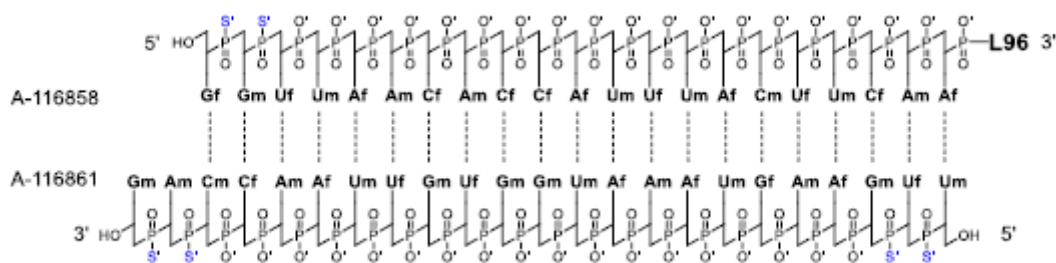


en donde Am, Gm, Cm y Um son 2'-O-metilo (2'-OMe) A, G, C y U; Af, Gf, Cf y Uf son 2'-fluoro A, G, C, U; s es un enlace fosforotioato; y en donde L96 es un ligando y conector que tiene la siguiente estructura:

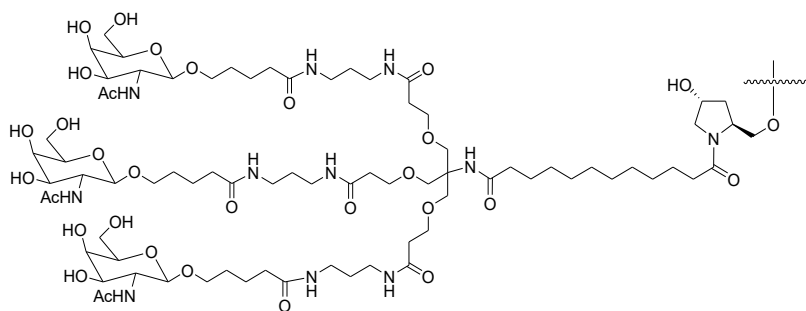


en donde el agente de ARNdh está en forma de sal de sodio y todos los grupos fosfodiéster y/o fosforotioato en el agente comprenden un contraión de sodio.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una jeringa precargada de un solo uso de 1 mL que comprende una aguja 29G, en donde la jeringa comprende aproximadamente 0,8 mL de una composición farmacéutica para inhibir la expresión de un gen de Serpincl, en donde la composición farmacéutica comprende un agente de ácido ribonucleico de doble hebra (ARNdh) a una concentración de aproximadamente 106 mg/mL y solución salina tamponada con fosfato (PBS) a una concentración de aproximadamente 5 mM, en donde el pH de la composición farmacéutica es de aproximadamente 6,8 a aproximadamente 7,2, en donde el agente de ARNdh tiene la estructura



en donde Am, Gm, Cm y Um son 2'-O-metilo (2'-OMe) A, G, C y U; Af, Gf, Cf y Uf son 2'-fluoro A, G, C, U; s es un enlace fosforotioato; y en donde L96 es un ligando y conector que tiene la siguiente estructura:



en donde el agente de ARNdh está en forma de sal de sodio y todos los grupos fosfodiéster y/o fosforotioato en el agente comprenden un contraión de sodio.

Breve Compendio de los Dibujos

La Figura 1 muestra un cromatograma de Cromatografía Líquida de Alta Resolución de Fase Inversa por Apareamiento Iónico (IP RP-HPLC) no desnaturalizante representativo del producto farmacológico de fitusirán. Se observó una división leve ocasional del pico del dúplex de fitusirán debido a la resolución parcial de diferentes estereoisómeros de fosforotioatos en el dúplex de ARNip. El análisis espectrométrico de masas del pico de fitusirán confirmó la presencia de las masas esperadas de ambas hebras sencillas en una proporción igual en todo el pico del dúplex.

La Figura 2 muestra un cromatograma de Cromatografía Líquida de Alta Resolución de Intercambio Aniónico (AX-HPLC) desnaturalizante representativo de hebras sencillas en dúplex en el producto farmacológico de fitusirán.

La Figura 3 representa un perfil cromatográfico de Cromatografía Líquida de Alta Resolución de Fase Inversa por Apareamiento Iónico (IP RP-HPLC) desnaturalizante representativo de hebras sencillas en dúplex en el producto farmacológico de fitusirán.

Descripción Detallada de la Invención

La presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un agente de ARNi que efectúa la escisión mediada por el complejo silenciador inducido por ARN (RISC) de los transcritos de ARN de un gen de Serpinc1. La presente invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de composiciones farmacéuticas estables que comprenden tales agentes que tienen una mejor estabilidad, eficacia, durabilidad y facilidad de administración en comparación con otras composiciones que comprenden un agente de ARNdh que inhibe la expresión de un gen de Serpinc1. Tales composiciones farmacéuticas son útiles para inhibir la expresión de un gen de Serpinc1 y/o para tratar a un sujeto que tiene un trastorno que se beneficiaría de la inhibición o reducción de la expresión de un gen de Serpinc1, p. ej., un trastorno hemorrágico, tal como una hemofilia.

La siguiente descripción detallada divulga cómo preparar y utilizar composiciones que contienen ARNi para inhibir la expresión de un gen de Serpinc1, así como composiciones, usos y métodos para tratar a sujetos que tienen enfermedades y trastornos que se beneficiarían de la inhibición y/o reducción de la expresión de este gen.

I. Definiciones

Con el fin de que la presente invención pueda entenderse más fácilmente, primero se definen ciertos términos. Además, se debe observar que siempre que se enumera un valor o intervalo de valores de un parámetro, se pretende que los valores e intervalos intermedios a los valores enumerados también formen parte de esta invención.

Los artículos "un", "uno", y "una" se emplean en la presente memoria para hacer referencia a uno o más de uno (es decir, al menos uno) de los objetos gramaticales del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento, p. ej., una pluralidad de elementos.

El término "aproximadamente" se emplea en la presente memoria para significar dentro de los intervalos típicos de tolerancias en la técnica. Por ejemplo, "aproximadamente" se puede entender como aproximadamente 2 desviaciones típicas de la media. En ciertas realizaciones, aproximadamente significa +10%. En ciertas realizaciones, aproximadamente significa +5%. Cuando aproximadamente está presente antes de una serie de números o un intervalo, se entiende que "aproximadamente" puede modificar cada uno de los números de la serie o intervalo.

El término "que incluye" se emplea en la presente memoria para significar, y se emplea de manera indistinta con, la frase "que incluye, pero no se limita a".

El término "o" se emplea en la presente memoria para significar, y se emplea de manera indistinta con, el término "y/o", a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

El término "composición farmacéutica", como se emplea en la presente memoria, se refiere a una composición que es útil para tratar una enfermedad o trastorno en un sujeto, p. ej., un sujeto humano.

El término "administración farmacéutica" se refiere al suministro de una composición que comprende un agente de ARNdh, como se describe en la presente memoria, a un sujeto para tratar una enfermedad o trastorno. Por tanto, "adecuada para administración farmacéutica" tal como "adecuada para la administración subcutánea" describe una composición que comprende un agente de ARNdh que se puede utilizar para tratar una enfermedad o trastorno en un sujeto mediante administración subcutánea de la composición farmacéutica. Una composición farmacéutica es adecuada para la administración farmacéutica, p. ej., adecuada para la administración subcutánea.

El término "osmolalidad" se refiere al número de osmoles de soluto por kilogramo de disolvente. Se expresa en términos de osmol/kg u Osm/kg. Un "osmol" es una unidad de medida que describe la cantidad de moles de un compuesto que contribuyen a la presión osmótica de una solución química.

Como se emplea en la presente memoria, "Serpinc1" se refiere a un polipéptido particular expresado en una célula. Serpinc1 también se conoce como inhibidor de la peptidasa de serpina, clado C (antitrombina; AT), miembro 1; antitrombina III; AT3; antitrombina; y cofactor de heparina 1. La secuencia de un transcrito de ARNm de Serpinc1 humano se puede encontrar, por ejemplo, en el Núm. de Acceso GenBank GI: 254588059 (NM_000488; SEQ ID NO: 1). La secuencia de ARNm de Serpinc1 de rhesus se puede encontrar, por ejemplo, en el Núm. de Acceso GenBank GI: 157167169 (NM_001104583; SEQ ID NO: 2). La secuencia de ARNm de Serpinc1 de ratón se puede encontrar, por ejemplo, en el Núm. de Acceso GenBank GI: 237874216 (NM_080844; SEQ ID NO: 3). La secuencia de ARNm de Serpinc1 de rata se puede encontrar, por ejemplo, en el Núm. de Acceso GenBank GI: 58865629 (NM_001012027; SEC ID NO: 4).

El término "Serpinc1", como se emplea en la presente memoria, también se refiere a un polipéptido particular expresado en una célula por variaciones de secuencia de ADN del gen de Serpinc1 de origen natural, tal como un polimorfismo de un solo nucleótido en el gen de Serpinc1. Se han identificado numerosos SNP dentro del gen de Serpinc1 y se pueden encontrar, por ejemplo, en NCBI dbSNP (véase, p. ej., www.ncbi.nlm.nih.gov/snp). Se pueden encontrar ejemplos no limitantes de SNP dentro del gen de Serpinc1 en, los Núm. de Acceso NCBI dbSNP rs677; rs5877; rs5878; rs5879; rs941988; rs941989; rs1799876; rs19637711; rs2008946; y rs2227586.

Como se emplea en la presente memoria, un "sujeto" es un animal, tal como un mamífero, incluido un primate (tal como un ser humano, un primate no humano, p. ej., un mono y un chimpancé), un no primate (tal como una vaca, un cerdo, un camello, una llama, un caballo, una cabra, un conejo, una oveja, un hámster, un conejillo de indias, un gato, un perro, una rata, un ratón, un caballo y una ballena), o un ave (p. ej., un pato o un ganso). En una realización, el sujeto es un ser humano, tal como un ser humano tratado o evaluado para una enfermedad, trastorno o afección que se beneficiaría de la reducción de la expresión de Serpinc1; un ser humano en riesgo de padecer una enfermedad, trastorno o afección que se beneficiaría de la reducción de la expresión de Serpinc1; un ser humano que tiene una enfermedad, trastorno o afección que se beneficiaría de la reducción de la expresión de Serpinc1; y/o un ser humano que está siendo tratado de una enfermedad, trastorno o afección que se beneficiaría de la reducción de la expresión de Serpinc1 como se describe en la presente memoria.

El término "inhibir", como se emplea en la presente memoria, se utiliza indistintamente con "reducir", "silenciar", "regular por disminución", "suprimir" y otros términos similares, e incluye cualquier nivel de inhibición.

La frase "inhibir la expresión de un Serpinc1", como se emplea en la presente memoria, incluye la inhibición de la expresión de cualquier gen de Serpinc1 (tal como, p. ej., un gen de Serpinc1 de ratón, un gen de Serpinc1 de rata, un gen de Serpinc1 de mono o un gen de Serpinc1 humano) así como variantes o mutantes de un gen de Serpinc1 que codifica una proteína Serpinc1.

"Inhibir la expresión de un gen de Serpinc1" incluye cualquier nivel de inhibición de un gen de Serpinc1, p. ej., al menos una supresión parcial de la expresión de un gen de 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 de Serpinc1 se puede evaluarse basándose en el nivel de cualquier variable asociada con la expresión del gen de Serpinc1, p. ej., nivel de ARNm de

Serpinc1, nivel de proteína de Serpinc1 o, por ejemplo, niveles de complejo de trombina:antitrombina como una medida del potencial de generación de trombina, tiempo de sangrado, tiempo de protrombina (TP), recuento de plaquetas y/o tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT). La inhibición puede evaluarse mediante una disminución en un nivel absoluto o relativo de una o más de estas variables en comparación con un nivel de control. El nivel de control puede ser cualquier tipo de nivel de control que se utilice en la técnica, p. ej., un nivel de referencia previo a la dosis o un nivel determinado a partir de un sujeto, célula o muestra similar que no estén tratados o estén tratados con un control (tal como, p. ej., control de tampón solo o control de agente inactivo).

En una realización, la supresión al menos parcial de la expresión de un gen de Serpinc1 se evalúa mediante una reducción de la cantidad de ARNm de Serpinc1 que puede aislarse o detectarse en una primera célula o grupo de células en los que se transcribe un gen de Serpinc1 y que ha sido o han sido tratados de tal manera que se inhiba la expresión de un gen de Serpinc1, en comparación con una segunda célula o grupo de células sustancialmente idénticos a la primera célula o grupo de células, pero que no ha sido o no han sido tratados (células de control). El grado de inhibición se puede expresar en términos de

$$\frac{(\text{ARNm en las células de control}) - (\text{ARNm en las células tratadas})}{(\text{ARNm en las células de control})} \cdot 100\%$$

La frase "poner en contacto una célula con un agente de iARN", tal como un ARNd_h, como se emplea en la presente memoria, incluye poner en contacto una célula por cualquier medio posible. Poner en contacto una célula con un agente de iARN incluye poner en contacto una célula in vitro con el ARNi o poner en contacto una célula in vivo con el ARNi. El contacto se puede realizar directa o indirectamente. Así, por ejemplo, el agente de iARN puede ser puesto en contacto físico con la célula por el individuo que realiza el método, o alternativamente, el agente de iARN puede ponerse en una situación que permita o haga que entre en contacto posteriormente con la célula.

El contacto con una célula in vitro se puede realizar, por ejemplo, incubando la célula con el agente de iARN. El contacto con una célula in vivo se puede realizar, por ejemplo, inyectando el agente de iARN en el tejido donde se encuentra la célula o cerca de él, o inyectando el agente de iARN en otra zona, p. ej., el torrente sanguíneo o el espacio subcutáneo, de modo que el agente llegue posteriormente al tejido donde se encuentra la célula con la que se va a poner en contacto. Por ejemplo, el agente de iARN puede contener y/o estar acoplado a un ligando, p. ej., GalNAc3, que dirige el agente de iARN a un sitio de interés, p. ej., el hígado. También son posibles combinaciones de métodos de contacto in vitro e in vivo. Por ejemplo, una célula

también puede ponerse en contacto in vitro con un agente de iARN y posteriormente trasplantarse a un sujeto.

II. Composiciones Farmacéuticas de la Invención

5 La presente invención proporciona composiciones farmacéuticas estables que comprenden un agente de ácido ribonucleico de doble hebra (ARNdh) que inhibe la expresión de un gen de Serpinc1. Las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen un agente de ARNdh, como se describe en la presente memoria, y solución salina tamponada con fosfato (PBS), y son adecuadas para la administración subcutánea a un sujeto. Las composiciones
10 farmacéuticas que contienen los agentes de ARNdh son útiles para tratar una enfermedad o trastorno asociados con la expresión o actividad de un gen de Serpinc1, p. ej., una enfermedad asociada a Serpinc1, por ejemplo, una hemofilia. Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden administrar en dosificaciones suficientes para inhibir la expresión de un gen de Serpinc1.

15 En una realización, las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agentes de ARNdh de la invención en forma de ácido libre. En otra realización, las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agentes de ARNdh de la invención en forma de sal de sodio. En ciertas realizaciones, cuando los agentes de ARNdh de la invención están en forma de sal de sodio, los iones de sodio están presentes en el agente como contraiones (para mantener la
20 neutralidad eléctrica), para sustancialmente todos los grupos fosfodiéster y/o fosforotiotato presentes en el agente. Los agentes en los que sustancialmente todos los enlaces fosfodiéster y/o fosforotioato tienen un contraión de sodio incluyen no más de 5, 4, 3, 2 o 1 enlaces fosfodiéster y/o fosforotioato sin un contraión de sodio. En algunas realizaciones, cuando los agentes de ARNdh están en forma de sal de sodio, los iones de sodio están presentes en el agente como
25 contraiones para todos los grupos fosfodiéster y/o fosforotiotato presentes en el agente.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir un agente de ARNdh a una concentración de aproximadamente 50 mg/mL a aproximadamente 200 mg/mL, de aproximadamente 50 mg/mL a aproximadamente 150 mg/mL; de aproximadamente 90 mg/mL a aproximadamente 110 mg/mL, de aproximadamente 90 mg/mL a aproximadamente 100 mg/mL,
30 o de aproximadamente 80 mg/mL a aproximadamente 110 mg/mL, p. ej., aproximadamente 50 mg/mL, 55 mg/mL, 60 mg/mL, 65 mg/mL, 70 mg/mL, 75 mg/mL, 80 mg/mL, 85 mg/mL, 90 mg/mL, 95 mg/mL, 100 mg/mL, 105 mg/mL, 106 mg/mL, 110 mg/mL, 115 mg/mL, 120 mg/mL, 125 mg/mL, 130 mg/mL, 135 mg/mL, 140 mg/mL, 145 mg/mL, 150 mg/mL, 155 mg/mL, 160 mg/mL, 165 mg/mL, 170 mg/mL, 175 mg/mL, 180 mg/mL, 185 mg/mL, 190
35 mg/mL, 195 mg/mL o aproximadamente 200 mg/mL. En una realización, las composiciones

farmacéuticas de la invención incluyen un agente de ARNdh a una concentración de aproximadamente 100 mg/mL. También se pretende que los valores intermedios de los intervalos y valores mencionados anteriormente sean parte de esta invención. Además, se pretende que se incluyan los intervalos de valores que utilizan una combinación de cualquiera de los valores mencionados anteriormente como límites superior y/o inferior.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir PBS. En una realización, el PBS incluye cloruro de sodio y fosfato de sodio, pero no incluye cloruro de potasio y/o fosfato de potasio. En otra realización, el PBS incluye cloruro de sodio, fosfato de sodio y cloruro de potasio. En otra realización más, el PBS incluye cloruro de sodio, fosfato de sodio y fosfato de potasio. En una realización, el PBS incluye cloruro de sodio, fosfato de sodio, cloruro de potasio y fosfato de potasio. En ciertas realizaciones, p. ej., cuando el PBS incluye cloruro de sodio y fosfato de sodio, el PBS puede estar a una concentración de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 10 mM; o de aproximadamente 3 mM a aproximadamente 6 mM, p. ej., PBS a aproximadamente 1 mM, 1,5 mM, 2 mM, 2,5 mM, 3 mM, 3,5 mM, 4 mM, 4,5 mM, 5 mM, 6,5 mM, 7 mM, 7,5 mM, 9 mM, 8,5 mM, 9 mM, 9,5 mM o aproximadamente 10 mM. En una realización de la invención, una composición farmacéutica de la invención incluye PBS a una concentración de aproximadamente 5 mM (p. ej., NaH_2PO_4 aproximadamente 0,64 mM, Na_2HPO_4 aproximadamente 4,36 mM, NaCl aproximadamente 85 mM). También se pretende que los valores intermedios de los intervalos y valores mencionados anteriormente sean parte de esta invención. Además, se pretende que se incluyan los intervalos de valores que utilizan una combinación de cualquiera de los valores mencionados anteriormente como límites superior y/o inferior.

En una realización, las composiciones farmacéuticas de la invención no contienen conservantes. En otra realización de la invención, las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen un conservante.

El pH de las composiciones farmacéuticas de la invención es adecuado para la administración subcutánea y puede estar entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 8,0, aproximadamente 5,5 y aproximadamente 8,0, aproximadamente 6,0 y aproximadamente 8,0, aproximadamente 6,5 y aproximadamente 8,0, aproximadamente 7,0 y aproximadamente 8,0, aproximadamente 5,0 y aproximadamente 7,5, aproximadamente 5,5 y aproximadamente 7,5, aproximadamente 6,0 y aproximadamente 7,5, aproximadamente 6,5 y aproximadamente 7,5, aproximadamente 5,0 y aproximadamente 7,2, aproximadamente 5,25 y aproximadamente 7,2, aproximadamente 5,5 y aproximadamente 7,2, aproximadamente 5,75 y aproximadamente 7,2, aproximadamente 6,0 y aproximadamente 7,2, aproximadamente 6,5 y aproximadamente 7,2, o

aproximadamente 6,8 y aproximadamente 7,2. También se pretende que los intervalos y valores intermedios de los intervalos y valores mencionados anteriormente sean parte de esta invención.

La osmolalidad de las composiciones farmacéuticas de la invención puede ser adecuada para la administración subcutánea, tal como no más de aproximadamente 400 mOsm/kg, p. ej.,

5 entre 50 y 400 mOsm/kg, entre 75 y 400 mOsm/kg, entre 100 y 400 mOsm/kg, entre 125 y 400 mOsm/kg, entre 150 y 400 mOsm/kg, entre 175 y 400 mOsm/kg, entre 200 y 400 mOsm/kg, entre 250 y 400 mOsm/kg, entre 300 y 400 mOsm/kg, entre 50 y 375 mOsm/kg, entre 75 y 375 mOsm/kg, entre 100 y 375 mOsm/kg, entre 125 y 375 mOsm/kg, entre 150 y 375 mOsm/kg, entre 175 y 375 mOsm/kg, entre 200 y 375 mOsm/kg, entre 250 y 375 mOsm/kg, entre 300 y
10 375 mOsm/kg, entre 50 y 350 mOsm/kg, entre 75 y 350 mOsm/kg, entre 100 y 350 mOsm/kg, entre 125 y 350 mOsm/kg, entre 150 y 350 mOsm/kg, entre 175 y 350 mOsm/kg, entre 200 y 350 mOsm/kg, entre 250 y 350 mOsm/kg, entre 50 y 325 mOsm/kg, entre 75 y 325 mOsm/kg, entre 100 y 325 mOsm/kg, entre 125 y 325 mOsm/kg, entre 150 y 325 mOsm/kg, entre 175 y 325 mOsm/kg, entre 200 y 325 mOsm/kg, entre 250 y 325 mOsm/kg, entre 300 y 325 mOsm/kg,
15 entre 300 y 350 mOsm/kg, entre 50 y 300 mOsm/kg, entre 75 y 300 mOsm/kg, entre 100 y 300 mOsm/kg, entre 125 y 300 mOsm/kg, entre 150 y 300 mOsm/kg, entre 175 y 300 mOsm/kg, entre 200 y 300 mOsm/kg, entre 250 y 300, entre 50 y 250 mOsm/kg, entre 75 y 250 mOsm/kg, entre 100 y 250 mOsm/kg, entre 125 y 250 mOsm/kg, entre 150 y 250 mOsm/kg, entre 175 y 350 mOsm/kg, entre 200 y 250 mOsm/kg, p. ej., aproximadamente 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85,
20 90, 95, 100, 105, 110, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 205, 210, 215, 220, 225, 230, 235, 240, 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275, 280, 285, 295, 300, 305, 310, 320, 325, 330, 335, 340, 345, 350, 355, 360, 365, 370, 375, 380, 385, 390, 395, o aproximadamente 400 mOsm/kg. También se pretende que los intervalos y valores intermedios de los intervalos y valores mencionados anteriormente sean parte de esta invención.
25 Además, se pretende que se incluyan los intervalos de valores que utilizan una combinación de cualquiera de los valores mencionados anteriormente como límites superior y/o inferior.

Las composiciones farmacéuticas de la invención son física y químicamente estables.

Como se emplea en la presente memoria, el término "estable" se refiere a una composición farmacéutica y/o un agente de ARNdh dentro de dicha composición farmacéutica
30 que esencialmente conserva su estabilidad física y/o estabilidad química y/o actividad biológica. Varias técnicas analíticas para medir la estabilidad de la composición y el agente de ARNdh en la misma están disponibles en la técnica y se describen en la presente memoria.

Una composición farmacéutica (o un agente de ARNdh dentro de tal composición) "conserva su estabilidad física" si sustancialmente no muestra signos de, p. ej., aumento de
35 impurezas en el examen visual o el examen UV de color y/o claridad, o medido, por ejemplo,

mediante análisis por HPLC, p. ej., IP RP-HPLC desnaturalizante, IP RP-HPLC no desnaturalizante y/o análisis AX-HPLC desnaturalizante.

Un agente de ARNdh "conserva su estabilidad química" en la composición farmacéutica, si la estabilidad química en un momento dado es tal que se considera que el agente de ARNdh aún conserva su actividad biológica. La estabilidad química puede evaluarse, p. ej., detectando y/o cuantificando formas químicamente alteradas del dúplex de ARNdh y/o formas químicamente alteradas de la hebra efectora y/o la hebra antisentido. La alteración química puede implicar la modificación del tamaño y/o el cambio del contenido de sodio que puede evaluarse, por ejemplo, mediante el tiempo de retención del dúplex y/o la identificación del peso molecular de las hebras sencillas que forman el dúplex utilizando, p. ej., IP RP-HPLC no desnaturalizante, identificación por temperatura de fusión utilizando, p. ej., espectrofotometría UV térmica, y/o mediante contenido de sodio (en base anhidra) utilizando, por ejemplo, Absorción Atómica de Llama (AAS de llama)/espectrometría de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES).

Un agente de ARNdh "retiene su actividad biológica" en una composición farmacéutica, si el agente de ARNdh en una composición es biológicamente activo para su propósito previsto. Por ejemplo, la actividad biológica se conserva si la actividad biológica de un agente de ARNdh en la composición está dentro de aproximadamente 30%, aproximadamente 20% o aproximadamente 10% (dentro de los errores del ensayo) de la actividad biológica exhibida en el momento en que la composición se preparó (p. ej., según se determina mediante un ensayo de RT-PCR in vitro).

Por ejemplo, en algunas realizaciones, las composiciones de la invención son estables entre aproximadamente 6 meses y aproximadamente 36 meses cuando se almacenan entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 8°C. En otras realizaciones, las composiciones de la invención son estables entre aproximadamente 6 meses y aproximadamente 36 meses cuando se almacenan a aproximadamente 25°C y 60% de humedad relativa (HR). En otra realización más, las composiciones de la invención son estables durante aproximadamente 6 meses cuando se almacenan a aproximadamente 40°C y 75% de humedad relativa (HR).

En algunas realizaciones, las composiciones de la invención son estables hasta aproximadamente 36 meses cuando se almacenan entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 8°C. En otras realizaciones, las composiciones de la invención son estables hasta aproximadamente 36 meses cuando se almacenan a aproximadamente 25°C y 60% de humedad relativa (HR). En otra realización más, las composiciones de la invención son estables hasta durante 6 meses cuando se almacenan a aproximadamente 40°C y 75% de humedad relativa (HR).

En una realización, las composiciones de la invención comprenden no menos de (NLT) aproximadamente 95,0% de área del dúplex y no más de (NMT) aproximadamente 5% de área de impurezas totales del dúplex determinadas por IPRP-HPLC no desnaturizante de pureza. En otra realización, las composiciones farmacéuticas de la invención comprenden no menos de (NLT) aproximadamente 85,0% de área de hebras sencillas totales determinadas por AX-HPLC desnaturizante de pureza. En otra realización más, las composiciones farmacéuticas de la invención comprenden no menos de (NLT) aproximadamente 80,0% de área de hebras sencillas totales determinada mediante IPRP-HPLC desnaturizante de pureza.

En un aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para inhibir la expresión de un gen de *Serpinc1*. La composición farmacéutica incluye un agente de ácido ribonucleico de doble hebra (ARNdh) a una concentración de aproximadamente 50 mg/mL a aproximadamente 200 mg/mL y solución salina tamponada con fosfato (PBS) a una concentración de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 10 mM, en donde el pH y la osmolalidad de la composición farmacéutica son adecuados para la administración subcutánea a un sujeto, en donde el agente de ARNdh comprende una hebra efectora y una hebra antisentido, comprendiendo la hebra antisentido una región de complementariedad con un ARNm que codifica *Serpinc1* que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos. que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos 5' - UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG – 3' (SEQ ID NO: 15), en donde sustancialmente todos los nucleótidos de la hebra efectora y sustancialmente todos los nucleótidos de la hebra antisentido son nucleótidos modificados, en donde la hebra efectora está conjugada con un ligando anclado en el extremo 3', y en donde el agente de ARNdh está en forma de ácido libre.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para inhibir la expresión de un gen de *Serpinc1*. La composición farmacéutica incluye un agente de ácido ribonucleico de doble hebra (ARNdh) a una concentración de aproximadamente 50 mg/mL a aproximadamente 200 mg/mL y solución salina tamponada con fosfato (PBS) a una concentración de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 10 mM, en donde el pH y la osmolalidad de la composición farmacéutica son adecuados para la administración subcutánea a un sujeto, en donde el agente de ARNdh comprende una hebra efectora y una hebra antisentido, comprendiendo la hebra antisentido una región de complementariedad con un ARNm que codifica *Serpinc1* que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos 5'- UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG– 3' (SEQ ID NO: 15), en donde sustancialmente todos los nucleótidos de la hebra efectora y

sustancialmente todos los nucleótidos de la hebra antisentido son nucleótidos modificados, en donde la hebra efectora está conjugada con un ligando anclado en el extremo 3', y en donde el agente de ARNdH está en forma de sal.

5 En una realización, todos los nucleótidos de la hebra efectora y todos los nucleótidos de la hebra antisentido son nucleótidos modificados.

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

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

En una realización, la región de complementariedad tiene una longitud de entre 19 y 21 nucleótidos. En otra realización, la región de complementariedad tiene una longitud de entre 21 y
15 23 nucleótidos.

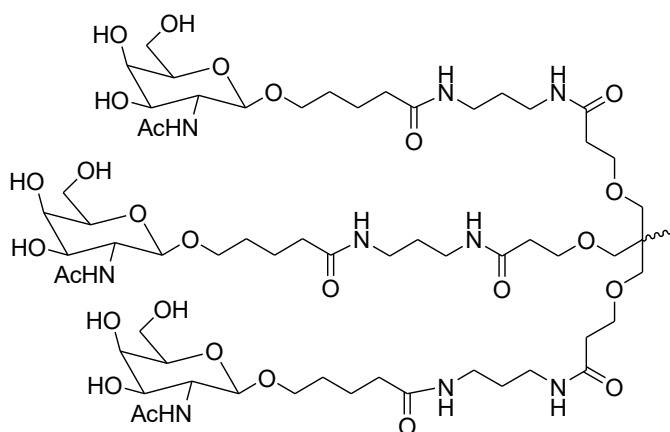
En una realización, cada hebra no tiene más de 30 nucleótidos de longitud.

Al menos una hebra del agente de iARN de doble hebra puede comprender un saliente 3' de al menos 1 nucleótido o un saliente 3' de al menos 2 nucleótidos, p. ej., 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 nucleótidos. En otras realizaciones, al menos una hebra del agente de iARN
20 comprende un saliente 5' de al menos 1 nucleótido. En ciertas realizaciones, al menos una hebra comprende un saliente 5' de al menos 2 nucleótidos, p. ej., 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 nucleótidos. En otras realizaciones más, tanto el extremo 3' como el 5' de una hebra del agente de iARN comprenden un saliente de al menos 1 nucleótido.

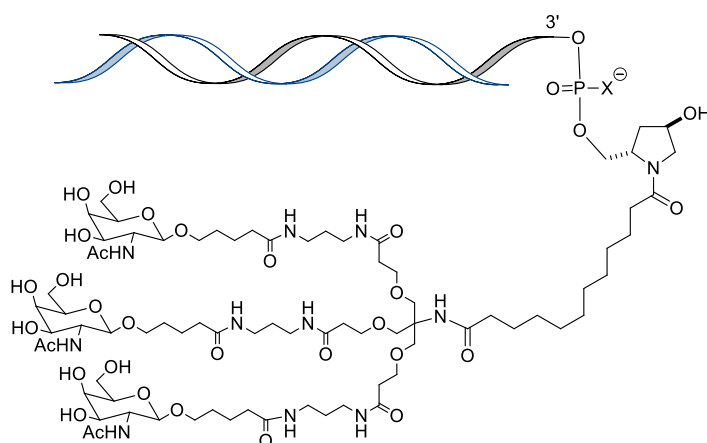
En ciertas realizaciones, el ligando es una N-acetilgalactosamina (GalNAc). El ligando
25 puede ser una o más GalNAc ancladas al agente de iARN a través de un conector ramificado monovalente, bivalente o trivalente. El ligando se puede conjugar con el extremo 3' de la hebra efectora del agente de iARN de doble hebra, el extremo 5' de la hebra efectora del agente de iARN de doble hebra, el extremo 3' de la hebra antisentido del agente de iARN de doble hebra, o el extremo 5' de la hebra antisentido del agente de iARN de doble hebra.

30 En algunas realizaciones, los agentes de iARN de doble hebra comprenden una pluralidad, p. ej., 2, 3, 4, 5 o 6, de GalNAc, cada una anclada independientemente a una pluralidad de nucleótidos del agente de iARN de doble hebra a través de una pluralidad de conectores monovalentes.

En ciertas realizaciones, el ligando es



En una realización, el agente de iARN se conjuga con el ligando a través de un conector y el ligando y el conector se conjugan con el agente de iARN como se muestra en el siguiente esquema.



5

y, en donde X es O o S.

En una realización, X es O.

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

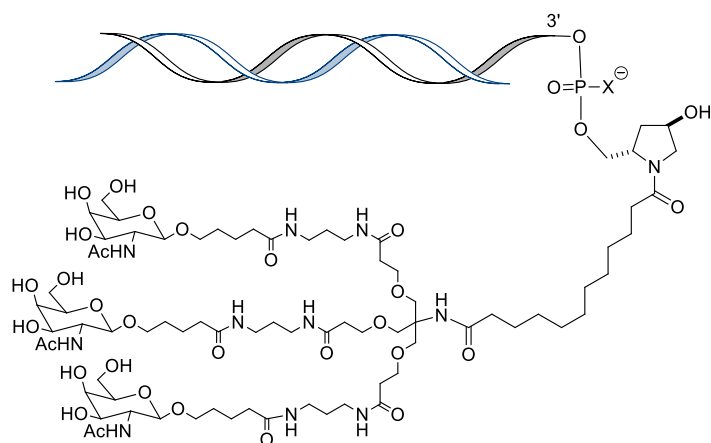
En una realización, el agente de iARN de doble hebra comprende una hebra efectora que comprende la secuencia de nucleótidos 5'-GGUUAACACCAUUUACUUCAA-3' (SEC ID NO: 16), y una hebra antisentido que comprende la secuencia de nucleótidos 5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3' (SEC ID NO: 15).

En una realización, la hebra efectora comprende 5'-GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf-3' (SEQ ID NO:13) y la hebra antisentido comprende 5'-usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg-3' (SEQ ID NO: 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 2'-fluoro A, C, G o U; y s es un enlace fosforotioato.

En una realización, la hebra efectora comprende 5'-GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf-3' (SEQ ID NO:13) y la hebra antisentido comprende 5'-usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg-3' (SEQ ID NO: 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 2'-fluoro A, C, G o U; y s es un enlace fosforotioato.

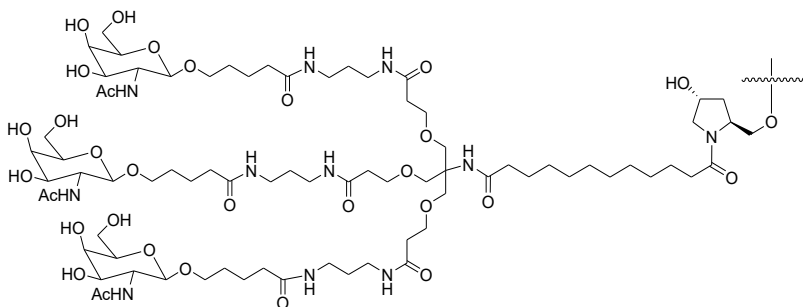
20

es un enlace fosforotioato; y en donde la hebra efectora se conjuga con el ligando a través de un conector y el ligando y el conector se conjugan con el agente de iARN como se muestra en el siguiente esquema



y, en donde X es O o S.

- 5 En un aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para inhibir la expresión de un gen de *Serpinc1*. La composición farmacéutica incluye un agente de ácido ribonucleico de doble hebra (ARNdh) a una concentración de aproximadamente 50 mg/mL a aproximadamente 200 mg/mL y solución salina tamponada con fosfato (PBS) a una concentración de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 10 mM, en donde el pH y la
- 10 osmolalidad de la composición farmacéutica son adecuados para la administración subcutánea a un sujeto, en donde el agente de ARNdh tiene una hebra efectora que consiste en la secuencia de nucleótidos 5'- GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf - 3' (SEQ ID NO: 941) y una hebra antisentido que consiste en la secuencia de nucleótidos 5'-
- 15 usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg- 3' (SEQ ID NO: 960), en donde a, g, c y u son 2'-O-metilo (2'-OMe) A, G, C y U; Af, Gf, Cf y Uf son 2'-fluoro A, G, C, U; y s es un enlace fosforotioato, y en donde un ligando está conjugado con el extremo 3' de la hebra efectora a través de un conector, y en donde el ligando y el conector tienen la siguiente estructura:

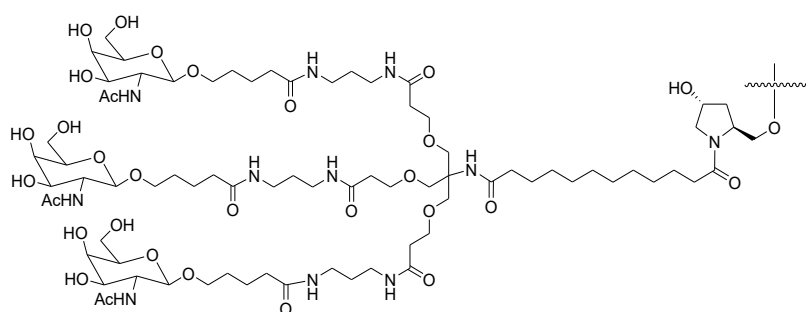


, en donde el agente de

ARNdh está en forma de ácido libre.

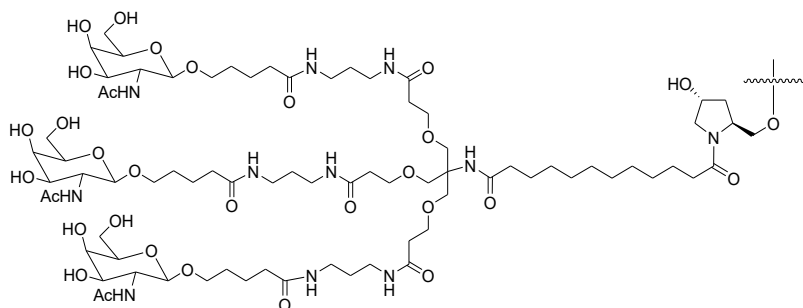
- 20 En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para inhibir la expresión de un gen de *Serpinc1*. La composición farmacéutica incluye un agente de ácido ribonucleico de doble hebra (ARNdh) a una concentración de aproximadamente 50 mg/mL a aproximadamente 200 mg/mL y solución salina tamponada con fosfato (PBS) a una

concentración de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 10 mM, en donde el pH y la osmolalidad de la composición farmacéutica son adecuados para la administración subcutánea a un sujeto, en donde el agente de ARNdh tiene una hebra efectora que consiste en la secuencia de nucleótidos 5'- GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf - 3' (SEQ ID NO: 941) y una hebra antisentido que consiste en la secuencia de nucleótidos 5'-
 5 usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg- 3' (SEQ ID NO: 960), en donde a, g, c y u son 2'-O-metilo (2'-OMe) A, G, C y U; Af, Gf, Cf y Uf son 2'-fluoro A, G, C, U; y s es un enlace fosforotioato, y en donde un ligando está conjugado con el extremo 3' de la hebra efectora a través de un conector, y en donde el ligando y el conector tienen la siguiente estructura:



10 , en donde el agente de ARNdh está en forma de sal.

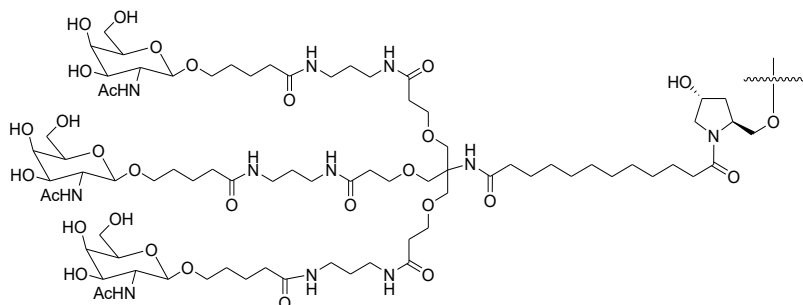
En un aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para inhibir la expresión de un gen de Serpinc1. Las composiciones incluyen un agente de ácido ribonucleico de doble hebra (ARNdh) a una concentración de aproximadamente 100 mg/mL y solución salina tamponada con fosfato (PBS) a una concentración de aproximadamente 5 mM, en
 15 donde el pH de la composición farmacéutica es de aproximadamente 6,8 a aproximadamente 7,2, en donde la osmolalidad de la composición farmacéutica es de aproximadamente 300 mOsm/kg, en donde el agente de ARNdh tiene una hebra efectora que consiste en la secuencia de nucleótidos 5'- GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf - 3' (SEQ ID NO: 941) y una hebra
 20 antisentido que consiste en la secuencia de nucleótidos 5'- usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg- 3' (SEQ ID NO: 960), en donde a, g, c y u son 2'-O-metilo (2'-OMe) A, G, C y U; Af, Gf, Cf y Uf son 2'-fluoro A, G, C, U; y s es un enlace fosforotioato, y en donde un ligando está conjugado con el extremo 3' de la hebra efectora a través de un conector, y en donde el ligando y el conector tienen la siguiente estructura:



, en donde el agente de

ARNdh está en forma de ácido libre.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para inhibir la expresión de un gen de Serpinc1. Las composiciones farmacéuticas incluyen un agente de ácido ribonucleico de doble hebra (ARNdh) a una concentración de aproximadamente 106 mg/mL y solución salina tamponada con fosfato (PBS) a una concentración de aproximadamente 5 mM, en donde el pH de la composición farmacéutica es de aproximadamente 6,8 a aproximadamente 7,2, en donde la osmolalidad de la composición farmacéutica es de aproximadamente 300 mOsm/kg, en donde el agente de ARNdh tiene una hebra efectora que consiste en la secuencia de nucleótidos 5'- GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf - 3' (SEQ ID NO: 941) y una hebra antisentido que consiste en la secuencia de nucleótidos 5'- usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg- 3' (SEQ ID NO: 960), en donde a, g, c y u son 2'-O-metilo (2'-OMe) A, G, C y U; Af, Gf, Cf y Uf son 2'-fluoro A, G, C, U; y s es un enlace fosforotioato, y en donde un ligando está conjugado con el extremo 3' de la hebra efectora a través de un conector, y en donde el ligando y el conector tienen la siguiente estructura:



, en donde el agente de

ARNdh está en forma de sal.

Las composiciones de la presente invención pueden contener adicionalmente otros componentes adjuntos que se encuentran convencionalmente en las composiciones farmacéuticas, en sus niveles de uso establecidos en la técnica. Así, por ejemplo, las composiciones pueden contener materiales farmacéuticamente activos compatibles, adicionales, tales como, por ejemplo, agentes antipruriginosos, astringentes, anestésicos locales o antiinflamatorios, o pueden contener materiales adicionales útiles para formular físicamente diversas formas de dosificación de las composiciones de la presente invención, tales como tintes, agentes aromatizantes, conservantes, antioxidantes, opacificantes, agentes espesantes y

estabilizantes. Sin embargo, tales materiales, cuando se añaden, no deben interferir indebidamente en las actividades biológicas de los componentes de las composiciones de la presente invención. Las formulaciones se pueden esterilizar y, si se desea, mezclar con agentes auxiliares, p. ej., lubricantes, conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, sales para influir en la presión osmótica, tampones, colorantes, aromatizantes y/o sustancias aromáticas y similares que no interactúan de forma perjudicial con el ácido o los ácidos nucleicos de la formulación.

En algunas realizaciones, 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 que no es de iARN y que son útiles en el tratamiento de un trastorno hemolítico. Los ejemplos de tales agentes incluyen, pero no se limitan a, un agente antiinflamatorio, agente anti-esteatosis, agente anti-viral y/o anti-fibrosis. Además, también se pueden utilizar otras sustancias comúnmente utilizadas para proteger el hígado, tales como silimarina, junto con los ARNi descritos en la presente memoria. Otros agentes útiles para tratar enfermedades hepáticas incluyen telbivudina, entecavir e inhibidores de proteasa tales como telaprevir y otros descritos, por ejemplo, por Tung et al., en las Publicaciones de Solicitud de Estados Unidos Núm. 2005/0148548, 2004/0167116 y 2003/0144217; y por Hale et al., en la Publicación de la Solicitud de Estados Unidos Núm. 2004/0127488.

La toxicidad y la eficacia terapéutica de tales compuestos se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales de experimentación, p. ej., para determinar la LD50 (la dosis letal para 50% de la población) y la DE50 (la dosis terapéuticamente eficaz en 50% de la población). La razón de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y se puede expresar como la razón DL50/DE50. Se prefieren los compuestos que exhiben altos índices terapéuticos.

III. ARNi para su Uso en las Composiciones Farmacéuticas de la Invención

Las composiciones de la invención incluyen agentes de iARN que se dirigen a un gen de Serpinc1 e inhiben la expresión del gen de Serpinc1 en una célula, tal como una célula dentro de un sujeto, p. ej., un mamífero, tal como un ser humano que tiene un trastorno asociado con Serpinc1, p. ej., un trastorno hemorrágico, p. ej., hemofilia.

Como se emplea en la presente memoria, "secuencia diana" se refiere a una porción contigua de la secuencia de nucleótidos de una molécula de ARNm formada durante la transcripción de un gen de Serpinc1, incluido el ARNm que es un producto del procesamiento de ARN de un producto de transcripción primario. En una realización, la porción diana de la secuencia será al menos lo suficientemente larga para servir como sustrato para la escisión

dirigida por ARNi en o cerca de esa porción de la secuencia de nucleótidos de una molécula de ARNm formada durante la transcripción de un gen de Serpinc1.

La secuencia diana puede tener una longitud de aproximadamente 9-36 nucleótidos, p. ej., una longitud de aproximadamente 15-30 nucleótidos. Por ejemplo, la secuencia diana puede tener una longitud de aproximadamente 15-30 nucleótidos, 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23, o 21-22 nucleótidos. Los intervalos y longitudes intermedios a los intervalos y longitudes mencionados anteriormente también se contemplan como parte de la invención.

Como se emplea en la presente memoria, el término "hebra que comprende una secuencia" se refiere a un oligonucleótido que comprende una cadena de nucleótidos que se describe mediante la secuencia a la que se hace referencia utilizando la nomenclatura de nucleótidos convencional.

"G", "C", "A", "T" y "U" generalmente representan cada uno un nucleótido que contiene guanina, citosina, adenina, timidina y uracilo como base, respectivamente. Sin embargo, se entenderá que los términos "ribonucleótido" o "nucleótido" también se pueden referir a un nucleótido modificado, como se detalla adicionalmente más adelante, o un radical de reemplazo sustituto (véase, p. ej., la Tabla 1). El experto en la técnica es muy consciente de que la guanina, la citosina, la adenina y el uracilo se pueden reemplazar por otros radicales sin alterar sustancialmente las propiedades de emparejamiento de bases de un oligonucleótido que comprende un nucleótido que porta tal radical de reemplazo. Por ejemplo, sin limitación, un nucleótido que comprende inosina como base puede experimentar emparejamiento de bases con nucleótidos que contienen adenina, citosina o uracilo. Por tanto, los nucleótidos que contienen uracilo, guanina, o adenina se puede reemplazar en las secuencias de nucleótidos del ARNdH presentado en la invención por un nucleótido que contiene, por ejemplo, inosina. En otro ejemplo, la adenina y la citosina en cualquier parte del oligonucleótido se pueden reemplazar por guanina y uracilo, respectivamente, para formar el emparejamiento de bases Wobble de G-U con el ARNm diana. Las secuencias que contienen tales radicales de reemplazo son adecuadas para las composiciones y métodos presentados en la invención.

Los términos "ARNi", "agente de iARN", "agente de ARNi", "agente de ARN de interferencia" como se emplean indistintamente en la presente memoria, se refieren a un agente que contiene ARN como se define ese término en la presente memoria, y que media la escisión dirigida de un transcrito de ARN a través de una vía del complejo de silenciamiento inducido por

ARN (RISC). El ARNi dirige la degradación específica de la secuencia del ARNm a través de un proceso conocido como interferencia de ARN (iARN). El ARNi modula, p. ej., inhibe, la expresión de *Serpinc1* en una célula, p. ej., una célula dentro de un sujeto, tal como un sujeto mamífero.

5 En una realización, un agente de iARN de la invención incluye un ARN de hebra sencilla que interactúa con una secuencia de ARN diana, p. ej., una secuencia de ARNm diana de *Serpinc1*, para dirigir la escisión del ARN diana. Sin desear vincularse a ninguna teoría, se cree que el ARN de doble hebra largo introducido en las células se descompone en ARNip por una endonucleasa Tipo III conocida como Dicer (Sharp et al. (2001) *Genes Dev.* 15:485). Dicer, una
10 enzima similar a la ribonucleasa III, procesa el ARNdih a ARN de interferencia cortos de 19-23 pares de bases con salientes 3' de dos bases característicos (Bernstein, et al., (2001) *Nature* 409:363). Los ARNip se incorporan a continuación a un complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) donde una o más helicasas desenrollan el dúplex de ARNip, permitiendo que la hebra complementaria antisentido guíe el reconocimiento de la diana (Nykanen, et al., (2001)
15 *Cell* 107:309). Tras la unión al ARNm diana apropiado, una o más endonucleasas dentro del RISC escinden la diana para inducir el silenciamiento (Elbashir, et al., (2001) *Genes Dev.* 15: 188). Por tanto, en un aspecto, la invención se refiere a un ARN de hebra sencilla (ARNip) generado dentro de una célula y que promueve la formación de un complejo RISC para efectuar el silenciamiento del gen diana, es decir, un gen de *Serpinc1*. Por consiguiente, el término
20 "ARNip" también se utiliza en la presente memoria para hacer referencia a un iARN como se describió anteriormente.

 En otra realización, el agente de iARN puede ser un ARNip de hebra sencilla que se introduce en una célula u organismo para inhibir un ARNm diana. Los agentes de iARN de hebra sencilla se unen a la endonucleasa RISC, Argonaute 2, que a continuación escinde el ARNm
25 diana. Los ARNip de hebra sencilla tienen generalmente 15-30 nucleótidos y están modificados químicamente. El diseño y la prueba de ARNip de hebra sencilla son descritos en la Patente de Estados Unidos Núm. 8.101.348 y por Lima et al., (2012) en *Cell* 150: 883-894, el contenido completo de cada una de las cuales se incorpora a la presente memoria como referencia. Cualquiera de las secuencias de nucleótidos antisentido descritas en la presente memoria se
30 puede utilizar en forma de un ARNip de hebra sencilla como se describe en la presente memoria o en forma modificada químicamente mediante los métodos descritos por Lima et al., (2012) *Cell* 150: 883-894.

 En otra realización, un "ARNi" para su uso en las composiciones, usos y métodos de la invención es un ARN de doble hebra y se denomina en la presente memoria "agente de iARN de
35 doble hebra", "molécula de ARN de doble hebra (ARNdh)", "agente de ARNdih" o "ARNdh". El

término "ARNdh", se refiere a un complejo de moléculas de ácido ribonucleico, que tiene una estructura dúplex que comprende dos hebras de ácido nucleico antiparalelas y sustancialmente complementarias, que se menciona que tienen orientaciones "efectora" y "antisentido" con respecto a un ARN diana, es decir, un gen de Serpinc1. En algunas realizaciones de la invención, un ARN de doble hebra (ARNdh) desencadena la degradación de un ARN diana, p. ej., un ARNm, a través de un mecanismo de silenciamiento génico postranscripcional denominado en la presente memoria interferencia de ARN o iARN.

En general, la mayoría de los nucleótidos de cada hebra de una molécula de ARNdh son ribonucleótidos, pero como se describe en detalle en la presente memoria, cada una o ambas hebras también pueden incluir uno o más no ribonucleótidos, p. ej., un desoxirribonucleótido y/o un nucleótido modificado. Además, como se emplea en esta memoria descriptiva, un "agente de iARN" puede incluir ribonucleótidos con modificaciones químicas; un agente de iARN puede incluir modificaciones sustanciales en múltiples nucleótidos.

Como se emplea en la presente memoria, el término "nucleótido modificado" se refiere a un nucleótido que tiene, independientemente, un radical azúcar modificado, un enlace internucleotídico modificado y/o una nucleobase modificada. Por tanto, el término nucleótido modificado abarca sustituciones, adiciones o eliminación de, p. ej., un grupo funcional o átomo, en enlaces internucleosídicos, radicales azúcar o nucleobases. Las modificaciones adecuadas para su uso en los agentes de la invención incluyen todos los tipos de modificaciones divulgadas en la presente memoria o conocidas en la técnica. Cualquiera de tales modificaciones, como se emplea en una molécula de tipo ARNip, está englobada por "agente de iARN" para los propósitos de esta memoria descriptiva y reivindicaciones.

La región dúplex puede tener cualquier longitud que permita la degradación específica de un ARN diana deseado a través de una ruta RISC, y puede variar de aproximadamente 9 a 36 pares de bases de longitud, p. ej., aproximadamente 15-30 pares de bases de longitud, por ejemplo, aproximadamente 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 o 36 pares de bases de longitud, tal como aproximadamente 15-30, 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 o 21-22 pares de bases de longitud. Los intervalos y longitudes intermedios de los intervalos y longitudes mencionados anteriormente también se contemplan como parte de la invención.

Las dos hebras que forman la estructura dúplex pueden ser porciones diferentes de una molécula de ARN más grande o pueden ser moléculas de ARN separadas. Cuando las dos

cadena son parte de una molécula más grande y, por lo tanto, están conectadas por una cadena ininterrumpida de nucleótidos entre el extremo 3' de una hebra y el extremo 5' de la otra hebra respectiva que forma la estructura dúplex, la cadena de ARN de conexión se conoce como un "bucle en horquilla". Un bucle en horquilla puede comprender al menos un nucleótido

desemparejado. En algunas realizaciones, 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 al menos 23 o más nucleótidos desemparejados.

Cuando las dos hebras sustancialmente complementarias de un ARNdh están compuestas por moléculas de ARN separadas, no es necesario que esas moléculas estén conectadas covalentemente, pero pueden estarlo. Cuando las dos hebras están conectadas covalentemente por medios distintos a una cadena ininterrumpida de nucleótidos entre el extremo 3' de una hebra y el extremo 5' de la otra hebra respectiva que forma la estructura dúplex, la estructura de conexión se denomina "conector". Las hebras de ARN pueden tener el mismo o diferente número de nucleótidos. El número máximo de pares de bases es el número de nucleótidos en la hebra más corta del ARNdh menos cualquier saliente que esté presente en el dúplex. Además de la estructura dúplex, un iARN puede comprender salientes de uno o más nucleótidos.

En una realización, un agente de iARN de la invención es un ARNdh de 24-30 nucleótidos que interactúa con una secuencia de ARN diana, p. ej., una secuencia de ARNm diana de *Serpinc1*, para dirigir la escisión del ARN diana. Sin desear vincularse a ninguna teoría, el ARN de doble hebra largo introducido en las células se descompone en ARNip mediante una endonucleasa de Tipo III conocida como Dicer (Sharp et al. (2001) *Genes Dev.* 15:485). Dicer, una enzima similar a la ribonucleasa III, procesa el ARNdh a ARN de interferencia cortos de 19-23 pares de bases con salientes 3' de dos bases característicos (Bernstein, et al., (2001) *Nature* 409:363). Los ARNip se incorporan a continuación a un complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) donde una o más helicasas desenrollan el dúplex de ARNip, permitiendo que la hebra complementaria antisentido guíe el reconocimiento de la diana (Nykanen, et al., (2001) *Cell* 107:309). Tras la unión al ARNm diana apropiado, una o más heteronucleasas dentro de RISC escinden la diana para inducir el silenciamiento (Elbashir, et al., (2001) *Genes Dev.* 15:188).

Como se emplea en la presente memoria, el término "saliente de nucleótidos" se refiere a al menos un nucleótido desemparejado que sobresale de la estructura dúplex de un ARNi, p. ej., un ARNdh. Por ejemplo, cuando un extremo 3' de una hebra de un ARNdh se extiende más allá del extremo 5' de la otra hebra, o viceversa, hay un saliente de nucleótidos. Un ARNdh puede comprender un saliente de al menos un nucleótido; alternatively, el saliente puede comprender al menos dos nucleótidos, al menos tres nucleótidos, al menos cuatro nucleótidos, al

menos cinco nucleótidos o más. Un saliente de nucleótidos puede comprender o consistir en un análogo de nucleótido/nucleósido, que incluye un desoxinucleótido/nucleósido. El saliente o los salientes pueden estar en la hebra efectora, la hebra antisentido o cualquier combinación de las mismas. Además, el nucleótido o los nucleótidos de un saliente pueden estar presentes en el extremo 5', en el extremo 3' o en ambos extremos de una hebra antisentido o efectora de un ARNdh.

En una realización, la hebra antisentido de un ARNdh tiene un saliente de 1-10 nucleótidos, p. ej., de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos, en el extremo 3' y/o el extremo 5'. En una realización, la hebra efectora de un ARNdh tiene un saliente de 1-10 nucleótidos, p. ej., de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos, en el extremo 3' y/o el extremo 5'. En otra realización, uno o más de los nucleótidos en el saliente se reemplazan por un tiofosfato de nucleósido.

En ciertas realizaciones, el saliente en la hebra efectora o en la hebra antisentido, o ambas, puede incluir longitudes extendidas mayores de 10 nucleótidos, p. ej., 10-30 nucleótidos, 10-25 nucleótidos, 10-20 nucleótidos o 10-15 nucleótidos de longitud. En ciertas realizaciones, un saliente extendido se encuentra en la hebra efectora del dúplex. En ciertas realizaciones, está presente un saliente extendido en el extremo 3' de la hebra efectora del dúplex. En ciertas realizaciones, está presente un saliente extendido en el extremo 5' de la hebra efectora del dúplex. En ciertas realizaciones, un saliente extendido está en la hebra antisentido del dúplex. En ciertas realizaciones, está presente un saliente extendido en el extremo 3' de la hebra antisentido del dúplex. En ciertas realizaciones, está presente un saliente extendido en el extremo 5' de la hebra antisentido del dúplex. En ciertas realizaciones, uno o más de los nucleótidos en el saliente extendido es reemplazado por un tiofosfato de nucleósido.

"Romo" o "extremo romo" significa que no hay nucleótidos desemparejados en ese extremo del agente de iARN de doble hebra, es decir, no sobresalen nucleótidos. Un agente de iARN de "extremos romos" es un ARNdh que es de doble hebra en toda su longitud, es decir, no sobresalen nucleótidos en ninguno de los extremos de la molécula. Los agentes de iARN de la invención incluyen agentes de iARN con salientes de nucleótidos en un extremo (es decir, agentes con un saliente y un extremo romo) o con salientes de nucleótidos en ambos extremos.

El término "hebra antisentido" o "hebra guía" se refiere a la hebra de un ARNi, p. ej., un ARNdh, que incluye una región que es sustancialmente complementaria a una secuencia diana, p. ej., un ARNm de *Serpinc1*. Como se emplea en la presente memoria, el término "región de complementariedad" se refiere a la región en la hebra antisentido que es sustancialmente complementaria a una secuencia, por ejemplo, una secuencia diana, p. ej., una secuencia de nucleótidos de *Serpinc1*, como se define en la presente memoria. Cuando la región de complementariedad no es completamente complementaria a la secuencia diana, los

emparejamientos erróneos pueden estar en las regiones internas o terminales de la molécula. Generalmente, los emparejamientos erróneos más tolerados se encuentran en las regiones terminales, p. ej., dentro de los 5, 4, 3 o 2 nucleótidos del extremo 5' y/o 3' del ARNi.

El término "hebra efectora" o "hebra pasajera" como se emplea en la presente memoria, se refiere a la hebra de un ARNi que incluye una región que es sustancialmente complementaria a una región de la hebra antisentido como se define ese término en la presente memoria.

Como se emplea en la presente memoria, el término "región de escisión" se refiere a una región que está ubicada inmediatamente adyacente al sitio de escisión. El sitio de escisión es el sitio de la diana en el que se produce la escisión. En algunas realizaciones, la región de escisión comprende tres bases en cada extremo e inmediatamente adyacentes al sitio de escisión. En algunas realizaciones, la región de escisión comprende dos bases en cada extremo e inmediatamente adyacentes al sitio de escisión. En algunas realizaciones, el sitio de escisión se produce específicamente en el sitio unido por los nucleótidos 10 y 11 de la hebra antisentido, y la región de escisión comprende los nucleótidos 11, 12 y 13.

Como se emplea en la presente memoria, y a menos que se indique lo contrario, el término "complementaria", cuando se utiliza 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 la primera secuencia de nucleótidos para hibridar y formar un estructura dúplex en determinadas condiciones con un oligonucleótido o polinucleótido que comprende la segunda secuencia de nucleótidos, como entenderá el experto en la técnica. Tales condiciones pueden ser, por ejemplo, condiciones rigurosas, donde las condiciones rigurosas pueden incluir: NaCl 400 mM, PIPES 40 mM de pH 6,4, EDTA 1 mM, 50°C o 70°C durante 12-16 horas seguido de lavado (véase, p. ej., "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 experto en la técnica podrá determinar el conjunto de condiciones más apropiadas para una prueba de complementariedad de dos secuencias de acuerdo con la aplicación final de los nucleótidos hibridados.

Las secuencias complementarias dentro de un ARNi, p. ej., dentro de un ARNdh como se describe en la presente memoria, incluyen el emparejamiento de bases del oligonucleótido o polinucleótido que comprenden una primera secuencia de nucleótidos con un oligonucleótido o polinucleótido que comprenden una segunda secuencia de nucleótidos en toda la longitud de una o ambas secuencias de nucleótidos. Estas secuencias se pueden denominar "completamente complementarias" entre sí en la presente memoria. Sin embargo, cuando una primera secuencia se denomina "sustancialmente complementaria" con respecto a una segunda secuencia en la

presente memoria, las dos secuencias pueden ser completamente complementarias o pueden formar una o más, pero generalmente no más de 5, 4, 3 o 2 pares de bases emparejados erróneamente tras la hibridación para un dúplex de hasta 30 pares de bases, mientras se conserva la capacidad de hibridar en las condiciones más relevantes para su aplicación final, p. ej.,

5 inhibición de la expresión génica a través de una vía RISC. Sin embargo, cuando se diseñan dos oligonucleótidos para formar, tras la hibridación, uno o más salientes de hebra sencilla, tales salientes no se considerarán emparejamientos erróneos con respecto a la determinación de complementariedad. Por ejemplo, un ARNdh que comprende un oligonucleótido de 21 nucleótidos de longitud y otro oligonucleótido de 23 nucleótidos de longitud, en donde el
10 oligonucleótido más largo comprende una secuencia de 21 nucleótidos que es completamente complementaria al oligonucleótido más corto, aún puede denominarse "completamente complementario" para los propósitos descritos en la presente memoria.

Las secuencias "complementarias", como se emplean en la presente memoria, también pueden incluir, o estar formadas completamente a partir de pares de bases que no son de Watson-
15 Crick y/o pares de bases formados a partir de nucleótidos modificados y no naturales, en la medida en que se cumplan los requisitos anteriores con respecto a que se satisfaga su capacidad de hibridar. Tales pares de bases que no son de Watson-Crick incluyen, pero no se limitan a, emparejamiento de bases Wobble de G:U o Hoogstein.

Los términos "complementaria", "completamente complementaria" y "sustancialmente
20 complementaria" en la presente memoria se pueden utilizar con respecto a la coincidencia de bases entre la hebra efectora y la hebra antisentido de un ARNdh, o entre la hebra antisentido de un agente de ARNi y una secuencia diana, como se entenderá por el contexto de su uso.

Como se emplea en la presente memoria, un polinucleótido que es "sustancialmente complementario a al menos una parte de" un ARN mensajero (ARNm) se refiere a un
25 polinucleótido que es sustancialmente complementario a una porción contigua del ARNm de interés (p. ej., un ARNm que codifica Serpinc1). Por ejemplo, un polinucleótido es complementario a al menos una parte de un ARNm de Serpinc1 si la secuencia es sustancialmente complementaria a una porción no interrumpida de un ARNm que codifica Serpinc1.

30 Por consiguiente, en algunas realizaciones, los polinucleótidos de la hebra antisentido divulgados en la presente memoria son completamente complementarios a la secuencia de Serpinc1 diana. En otras realizaciones, los polinucleótidos de la hebra antisentido divulgados en la presente memoria son sustancialmente complementarios a la secuencia de Serpinc1 diana y comprenden una secuencia de nucleótidos contigua que es al menos aproximadamente 80%

complementaria en toda su longitud a la región equivalente de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, o un fragmento de SEQ ID NO: 1, tal como aproximadamente 85%, aproximadamente 86%, aproximadamente 87%, aproximadamente 88%, aproximadamente 89 %, aproximadamente 90%, aproximadamente 91%, aproximadamente 92%, aproximadamente 93%,
5 aproximadamente 94%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98% o aproximadamente 99% complementaria.

En una realización, un agente de iARN de la invención incluye una hebra efectora que es sustancialmente complementaria a un polinucleótido antisentido que, a su vez, es complementario a una secuencia de Serpincl1 diana, y en donde el polinucleótido de hebra
10 efectora comprende una secuencia de nucleótidos contigua que es al menos aproximadamente 80% complementaria en toda su longitud a la región equivalente de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 5, o un fragmento de cualquiera de SEQ ID NO: 5, tal como aproximadamente 85%, aproximadamente 86%, aproximadamente 87%, aproximadamente 88%, aproximadamente 89%, aproximadamente 90%, aproximadamente 91%, aproximadamente 92%, aproximadamente
15 93%, aproximadamente 94%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98% o aproximadamente 99% complementaria.

Los agentes de ARNdh adecuados capaces de inhibir la expresión de un gen diana (es decir, un gen de Serpincl1) *in vivo* incluyen modificaciones químicas. En ciertos aspectos de la invención, sustancialmente todos los nucleótidos de un ARNi de la invención están modificados.
20 En otras realizaciones de la invención, todos los nucleótidos de un ARNi de la invención están modificados. Los ARNi de la invención en los que "sustancialmente todos los nucleótidos están modificados" están modificados en gran medida, pero no totalmente, y pueden incluir no más de 5, 4, 3, 2 o 1 nucleótidos no modificados.

Los agentes de ARNi para su uso en los métodos de la invención generalmente incluyen
25 una hebra de ARN (la hebra antisentido) que tiene una región que tiene aproximadamente 30 nucleótidos o menos de longitud, p. ej., 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-
30 28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23, o 21-22 nucleótidos de longitud, cuya región es sustancialmente complementaria a al menos parte de un transcripto de ARNm de un gen de Serpincl1.

En otras realizaciones, una o ambas hebras de los agentes de iARN de doble hebra de la invención tienen una longitud de hasta 66 nucleótidos, p. ej., 36-66, 26-36, 25-36, 31-60, 22-43,
35 27-53 nucleótidos de longitud, con una región de al menos 19 nucleótidos contiguos que es

sustancialmente complementaria a al menos una parte de un transcrito de ARNm de un gen de Serpinc1. En algunas realizaciones, las hebras efectora y antisentido forman un dúplex de 18-30 nucleótidos contiguos.

En algunas realizaciones, los agentes de ARNi para su uso en los métodos de la invención incluyen una cadena de ARN (la hebra antisentido) que puede tener hasta 66 nucleótidos de longitud, p. ej., 36-66, 26-36, 25-36, 31-60, 22-43, 27-53 nucleótidos de longitud, con una región de al menos 19 nucleótidos contiguos que es sustancialmente complementaria a al menos una parte de un transcrito de ARNm de un gen de Serpinc1. En algunas realizaciones, tales agentes de ARNi que tienen hebras antisentido de mayor longitud pueden incluir una segunda hebra de ARN (la hebra efectora) de 20-60 nucleótidos de longitud en donde las hebras efectora y antisentido forman un dúplex de 18-30 nucleótidos contiguos.

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

La hebra efectora y la hebra antisentido típicamente forman un ARN dúplex de doble hebra ("ARNdh"), también denominado en la presente memoria "agente de iARN". La región dúplex de un agente de iARN puede tener una longitud de 12-30 pares de nucleótidos. Por ejemplo, la región dúplex puede tener entre 14-30 pares de nucleótidos de longitud, 17-30 pares de nucleótidos de longitud, 27-30 pares de nucleótidos de longitud, 17-23 pares de nucleótidos de longitud, 17-21 pares de nucleótidos de longitud, 17-19 pares de nucleótidos de longitud, 19-25 pares de nucleótidos de longitud, 19-23 pares de nucleótidos de longitud, 19-21 pares de nucleótidos de longitud, 21-25 pares de nucleótidos de longitud o 21-23 pares de nucleótidos de longitud. En otro ejemplo, la región dúplex se selecciona entre 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 y 27 nucleótidos de longitud.

En una realización, el agente de iARN puede contener una o más regiones salientes y/o grupos de protección terminal en el extremo 3', el extremo 5' o ambos extremos de una o ambas hebras. El saliente puede tener 1-6 nucleótidos de longitud, p. ej., 2-6 nucleótidos de longitud, 1-5 nucleótidos de longitud, 2-5 nucleótidos de longitud, 1-4 nucleótidos de longitud, 2-4 nucleótidos de longitud, 1-3 nucleótidos de longitud, 2-3 nucleótidos de longitud o 1-2 nucleótidos de longitud. Los salientes pueden ser el resultado de que una hebra sea más larga que la otra, o el resultado de dos hebras de la misma longitud escalonadas. El saliente puede formar

un emparejamiento erróneo con el ARNm diana o puede ser complementario a las secuencias génicas a las que se dirige o puede ser otra secuencia. La primera y la segunda hebras también se pueden unir, p. ej., mediante bases adicionales para formar una horquilla, o mediante otros conectores que no sean bases.

5 En una realización, los nucleótidos en la región saliente del agente de iARN pueden ser cada uno independientemente un nucleótido modificado o no modificado incluyendo, pero sin limitarse a, azúcar modificado en 2', 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 saliente para
10 cualquier extremo de cualquier hebra. El saliente puede formar un emparejamiento erróneo con el ARNm diana o puede ser complementario a las secuencias de genes que están siendo elegidas como diana o puede ser otra secuencia.

Los salientes 5' o 3' en la hebra efectora, la hebra antisentido o ambas hebras del agente de iARN se pueden fosforilar. En algunas realizaciones, la región o regiones salientes contienen
15 dos nucleótidos que tienen un fosforotioato entre los dos nucleótidos, en donde los dos nucleótidos pueden ser iguales o diferentes. En una realización, el saliente está presente en el extremo 3' de la hebra efectora, la hebra antisentido o ambas hebras. En una realización, este saliente 3' está presente en la hebra antisentido. En una realización, este saliente 3' está presente en la hebra efectora.

20 El agente de iARN puede contener solo un saliente, que puede fortalecer la actividad de interferencia del iARN, sin afectar su estabilidad general. Por ejemplo, el saliente de hebra sencilla puede estar situado en el extremo 3'-terminal de la hebra efectora o, alternativamente, en el extremo 3'-terminal de la hebra antisentido. El iARN también puede tener un extremo romo, ubicado en el extremo 5' de la hebra antisentido (o el extremo 3' de la hebra efectora) o
25 viceversa. Generalmente, la hebra antisentido del iARN tiene un saliente de nucleótidos en el extremo 3' y el extremo 5' es romo. Sin desear vincularse a la teoría, el extremo romo asimétrico en el extremo 5' de la hebra antisentido y el saliente del extremo 3' de la hebra antisentido favorecen la carga de la hebra guía en el proceso RISC.

Cualquiera de los ácidos nucleicos caracterizados en la invención se puede sintetizar y/o
30 modificar mediante métodos bien establecidos en la técnica, tales como los descritos en "Current protocols in nucleic acid chemistry", Beaucage, S.L. et al. (Edrs.), John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, NY, EE.UU., que se incorpora a la presente memoria como referencia. Las modificaciones incluyen, por ejemplo, modificaciones finales, p. ej., modificaciones del extremo 5' (fosforilación, conjugación, enlaces invertidos) o modificaciones del extremo 3' (conjugación,
35 nucleótidos de ADN, enlaces invertidos, etc.); modificaciones de bases, p. ej., reemplazo por

bases estabilizadoras, bases desestabilizadoras o bases que se emparejan con un repertorio expandido de compañeros, eliminación de bases (nucleótidos abásicos) o bases conjugadas; modificaciones del azúcar (p. ej., en la posición 2' o en la posición 4') o sustitución del azúcar; y/o modificaciones de la cadena principal, incluida la modificación o sustitución de los enlaces fosfodiéster. Los ejemplos específicos de compuestos de ARNi útiles en las realizaciones descritas en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, ARN que contienen cadenas principales modificadas o que no contienen enlaces internucleosídicos naturales. Los ARN que tienen cadenas principales modificadas incluyen, entre otros, los que no tienen un átomo de fósforo en la cadena principal. Para los propósitos de esta memoria descriptiva, y como a veces se hace referencia en la técnica, los ARN modificados que no tienen un átomo de fósforo en su cadena principal internucleosídica también pueden considerarse oligonucleósidos. En algunas realizaciones, un ARNi modificado tendrá un átomo de fósforo en su cadena principal internucleosídica.

Las cadenas principales de ARN modificado incluyen, por ejemplo, fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, metil- y otros alquil-fosfonatos, incluidos 3'-alquilen fosfonatos y fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos, incluidos 3'-aminofosforamidatos y aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionoalquilfosfonatos, tionoalquilfosfotriésteres y boranofosfatos que tienen enlaces 3'-5' normales, análogos enlazados 2'-5' de estos y aquellos que tienen polaridad invertida en donde los pares adyacentes de unidades de nucleósidos están enlazados 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 Estados Unidos representativas que ilustran la preparación de los enlaces que contienen fósforo anteriores incluyen, pero no se limitan a, las Patentes de Estados Unidos Núm. 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 Estados Unidos RE39464, el contenido completo de cada una de los cuales se incorpora a la presente memoria como referencia.

Las cadenas principales de ARN modificadas que no incluyen un átomo de fósforo en las mismas tienen cadenas principales que están formadas por enlaces internucleosídicos de cicloalquilo o alquilo de cadena corta, heteroátomos mixtos y enlaces internucleosídicos de alquilo o cicloalquilo, o uno o más enlaces internucleosídicos heteroatómicos o heterocíclicos de

cadena corta. Estas incluyen las que tienen enlaces morfolino (formados en parte a partir de la porción de azúcar de un nucleósido); cadenas principales de siloxano; cadenas principales de sulfuro, sulfóxido y sulfona; cadenas principales de formaceto y tioformaceto; cadenas principales de metilenoformaceto y tioformaceto; cadenas principales que contienen alqueno; cadenas principales de sulfamato; cadenas principales de metilenoimino y metilenohidrazino; cadenas principales de sulfonato y sulfonamida; cadenas principales de amida; y otras que tienen partes componentes de N, O, S y CH₂ mezcladas.

Las Patentes de Estados Unidos representativas que ilustran la preparación de los oligonucleósidos anteriores incluyen, pero no se limitan a, las Patentes de Estados Unidos Núm. 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, el contenido completo de cada una de las cuales se incorpora a la presente memoria como referencia.

En otras realizaciones, se contemplan miméticos de ARN adecuados para su uso en ARNi, en los que tanto el azúcar como el enlace internucleosídico, es decir, la cadena principal, de las unidades de nucleótidos se reemplazan por grupos nuevos. Las unidades de base se mantienen para la hibridación con un compuesto diana de ácido nucleico apropiado. Uno de tales compuestos oligoméricos, un mimético de ARN que ha demostrado tener excelentes propiedades de hibridación, se denomina ácido peptidonucleico (PNA). En los compuestos de PNA, la cadena principal de azúcar de un ARN se reemplaza por una cadena principal que contiene amida, en particular una cadena principal de aminoetilglicina. Las nucleobases se conservan y se unen directa o indirectamente a átomos de nitrógeno aza de la porción amida de la cadena principal. Las patentes de Estados Unidos representativas que ilustran la preparación de compuestos de PNA incluyen, pero no se limitan a, las Patentes de Estados Unidos Núm. 5.539.082; 5.714.331; y 5.719.262, el contenido completo de cada uno de las cuales se incorpora a la presente memoria como referencia. Los compuestos de PNA adicionales adecuados para su uso en los ARNi de la invención son descritos, p. ej., por Nielsen et al., *Science*, 1991, 254, 1497-1500.

Algunas realizaciones presentadas en la invención incluyen ARN con cadenas principales de fosforotioato y oligonucleósidos con cadenas principales de heteroátomos, y en particular --CH₂--NH--CH₂--, --CH₂--N(CH₃)--O--CH₂-- [conocida como cadena principal de metileno (metilimino) o MMI], --CH₂--O--N(CH₃)--CH₂--, --CH₂--N(CH₃)--N(CH₃)--CH₂-- y --N(CH₃)--CH₂--CH₂-- [en donde la cadena principal de fosfodiéster nativo se representa como --O--P--O--CH₂--] de la Patente de Estados Unidos Núm. 5.489.677 referenciada anteriormente, y las cadenas principales de amida de la Patente de Estados Unidos Núm. 5.602.240. En algunas

realizaciones, los ARN presentados en la presente memoria tienen estructuras de cadena principal de morfolino de la Patente de Estados Unidos Núm. 5.034.506 mencionada anteriormente.

Los ARN modificados también pueden contener uno o más radicales azúcar sustituidos.

- 5 Los ARNi, p. ej., ARNdh, presentados en la presente memoria pueden incluir uno de los siguientes en la posición 2': OH; F; O-, S- o N-alquilo; O-, S- o N-alquenilo; O-, S- o N-alquinilo; u O-alquil-O-alquilo, en donde el alquilo, alquenilo y alquinilo pueden ser alquilo C₁ a C₁₀ o alquenilo y alquinilo C₂ a C₁₀ sustituidos o no sustituidos. Las modificaciones adecuadas ilustrativas incluyen O[(CH₂)_nO]_mCH₃, O(CH₂)_nOCH₃, O(CH₂)_nNH₂, O(CH₂)_nCH₃,
10 O(CH₂)_nONH₂, y O(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂, en donde n y m son de 1 a aproximadamente 10. En otras realizaciones, los ARNdh incluyen uno de los siguientes en la posición 2': alquilo inferior C₁ a C₁₀, 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
15 grupo de escisión de ARN, un grupo informador, un intercalador, un grupo para mejorar la 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 realizaciones, 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,
20 78: 486-504) es decir, un grupo alcoxi-alcoxi. Otra modificación ilustrativa es 2'-dimetilaminooxietoxi, es decir, un grupo O(CH₂)₂ON(CH₃)₂, también conocido como 2'-DMAOE, como se describe en los ejemplos a continuación, y 2'-dimetilaminoetoxietoxi (también conocido en la técnica como 2'-DMAEOE), es decir, 2'-O--CH₂--O--CH₂--N(CH₂)₂.

- Otras modificaciones incluyen 2'-metoxi (2'-OCH₃), 2'-aminopropoxi (2'-
25 OCH₂CH₂CH₂NH₂) y 2'-fluoro (2'-F). También se pueden realizar modificaciones similares en otras posiciones en el ARN de un ARNi, particularmente en la posición 3' del azúcar en el nucleótido terminal 3' o en ARNdh conectados 2'-5' y la posición 5' del nucleótido terminal 5'. Los ARNi también pueden tener miméticos de azúcar como radicales ciclobutilo en lugar del azúcar pentofuranosilo. Las patentes de Estados Unidos representativas que ilustran la
30 preparación de tales estructuras de azúcar modificadas incluyen, pero no se limitan a, la patente de Estados Unidos Núm. 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 de titularidad compartida con la presente solicitud. El contenido completo de cada una de los
35 anteriores se incorpora a la presente memoria como referencia.

Un ARNi también puede incluir modificaciones o sustituciones de nucleobases (a menudo denominadas en la técnica simplemente como "base"). Como se emplea en la presente memoria, 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

5 nucleobases modificadas incluyen otras nucleobases sintéticas y naturales tales como desoxitimina (dT), 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetilcitosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metilo y otros derivados alquílicos de adenina. y guanina, 2-propilo y otros derivados alquílicos de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracilo y citosina, 5-propiniluracilo y citosina, 6-azouracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudouracilo),

10 4-tiouracilo, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo y otras adeninas y guaninas sustituidas en la posición 8, 5-halo, particularmente 5-bromo, 5-trifluorometilo y otros uracilos y citosinas sustituidos en la posición 5, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-desazaguanina y 7-desazaadenina y 3-desazaguanina y 3-desazaadenina. Otras nucleobases incluyen las descritas en la patente de Estados Unidos Núm. 3.687.808, los descritas

15 en Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology Medicine, Herdewijn, P. ed. Wiley-VCH, 2008; los descritos en The Concise Encyclopedia Of Polymer Science and Engineering, páginas 858-859, Kroschwitz, J. L, ed. John Wiley & Sons, 1990, los descritos por Englisch et al., en Angewandte Chemie, Edición Internacional, 1991, 30, 613, y los descritos por Sanghvi, Y S., Capítulo 15, en ARNdh Research and Applications, páginas 289-302, Crooke, ST y Lebleu,

20 B., Ed., CRC Press, 1993. Algunas de estas nucleobases son particularmente útiles para aumentar la afinidad de unión de los compuestos oligoméricos presentados en la invención. Estas incluyen pirimidinas sustituidas en la posición 5, 6-azapirimidinas y purinas sustituidas N-2, N-6 y 0-6, incluidas 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. Se ha demostrado que las sustituciones de 5-metilcitosina aumentan la estabilidad del dúplex de ácido nucleico en 0,6-

25 1,2°C (Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. and Lebleu, B., Eds., dsRNA Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pág. 276-278) y son sustituciones de bases representativas, incluso más particularmente cuando se combinan con modificaciones en el azúcar con 2'-O-metoxietilo.

Las patentes de Estados Unidos representativas que ilustran la preparación de algunas de

30 las nucleobases modificadas mencionadas anteriormente, así como otras nucleobases modificadas, incluyen, pero no se limitan a, las Patentes de Estados Unidos Núm. 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; and 7.495.088, el contenido completo de cada una de las cuales se incorpora a la presente memoria como referencia.

El ARN de un ARNi también se puede modificar para incluir uno o más radicales azúcar bicíclicos. Un "azúcar bicíclico" es un anillo de furanosilo modificado por la unión mediante
5 puente de dos átomos. Un "nucleósido bicíclico" ("BNA") es un nucleósido que tiene un radical azúcar que comprende un puente que conecta dos átomos de carbono del anillo de azúcar, formando así un sistema anular bicíclico. En ciertas realizaciones, el puente conecta el carbono 4' y el carbono 2' del anillo de azúcar. Por lo tanto, en algunas realizaciones, un agente de la invención puede incluir el ARN de un ARNi que también se puede modificar para incluir uno o
10 más ácidos nucleicos bloqueados (LNA). Un ácido nucleico bloqueado es un nucleótido que tiene un radical ribosa modificado en donde el radical ribosa comprende un puente adicional que conecta los carbonos 2' y 4'. En otras palabras, un LNA es un nucleótido que comprende un radical azúcar bicíclico que comprende un puente 4'-CH₂-O-2'. Esta estructura "bloquea" eficazmente la ribosa en la conformación estructural 3'-endo. Se ha demostrado que la adición de
15 ácidos nucleicos bloqueados a los ARNip aumenta la estabilidad del ARNip en suero y reduce los efectos inespecíficos (Elmen, J. *et al.*, (2005) *Nucleic Acids Research* 33(1):439-447; Mook , OR. *et al.*, (2007) *Mol Canc Ther* 6(3):833-843; Grunweller, A. *et al.*, (2003) *Nucleic Acids Research* 31(12):3185-3193).

Los ejemplos de nucleósidos bicíclicos para su uso en los polinucleótidos de la invención
20 incluyen, sin limitación, nucleósidos que comprenden un puente entre los átomos del anillo de ribosilo 4' y 2'. En ciertas realizaciones, los agentes polinucleotídicos antisentido de la invención incluyen uno o más nucleósidos bicíclicos que comprenden un puente de 4' a 2'. Los ejemplos de tales nucleósidos bicíclicos con puentes de 4' a 2' incluyen, pero no se limitan a 4'-(CH₂)—O-2' (LNA); 4'-(CH₂)—S-2'; 4'-(CH₂)₂—O-2' (ENA); 4'-CH(CH₃)—O-2' (también denominado
25 "etilo constreñido" o "cEt") y 4'-CH(CH₂OCH₃)—O-2' (y análogos del mismo; véase, p. ej., la Patente de Estados Unidos Núm. 7.399.845); 4'-C(CH₃)(CH₃)—O-2' (y análogos del mismo; véase, p. ej., la Patente de Estados Unidos Núm. 8.278.283); 4'-CH₂—N(OCH₃)-2' (y análogos del mismo; véase, p. ej., la Patente de Estados Unidos Núm. 8.278.425); 4'-CH₂—O—N(CH₃)-2' (véase, p. ej., la Publicación de Patente de Estados Unidos Núm. 2004/0171570); 4'-CH₂—
30 N(R)—O-2', en donde R es H, alquilo C₁-C₁₂ o un grupo protector (véase, p. ej., la Patente de Estados Unidos Núm. 7.427.672); 4'-CH₂—C(H)(CH₃)-2' (véase, p. ej., Chattopadhyaya *et al.*, *J. Org. Chem.*, 2009, 74, 118-134); y 4'-CH₂—C(=CH₂)-2' (y análogos del mismo; véase, p. ej., la Patente de Estados Unidos Núm. 8.278.426). El contenido completo de cada una de las anteriores se incorpora a la presente memoria como referencia.

Las Patentes de Estados Unidos y las Publicaciones de Patente de Estados Unidos representativas adicionales que ilustran la preparación de nucleótidos de ácido nucleico bloqueados incluyen, pero no se limitan a, las siguientes: Patentes de Estados Unidos Núm. 6.268.490; 6.525.191; 6.670.461; 6.770.748; 6.794.499; 6.998.484; 7.053.207;

5 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, el contenido completo de cada una de las cuales se incorpora a la presente memoria como referencia.

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

El ARN de un ARNi también se puede modificar para incluir uno o más nucleótidos con etilo constreñido. Como se emplea en la presente memoria, un "nucleótido de etilo constreñido" o "cEt" es un ácido nucleico bloqueado que comprende un radical azúcar bicíclico que comprende un puente 4'-CH(CH₃)-O-2'. En una realización, un nucleótido de etilo constreñido
15 está en la conformación S a la que se hace referencia en la presente memoria como "S-cEt".

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

Las publicaciones representativas que ilustran la preparación de algunos de los CRN mencionados anteriormente incluyen, pero no se limitan a, la Publicación de Patente de Estados
25 Unidos Núm. 2013/0190383; y la publicación PCT WO 2013/036868, el contenido completo de cada una de las cuales se incorpora a la presente memoria como referencia.

Uno o más de los nucleótidos de un ARNi de la invención también pueden incluir un nucleótido sustituido con hidroximetilo. Un "nucleótido sustituido con hidroximetilo" es un 2'-3'-seco-nucleótido acíclico, también conocido como una modificación de "ácido nucleico
30 desbloqueado" ["UNA (en sus siglas en inglés)"].

Las publicaciones de Estados Unidos representativas que ilustran la preparación de UNA incluyen, pero no se limitan a, la patente de Estados Unidos Núm. 8.314.227; y las Publicaciones de Patente de Estados Unidos Núm. 2013/0096289; 2013/0011922; y 2011/0313020, el
35 contenido completo de cada una de las cuales se incorpora a la presente memoria como referencia.

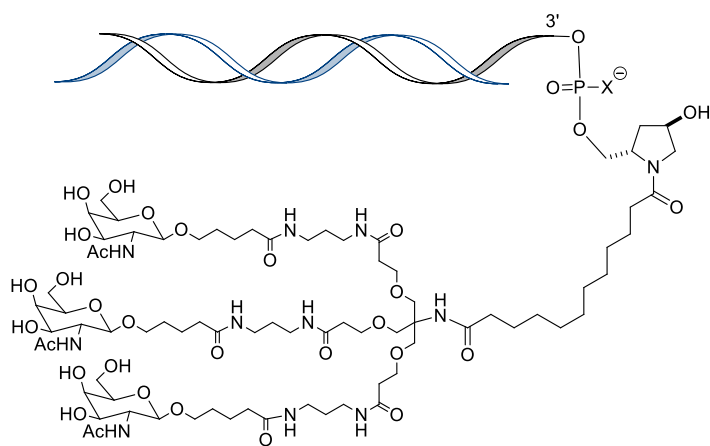
Las modificaciones potencialmente estabilizadoras de los extremos de las moléculas de ARN pueden incluir N-(acetilaminocaproil)-4-hidroxiprolinol (Hyp-C6-NHAc), N-(caproil-4-hidroxiprolinol (Hyp-C6), N-(acetil-4-hidroxiprolinol) (Hyp-NHAc), timidina-2'-0-desoxitimidina (éter), N-(aminocaproil)-4-hidroxiprolinol (Hyp-C6-amino), 2-docosanoil-uridina-3"- fosfato, base invertida dT(idT) y otros. La divulgación de esta modificación se puede encontrar en PCT Publicación Núm. WO 2011/005861.

En ciertos aspectos de la invención, los agentes de ARNi de doble hebra de la invención incluyen agentes con modificaciones químicas como se describe, p. ej., en la Solicitud Provisional de Estados Unidos Núm. 61/561,710, presentada el 18 de noviembre de 2011, o en PCT/US2012/065691, presentada el 16 de noviembre de 2012, el contenido completo de cada una de las cuales se incorpora a la presente memoria como referencia.

Los agentes de ARN de doble hebra (ARNdh) de la invención se pueden conjugar opcionalmente con uno o más ligandos. El ligando se puede anclar a la hebra efectora, la hebra antisentido o ambas hebras, en el extremo 3', en el extremo 5' o en ambos extremos. Por ejemplo, el ligando se puede conjugar con la hebra efectora. En realizaciones preferidas, el ligando se conjuga con el extremo 3' de la hebra efectora.

En una realización, el ligando es un producto conjugado de carbohidrato, tal como un monosacárido. En una realización, el ligando es N-acetilgalactosamina (GalNAc) GalNAc o un derivado de GalNAc. En ciertas realizaciones de la invención, la GalNAc o el derivado de GalNAc se ancla a un agente de ARNi de la invención a través de un conector monovalente. En algunas realizaciones, la GalNAc o el derivado de GalNAc se ancla a un agente de ARNi de la invención a través de un conector bivalente. En otras realizaciones más de la invención, la GalNAc o el derivado de GalNAc se anclan a un agente de ARNi de la invención a través de un conector trivalente. Los ligandos adecuados se describen, p. ej., en la Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. 15/371.300 y la Publicación de Patente de Estados Unidos Núm. 2009/0239814, los contenidos completos de cada una de las cuales se relacionan con ligandos adecuados se incorporan a la presente memoria como referencia.

En algunas realizaciones, el ligando, p. ej., el ligando GalNAc, se ancla al extremo 3' del agente de iARN. En una realización, el agente de iARN se conjuga con el ligando a través de un conector, p. ej., ligando GalNAc, como se muestra en el siguiente esquema.



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

Las patentes de Estados Unidos representativas que ilustran la preparación de productos conjugados de ARN incluyen, pero no se limitan a, las Patentes de Estados Unidos Núm.

5 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;
 10 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 and 5.688.941; 6.294.664; 6.320.017; 6.576.752; 6.783.931; 6.900.297; 7.037.646;
 8.106.022, el contenido completo de cada una de las cuales se incorpora a la presente memoria
 como referencia.

15 No es necesario que todas las posiciones en un compuesto dado se modifiquen
 uniformemente y, de hecho, más de una de las modificaciones mencionadas anteriormente se
 pueden incorporar en un solo compuesto o incluso en un solo nucleósido dentro de 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,
 20 son compuestos de ARNi, preferiblemente ARNd_h, que contienen dos o más regiones
 químicamente distintas, cada una compuesta por al menos una unidad monomérica, es decir, un
 nucleótido en el caso de un compuesto de ARNd_h. Estos ARNi contienen típicamente al menos
 una región en la que el ARN se modifica para conferir al ARNi una mayor resistencia a la
 degradación por nucleasas, una mayor captación celular y/o una mayor afinidad de unión por el
 25 ácido nucleico diana. Una región adicional del ARNi puede servir como sustrato para enzimas
 capaces de escindir híbridos ARN:ADN o ARN:ARN. A modo de ejemplo, la ARNasa H es una
 endonucleasa celular que escinde la hebra de ARN de un dúplex ARN:ADN. La activación de la
 ARNasa H, por lo tanto, da como resultado la escisión del ARN diana, mejorando así en gran

medida la eficacia de la inhibición del ARNi de la expresión génica. En consecuencia, a menudo se pueden obtener resultados comparables con ARNi más cortos cuando se utilizan ARNdh quiméricos, en comparación con desoxi ARNdh con fosforotioato que hibridan con la misma región diana. La escisión de la diana de ARN se puede detectar rutinariamente mediante electroforesis en gel y, si fuera necesario, técnicas de hibridación de ácido nucleico asociadas conocidas en la técnica.

En ciertos casos, el ARN de un ARNi puede ser modificado por un grupo no ligando. Se han conjugado varias moléculas que no son ligandos a ARNi para mejorar la actividad, la distribución celular o la captación celular del ARNi, y los procedimientos para realizar tales conjugaciones están disponibles en la bibliografía científica. Tales radicales que no son ligandos han incluido radicales lipídicos, tales como colesterol (Kubo, T. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 2007, 365(1):54-61; Letsinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86:6553), ácido cólico (Manoharan *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1994, 4:1053), un tioéter, p. ej., hexyl-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, p. ej., restos dodecanodiol 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, p. ej., 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 poliamina o una cadena de polietilenglicol (Manoharan *et al.*, *Nucleosides & Nucleotides*, 1995, 14:969), o ácido adamantanoacético (Manoharan *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651), un radical palmitilo (Mishra *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264:229), o un radical octadecilamina o hexilamino-carbonil-oxicolesterol (Crooke *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, 277:923). Las patentes de Estados Unidos representativas que ilustran la preparación de tales productos conjugados de ARN se han enumerado anteriormente. Los protocolos de conjugación típicos implican la síntesis de un ARN que porta un aminoconector en una o más posiciones de la secuencia. A continuación, el grupo amino se hace reaccionar con la molécula que está siendo conjugada utilizando reactivos de activación o de acoplamiento apropiados. La reacción de conjugación se puede realizar con el ARN todavía unido al soporte sólido o después de la escisión del ARN, en fase de solución. La purificación del producto conjugado de ARN mediante HPLC proporciona típicamente el producto conjugado puro.

V. Usos de las Composiciones Farmacéuticas de la Invención

Las composiciones farmacéuticas de la invención son útiles para el tratamiento terapéutico y profiláctico de sujetos que tienen un trastorno que se beneficiaría de la reducción de la expresión de *Serpinc1*, tal como un trastorno hemorrágico, p. ej., una hemofilia (p. ej., hemofilia A, hemofilia B o hemofilia C).

5 Como se emplean en la presente memoria, los términos "tratar" o "tratamiento" se refieren a un resultado beneficioso o deseado que incluye, pero no se limita a, alivio o mejora de uno o más síntomas, disminución de la extensión de la magnitud del sangrado, estado estabilizado (es decir, sin empeoramiento) de sangrado, mejoría o paliación del sangrado, ya sea detectable o indetectable, o resolución el sangrado. "Tratamiento" también puede significar
10 prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada en ausencia de tratamiento. En los métodos de la invención, el tratamiento incluye el tratamiento a demanda y el control de los episodios de sangrado, el tratamiento perioperatorio del sangrado y la profilaxis de rutina para reducir la frecuencia de los episodios de sangrado.

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

Como se emplea en la presente memoria, "prevención" o "prevenir", cuando se utiliza en referencia a una enfermedad, trastorno o afección de la misma, que se beneficiaría de una reducción en la expresión de un gen *Serpinc1*, se refiere a una reducción en la probabilidad de que un sujeto desarrolle un síntoma asociado con tal enfermedad, trastorno o afección, p. ej., un
25 síntoma tal como una hemorragia. La probabilidad de desarrollar una hemorragia se reduce, p. ej., cuando un individuo que tiene uno o más factores de riesgo de hemorragia no desarrolla una hemorragia o desarrolla una hemorragia con menor gravedad con respecto a una población que tiene los mismos factores de riesgo y no recibe tratamiento como se describe en la presente memoria. La imposibilidad de desarrollar una enfermedad, trastorno o afección, o la reducción
30 en el desarrollo de un síntoma asociado con tal enfermedad, trastorno o afección (p. ej., en al menos aproximadamente 10% en una escala aceptada clínicamente para esa enfermedad o trastorno), o la exhibición de retraso de los síntomas (p. ej., días, semanas, meses o años) se considera prevención eficaz.

Los sujetos que se beneficiarían de una reducción y/o inhibición de la expresión del gen
35 de *Serpinc1* son aquellos que tienen un trastorno hemorrágico, p. ej., un trastorno hemorrágico

hereditario o un trastorno hemorrágico adquirido como se describe en la presente memoria. En una realización, un sujeto que tiene un trastorno hemorrágico hereditario tiene una hemofilia, p. ej., hemofilia A, B o C. En una realización, un sujeto que tiene un trastorno hemorrágico hereditario, p. ej., una hemofilia, es un sujeto inhibidor (un sujeto que se ha vuelto refractario a los factores de coagulación de reemplazo). En una realización, el sujeto inhibidor tiene hemofilia A. En otra realización, el sujeto inhibidor tiene hemofilia B. En otra realización más, el sujeto inhibidor tiene hemofilia C. El tratamiento de un sujeto que se beneficiaría de una reducción y/o inhibición de la expresión génica de Serpincl1 incluye tratamiento terapéutico (p. ej., a demanda, p. ej., el sujeto está sangrando (hemorragia espontánea o como resultado de trauma) y tiene incapacidad para coagular) y profiláctico (p. ej., el sujeto no está sangrando y/o va a ser sometido a cirugía).

Como se emplea en la presente memoria, el término "trastorno hemorrágico" es una enfermedad o trastorno que da como resultado una deficiente coagulación de la sangre y/o sangrado excesivo. Un trastorno hemorrágico puede ser un trastorno hereditario, tal como la hemofilia o la enfermedad de von Willebrand, o un trastorno adquirido asociado con, p. ej., coagulación intravascular diseminada, eclampsia asociada al embarazo, deficiencia de vitamina K, un trastorno autoinmunitario, enfermedad inflamatoria intestinal, colitis ulcerosa, un trastorno dermatológico (p. ej., psoriasis, pénfigo), una enfermedad respiratoria (p. ej., asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica), una reacción alérgica a un fármaco, p. ej., el resultado de fármacos, tales como aspirina, heparina y warfarina, diabetes, infección aguda por hepatitis B, infección aguda por hepatitis C, una neoplasia maligna o un tumor sólido (p. ej., próstata, pulmón, colon, páncreas, estómago, vías biliares, cabeza y cuello, cuello uterino, mama, melanoma, riñón y/o neoplasia maligna hematológica). En una realización, un trastorno hemorrágico hereditario es una hemofilia, p. ej., hemofilia A, B o C. En una realización, un sujeto que tiene un trastorno hemorrágico hereditario, p. ej., una hemofilia, ha desarrollado inhibidores, p. ej., inhibidores de aloanticuerpos, para terapias de coagulación de reemplazo y se denomina en la presente memoria un "sujeto inhibidor". En una realización, el sujeto inhibidor tiene hemofilia A. En otra realización, el sujeto inhibidor tiene hemofilia B. En otra realización más, el sujeto inhibidor tiene hemofilia C.

En una realización, un trastorno hemorrágico es un trastorno hemorrágico poco común ("RBD en sus siglas en inglés"). 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 deficiencia congénita de factores dependientes de vitamina K ("VKCFD en sus siglas en inglés"). Por lo general, se transmiten como afecciones autosómicas recesivas, aunque, en algunos casos, tales como el FXI

y la disfibrinogenemia, pueden ser autosómicas dominantes. Los RBD se notifican en la mayoría de las poblaciones, con una incidencia homocigótica o heterocigótica doble que varía de 1 entre 500.000 para la deficiencia de FVII a 1 entre 2 a 3 millones para las deficiencias de protrombina y FXIII. La frecuencia relativa varía entre las poblaciones, siendo mayor donde los matrimonios consanguíneos o endogámicos son comunes, con incremento de frecuencia de genes mutantes específicos.

Los RBD ilustrativos incluyen afibrinogenemia (fibrinógeno; deficiencia de Factor I); hipofibrinogenemia (fibrinógeno; deficiencia de Factor I); disfibrinogenemia (fibrinógeno; deficiencia de Factor I); hipodisfibrinogenemia (fibrinógeno; deficiencia de Factor I); hipoprotrombinemia (protrombina; deficiencia de Factor II); deficiencia de protrombina (protrombina; deficiencia de Factor II); trombofilia (protrombina; deficiencia del Factor II); deficiencia congénita de antitrombina III (tromboplastina; Factor III; factor tisular); parahemofilia (proacelerina; Factor V; factor lábil); enfermedad de Owren (proacelerina; Factor V; factor lábil); resistencia a la 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 de Factor XIIIa/b (es factor estabilizador de fibrina; Factor XIII); deficiencia hereditaria de Factor XIII (factor estabilizador de fibrina; Factor XIII); y deficiencia de Factor estabilizador de fibrina (factor estabilizador de fibrina; Factor XIII).

Se pretende que "cantidad terapéuticamente eficaz", como se emplea en la presente memoria, incluya la cantidad de un agente de iARN que, cuando se administra a un sujeto que tiene un trastorno hemorrágico y hemorragia, sea suficiente para efectuar el tratamiento de la enfermedad (p. ej., disminuyendo, mejorando o manteniendo la enfermedad existente o uno o más síntomas de la enfermedad). La "cantidad terapéuticamente eficaz" puede variar según el agente de iARN, cómo se administra el agente, la enfermedad y su gravedad y los antecedentes, edad, peso, antecedentes familiares, composición genética, los tipos de tratamientos anteriores o concomitantes, si los hubiera, y otras características individuales del sujeto que se vaya a tratar.

Se pretende que "cantidad profilácticamente eficaz", como se emplea en la presente memoria, incluya la cantidad de un ARNi que, cuando se administre a un sujeto que tiene un trastorno hemorrágico, pero no está sangrando, p. ej., un sujeto que tiene un trastorno hemorrágico y cirugía programada (p. ej. tratamiento preoperatorio), sea suficiente para prevenir o mejorar la enfermedad o uno o más síntomas de la enfermedad. La mejora de la enfermedad incluye ralentizar el curso de la enfermedad o reducir la gravedad de la enfermedad de desarrollo posterior. La "cantidad profilácticamente eficaz" puede variar según el ARNi, la forma en que se

administra el agente, el grado de riesgo de enfermedad y los antecedentes, la edad, el peso, los antecedentes familiares, la composición genética, los tipos de tratamientos anteriores o concomitantes, si los hubiera, y otras características individuales del paciente que se vaya a tratar.

5 Una "cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad profilácticamente eficaz" también incluye una cantidad de un agente de iARN que produce algún efecto local o sistémico deseado a una razón beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento. El ARNi empleado en los métodos de la presente invención puede ser administrado en una cantidad suficiente para producir una razón beneficio/riesgo aplicable a tal tratamiento.

10 La "cantidad terapéuticamente eficaz recomendada de un factor de reemplazo" y la "cantidad terapéuticamente eficaz recomendada de un agente de derivación" son las dosis de factor de reemplazo o agente de derivación, respectivamente, suficientes para generar trombina y resolver una hemorragia y/o suficientes para lograr una nivel máximo de factor plasmático en un sujeto que tiene una hemorragia según lo dispuesto por la Federación Mundial de Hemofilia
15 (véase, p. ej., Srivastava, et al. "Guidelines for the Management of Hemofilia", *Hemophilia* Epub 6 de julio de 2012; DOI: 10.1111/j. 1365-2516.2012.02909.x; prospecto del producto ADVATE (Factor Antihemofílico (Recombinante)); 11/2016; y prospecto del producto BeneFIX (Factor de Coagulación IX (Recombinante)); 11/2011. El contenido completo de cada una de las anteriores se incorpora a la presente memoria como referencia.

20 Por ejemplo, la dosis recomendada de factor de reemplazo o agente de derivación para un sujeto que tiene una hemorragia menor es la dosis suficiente para alcanzar un nivel máximo de Factor VIII en plasma de aproximadamente 10-40 UI/dL; la dosis recomendada de factor de reemplazo o agente de derivación para un sujeto que tiene una hemorragia moderada es la dosis suficiente para alcanzar un nivel máximo de Factor VIII en plasma de aproximadamente 30-60
25 UI/dL; la dosis recomendada de factor de reemplazo o agente de derivación para un sujeto que tiene una hemorragia importante es la dosis suficiente para alcanzar un nivel máximo de Factor VIII en plasma de aproximadamente 60-100 UI/dL; la dosis recomendada de factor de reemplazo o agente de derivación para un sujeto perioperatoriamente es la dosis suficiente para alcanzar un nivel máximo de Factor VIII en plasma de aproximadamente 30-60 UI/dL (véanse, p. ej., las
30 Tablas 1 y 2 del prospecto de producto ADVATE (Factor Antihemofílico (Recombinante)); 11/2016).

La dosis recomendada de factor de reemplazo o agente de derivación para un sujeto que tiene una hemorragia leve es la dosis suficiente para alcanzar un nivel máximo de Factor IX en plasma de aproximadamente 10-30 UI/dL; la dosis recomendada de factor de reemplazo o agente
35 de derivación para un sujeto que tiene una hemorragia moderada es la dosis suficiente para

alcanzar un nivel máximo de Factor IX en plasma de aproximadamente 25-50 UI/dL; la dosis recomendada de factor de reemplazo o agente de derivación para un sujeto que tiene una hemorragia importante es la dosis suficiente para alcanzar un nivel máximo de Factor IX en plasma de aproximadamente 50-100 UI/dL.

5 Los métodos y usos de las composiciones farmacéuticas de la invención generalmente incluyen administrar a un sujeto que tiene una enfermedad asociada a *Serpinc1*, p. ej., un trastorno hemorrágico, p. ej., una hemofilia (por ejemplo, hemofilia A, hemofilia B o hemofilia C) una composición de la invención. En algunos aspectos de la invención, los métodos incluyen adicionalmente administrar al sujeto un agente terapéutico adicional.

10 Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona métodos para prevenir al menos un síntoma en un sujeto que tiene un trastorno que se beneficiaría de la reducción en la expresión de *Serpinc1*, p. ej., un trastorno hemorrágico, p. ej., una hemofilia. Los métodos incluyen administrar al sujeto, p. ej., un ser humano, una composición farmacéutica de la invención que comprende una dosis profilácticamente eficaz, p. ej., una dosis fija de
15 aproximadamente 25 a aproximadamente 100 mg, p. ej., una dosis fija de aproximadamente 80 mg, del agente de ARNi, p. ej., ARNdh, de la invención, previniendo así al menos un síntoma en el sujeto que tiene un trastorno que se beneficiaría de la reducción en la expresión de *Serpinc1*.

En otro aspecto, la presente invención proporciona métodos para tratar a un sujeto que tiene un trastorno que se beneficiaría de la reducción en la expresión de *Serpinc1*, p. ej., un
20 trastorno hemorrágico, p. ej., una hemofilia, que incluyen administrar al sujeto, p. ej., un ser humano, una composición de la invención que comprende una dosis terapéuticamente eficaz, p. ej., una dosis fija de aproximadamente 25 mg a aproximadamente 100 mg, p. ej., una dosis fija de aproximadamente 80 mg, de un agente de ARNi dirigido a un gen de *Serpinc1* o una composición farmacéutica que comprende un ARNi agente dirigido a un gen de *Serpinc1*,
25 tratando así al sujeto que tiene un trastorno que se beneficiaría de la reducción en la expresión de *Serpinc1*.

En ciertas realizaciones, los métodos terapéuticos y profilácticos de la invención incluyen administrar al sujeto una composición farmacéutica que comprende un agente de ARNi de la invención, p. ej., en una cantidad que reduce la actividad de *Serpinc1* en el sujeto en
30 aproximadamente un 75% o más, y un factor de reemplazo o un agente de derivación en una cantidad terapéuticamente eficaz que se reduce en comparación con la cantidad terapéuticamente eficaz recomendada del factor de reemplazo o agente de derivación, p. ej., recomendado por la Federación Mundial de Hemofilia (véase, p. ej., Srivastava, *et al.* "Guidelines for the Management of Hemophilia", *Hemophilia* Epub 6 de julio de 2012; DOI:10.1111/j.1365-
35 2516.2012.02909.x) y/o la Administración de Alimentos y Medicamentos ((véase, p. ej.,

prospecto de producto ADVATE (Factor Antihemofílico (Recombinante)); 11/2016; prospecto de producto BeneFIX (de Factor de Coagulación IX (Recombinante); 11/2011) (p. ej., una cantidad suficiente para generar trombina y resolver una hemorragia (formar un coágulo). El contenido completo de cada una de las anteriores se incorpora a la presente memoria como referencia.

Los factores de sustitución adecuados incluyen Factor VIII, p. ej., Advate, Eloctate, Hemate, Helixate, Immunate, Octanate, Recombinate, y Refacto, o Factor IX, p. ej., Aimafix, Benefix, Immunine, y Refacto. Los agentes de derivación adecuados para su uso en los métodos de la invención incluyen concentrados de complejo de protrombina activado (aPCC), p. ej., FEIBA y Prothromplex, y factor VIIa recombinante (rFVIIa), p. ej., NovoSeven.

El factor de reemplazo puede ser Factor VIII y la cantidad terapéuticamente eficaz del factor de reemplazo administrada al sujeto en los métodos de la invención es una dosis suficiente para alcanzar un nivel máximo de Factor VIII en plasma de aproximadamente 10-100 UI/dL, p. ej., 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 de factor de reemplazo de Factor VIII administrada al sujeto puede ser menos de aproximadamente 200 UI/kg, o menos de aproximadamente 190 UI/kg, o menos de aproximadamente 180 UI/kg, o menos de aproximadamente 170 UI/kg, o menos de aproximadamente 160 UI/kg, o menos de aproximadamente 150 UI/kg, o menos de aproximadamente 140 UI/kg, o menos de aproximadamente 130 UI/kg, o menos de aproximadamente 120 UI/kg, o menos de aproximadamente 110 UI/kg, o menos de aproximadamente 100 UI/kg, o menos de aproximadamente 90 UI/kg, o menos de aproximadamente 80 UI/kg, o menos de aproximadamente 70 UI/kg, o menos de aproximadamente 60 UI/kg, o menos de aproximadamente 50 UI/kg, o menos de aproximadamente 40 UI/kg, o menos de aproximadamente 30 UI/kg, o menos de aproximadamente 20 UI/kg, o menos de aproximadamente 10 UI/kg. En una realización, la cantidad terapéuticamente eficaz de Factor VIII administrada al sujeto es de aproximadamente una vez y media a aproximadamente cinco veces menor que la cantidad eficaz recomendada del factor de reemplazo, tal como una dosis de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 UI/kg o de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 UI/kg, p. ej., 5, 10, 15 o 20 UI/kg. En una realización, el episodio de sangrado es un evento de sangrado moderado. En otra realización, el evento de sangrado es un evento de sangrado importante.

El factor de reemplazo puede ser Factor IX y la cantidad terapéuticamente eficaz del factor de reemplazo administrada al sujeto en los métodos de la invención es una dosis suficiente

para alcanzar un nivel máximo de Factor IX en plasma de aproximadamente 10-100 UI/dL, p. ej., 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 de factor de reemplazo del factor IX puede ser menos de aproximadamente 200 UI/kg, o menos de aproximadamente 190 UI/kg, o menos de aproximadamente 180 UI/kg, o menos de aproximadamente 170 UI/kg, o menos de aproximadamente 160 UI/kg, o menos de aproximadamente 150 UI/kg, o menos de aproximadamente 140 UI/kg, o menos de aproximadamente 130 UI/kg, o menos de aproximadamente 120 UI/kg, o menos de aproximadamente 110 UI/kg, o menos de aproximadamente 100 UI/kg, o menos de aproximadamente 90 UI/kg, o menos de aproximadamente 80 UI/kg, o menos de aproximadamente 70 UI/kg, o menos de aproximadamente 60 UI/kg, o menos de aproximadamente 50 UI/kg, o menos de aproximadamente 40 UI/kg, o menos de aproximadamente 30 UI/kg, o menos de aproximadamente 20 UI/kg, o menos de aproximadamente 10 UI/kg. En una realización, la cantidad terapéuticamente eficaz de Factor IX administrada al sujeto es de aproximadamente dos veces a aproximadamente seis veces menor que la cantidad eficaz recomendada de factor de reemplazo, p. ej., una dosis de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 UI/kg o de aproximadamente 20 a aproximadamente 30 UI/kg, p. ej., aproximadamente 10, 15, 20, 25 o 30 UI/kg. En una realización, el episodio de sangrado es un evento de sangrado moderado. En otra realización, el evento de sangrado es un evento de sangrado importante.

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 una hemorragia.

Por ejemplo, la cantidad terapéuticamente eficaz del agente de derivación aPCC puede ser menos de aproximadamente 100 U/kg, o menos de aproximadamente 90 U/kg, o menos de aproximadamente 80 U/kg, o menos de aproximadamente 70 U/kg, o menos de aproximadamente 60 U/kg, o menos de aproximadamente 50 U/kg, o menos de aproximadamente 40 U/kg, o menos de aproximadamente 30 U/kg, o menos de aproximadamente 20 U/kg, o menos de aproximadamente 10 U /kg. En una realización, la cantidad terapéuticamente eficaz de aPCC administrada al sujeto es de aproximadamente dos veces a aproximadamente tres veces menor que la cantidad eficaz recomendada del factor de reemplazo, p. ej., una dosis de aproximadamente 30 a aproximadamente 50 U/kg, tal como, aproximadamente 30, 35, 40, 45 ó 50 U/kg. En una realización, el evento de sangrado es un evento de sangrado moderado. En otra realización, el evento de sangrado es un evento de sangrado importante.

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 una hemorragia.

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

15 En alguna realización, una composición farmacéutica que comprende el agente de ARNdh se administra a un sujeto a una dosis fija. Una "dosis fija" (p. ej., una dosis en mg) significa que se utiliza una dosis de un agente de ARNi para todos los sujetos independientemente de cualquier factor específico relacionado con el sujeto, tal como el peso. En una realización concreta, una dosis fija de un agente de ARNi de la invención se basa en un peso
20 o edad predeterminados.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica que comprende el agente de ARNi se administra a una dosis fija de entre aproximadamente 25 mg y aproximadamente 100 mg, p. ej., 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
25 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
30 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
35 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
5 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 entre aproximadamente 40 mg y aproximadamente 75 mg, entre
aproximadamente 40 mg y aproximadamente 65 mg, entre aproximadamente 40 mg y
10 aproximadamente 55 mg, o entre aproximadamente 45 mg y aproximadamente 95 mg.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica que comprende 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,
15 aproximadamente 70 mg, aproximadamente 75 mg, aproximadamente 80 mg, aproximadamente
85 mg, aproximadamente 90 mg, aproximadamente 95 mg o aproximadamente 100 mg.

En una realización, el agente de iARN se administra al sujeto a una dosis fija de
aproximadamente 100 mg.

En una realización, el agente de iARN se administra al sujeto en una dosis que reduce la
20 actividad de Serpinc1 en aproximadamente 75% o más.

Una composición farmacéutica que comprende el agente de ARNi se puede administrar a
un sujeto como una o más dosis.

Una composición farmacéutica que comprende el ARNi se puede administrar al sujeto
aproximadamente una vez al mes, aproximadamente una vez cada cinco semanas,
25 aproximadamente una vez cada seis semanas, aproximadamente una vez cada 2 meses o una vez
al trimestre.

En algunas realizaciones, una dosis única de las composiciones farmacéuticas puede ser
de larga duración, de modo que las dosis posteriores se administran a intervalos de no más de 1,
2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 semanas. En algunas realizaciones de la invención, una sola dosis de las
30 composiciones farmacéuticas de la invención se administra una vez al mes. En una realización, la
dosis fija del agente de iARN es adecuada para la administración al sujeto una vez al mes, tal
como una dosis fija de 80 mg una vez al mes.

Los métodos y usos de la invención incluyen administrar una composición descrita en la
presente memoria de manera que la expresión del gen de Serpinc1 diana se reduzca, por ejemplo
35 en 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 realización, la expresión del gen de Serpinc1 diana se reduce durante un período prolongado, p. ej., al menos aproximadamente siete días o más, p. ej., aproximadamente una semana, dos semanas, tres semanas, aproximadamente cuatro semanas, aproximadamente 5 semanas, aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 2 meses, aproximadamente un trimestre, o más.

La reducción de la expresión génica se puede evaluar mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, se puede determinar una reducción en la expresión de Serpinc1 determinando el nivel de expresión de ARNm de Serpinc1 utilizando métodos rutinarios para un experto en la técnica, p. ej., transferencia Northern, qRT-PCR, determinando el nivel de proteína de Serpinc1 utilizando métodos rutinarios para un experto en la técnica, tal como transferencia Western, técnicas inmunológicas y/o determinando una actividad biológica de Serpinc1, tal como afectando a una o más moléculas asociadas con el mecanismo de coagulación de la sangre celular (o en un entorno *in vivo*, la propia coagulación de la sangre). En una realización, el tiempo de generación de trombina, el tiempo de formación de coágulos y/o el tiempo de coagulación se determinan para evaluar la expresión de Serpinc1 utilizando, p. ej., análisis de Tromboelastometría ROTEM® de sangre completa.

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

La eficacia del tratamiento o la prevención de la enfermedad se puede evaluar, p. ej., midiendo la progresión de la enfermedad, la remisión de la enfermedad, la gravedad de los síntomas, la frecuencia de las hemorragias, la reducción del dolor, la calidad de vida, la dosis de un fármaco necesaria para mantener el efecto del tratamiento, el nivel de un marcador de enfermedad o cualquier otro parámetro medible apropiado para una enfermedad determinada que se esté tratando o a la se dirija a la prevención. Está dentro de la capacidad de un experto en la técnica controlar la eficacia del tratamiento o la prevención midiendo cualquiera de tales parámetros, o cualquier combinación de parámetros. Por ejemplo, la eficacia del tratamiento de un trastorno hemorrágico se puede evaluar, p. ej., mediante el seguimiento periódico de los niveles de trombina:antitrombina. Las comparaciones de las lecturas posteriores con las lecturas

iniciales proporcionan al facultativo una indicación de si el tratamiento es eficaz. Está dentro de la capacidad de un experto en la técnica controlar la eficacia del tratamiento o la prevención midiendo cualquiera de tales parámetros, o cualquier combinación de parámetros. Con relación a la administración de un ARNi dirigido a Serpinc1 o composición farmacéutica del mismo,

5 "eficaz contra" un trastorno hemorrágico indica que la administración de una manera clínicamente apropiada da como resultado un efecto beneficioso para al menos una fracción estadísticamente significativa de pacientes, tal como una mejora de los síntomas, una cura, una reducción de la enfermedad, una extensión de vida, mejora en la calidad de vida u otro efecto generalmente reconocido como positivo por médicos familiarizados con el tratamiento de
10 trastornos hemorrágicos y las causas relacionadas.

Un tratamiento o efecto preventivo son evidentes cuando hay una mejora estadísticamente significativa en uno o más parámetros del estado de la enfermedad, o cuando no empeoran o no desarrollan síntomas donde de otro modo se esperarían. Como ejemplo, un cambio favorable de al menos 10% en un parámetro medible de la enfermedad, y
15 preferiblemente al menos 20%, 30%, 40%, 50% o más puede ser indicativo de un tratamiento eficaz. La eficacia para un fármaco de ARNi dado o una formulación de ese fármaco también se puede juzgar utilizando un modelo animal experimental para la enfermedad dada como se conoce en la técnica. Cuando se utiliza un modelo animal experimental, la eficacia del tratamiento se evidencia cuando se observa una reducción estadísticamente significativa en un
20 marcador o síntoma.

Alternativamente, la eficacia se puede medir mediante una reducción en la gravedad de la enfermedad según lo determine un experto en la técnica del diagnóstico basándose en una escala de clasificación de gravedad de la enfermedad clínicamente aceptada. Cualquier cambio positivo que dé como resultado, p. ej., una disminución de la gravedad de la enfermedad medida
25 utilizando la escala apropiada, representa un tratamiento adecuado utilizando un ARNi o formulación de ARNi como se describe en la presente memoria.

La invención proporciona adicionalmente métodos y usos para el uso de un ARNi o un composición farmacéutica del mismo, p. ej., para tratar a un sujeto que se beneficiaría de la reducción y/o inhibición de la expresión de Serpinc1, p. ej., un sujeto que tiene un trastorno
30 hemorrágico, combinados con otros productos farmacéuticos y/u otros métodos terapéuticos, p. ej., con productos farmacéuticos conocidos y/o métodos terapéuticos conocidos, tales como por ejemplo los que se emplean actualmente para el tratamiento de estos trastornos.

Por ejemplo, en ciertas realizaciones, un ARNi dirigido a Serpinc1 se administra combinado, p. ej., con un agente útil en el tratamiento de un trastorno hemorrágico como se
35 describe en otra parte de la presente memoria. Por ejemplo, terapias adicionales y métodos

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

El ARNi y un agente terapéutico y/o tratamiento adicional se pueden administrar al mismo tiempo y/o en la misma combinación, p. ej., por vía parenteral, o el agente terapéutico adicional se puede administrar como parte de una composición separada o en momentos separados y/o por otro método conocido en la técnica o descrito en la presente memoria.

VI. Recipientes de la invención

La presente invención también proporciona recipientes, tales como viales, jeringas, bolígrafos autoinyectores o dispositivos de administración sin aguja, que comprenden una composición farmacéutica de la invención.

En una realización, las composiciones de la invención se pueden utilizar para autoadministración utilizando, p. ej., una jeringa precargada o un dispositivo de inyección automático.

En una realización, un recipiente que comprende una composición farmacéutica de la invención es un vial. El vial puede incluir de aproximadamente 0,5 mL a aproximadamente 2,0 mL de la composición farmacéutica. En una realización, el vial comprende aproximadamente 0,8 mL de la composición farmacéutica. En una realización, el vial es un vial 2R (es decir, un vial de inyección de 2 mL) que comprende una dosis única de la composición farmacéutica. En una realización, el vial 2R comprende aproximadamente 0,80 mL (p. ej., de aproximadamente 0,96 a aproximadamente 1,05 mL) de una composición farmacéutica de la invención que comprende una dosis única de 80 mg de la composición.

En una realización, un recipiente de la invención comprende una jeringa, tal como una jeringa precargada. En una realización, la jeringa precargada incluye una característica de seguridad de prevención de lesiones por punción con aguja (PFS-S). Las jeringas adecuadas pueden ser jeringas de 1 mL o jeringas de 3 mL e incluir una aguja 29 G o una aguja 30 G. En

una realización, la jeringa es una jeringa de vidrio de un solo uso de 3 mL con una aguja 29 G o 30 G. En una realización, la jeringa precargada comprende aproximadamente 0,80 mL (p. ej., aproximadamente 0,84 mL o de 0,8 a 0,84 mL) de una composición farmacéutica de la invención que comprende una dosis única de 80 mg de la composición.

Una jeringa precargada ilustrativa de la invención puede incluir una jeringa, tal como una BD Neopak con una aguja de 29G X 1/2"; protector de aguja rígido (RNS); un émbolo, tal como un émbolo BD 4023 con revestimiento de FluroTec; un sistema de seguridad, tal como BD UltraSafelm Plus; un vástago del émbolo, tal como BD UltraSafe' Passive Plunger Rod; y una brida de dedo, tal como BD UltraSaferm Passive Add-on Finger.

VII. Kits de la invención

La presente invención también proporciona kits que comprenden una composición farmacéutica. Tales kits incluyen uno o más viales o una o más jeringas precargadas que comprenden una composición farmacéutica de la invención e instrucciones de uso, p. ej., instrucciones para administrar una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de uno o varios agentes de iARN. Los kits pueden comprender adicionalmente de manera opcional medios para administrar el agente de iARN (p. ej., un dispositivo de inyección), o medios para medir la inhibición de Serpinc1 (p. ej., medios para medir la inhibición de ARNm de Serpinc1, proteína de Serpinc1 y/o actividad de Serpinc1). Tales medios para medir la inhibición de Serpinc1 pueden comprender un medio para obtener una muestra de un sujeto, tal como, p. ej., una muestra de plasma. Los kits de la invención pueden comprender adicionalmente de manera opcional medios para determinar la cantidad terapéuticamente eficaz o profilácticamente eficaz.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque se pueden utilizar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria en la práctica o prueba de los ARNi y los métodos presentados en la invención, a continuación, se describen métodos y materiales adecuados. Todas las publicaciones, solicitudes de patente, patentes y otras referencias mencionadas en la presente memoria se incorporan a la presente memoria como referencia en su totalidad. Además, los materiales, métodos y ejemplos son meramente ilustrativos y no se pretende que sean limitantes.

Esta invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos que no se deben interpretar como limitantes. El contenido de todas las referencias, patentes y solicitudes de

patente publicadas citadas a lo largo de esta solicitud, así como las Figuras, se incorporan aquí como referencia.

EJEMPLOS

5

Tabla 1: Abreviaturas de monómeros de nucleótidos utilizados en la representación de secuencias de ácidos nucleicos. Se entenderá que estos monómeros, cuando están presentes en un oligonucleótido, están mutuamente conectados por enlaces 5'-3'-fosfodiéster.

Abreviatura	Nucleótido o nucleótidos
A	Adenosina-3'-fosfato
Af	2'-fluoroadenosina-3'-fosfato
Afs	2'-fluoroadenosina-3'-fosforotioato
As	adenosina-3'-fosforotioato
C	citidina-3'-fosfato
Cf	2'-fluorocitidina-3'-fosfato
Cfs	2'-fluorocitidina-3'-fosforotioato
Cs	citidina-3'-fosforotioato
G	guanosina-3'-fosfato
Gf	2'-fluoroguanosina-3'-fosfato
Gfs	2'-fluoroguanosina-3'-fosforotioato
Gs	guanosina-3'-fosforotioato
T	5'-metiluridina-3'-fosfato
Tf	2'-fluoro-5-metiluridina-3'-fosfato
Tfs	2'-fluoro-5-metiluridina-3'-fosforotioato
Ts	5-metiluridina-3'-fosforotioato
U	Uridina-3'-fosfato
Uf	2'-fluorouridina-3'-fosfato
Ufs	2'-fluorouridina -3'-fosforotioato
Us	uridina -3'-fosforotioato
N	Cualquier 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

Abreviatura	Nucleótido o nucleótidos
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-alquil)3

Ejemplo 1: Producto farmacológico de Fitusiran

El producto farmacológico de Fitusiran (Fitusiran) es una solución estéril que contiene 100 mg/mL de fitusirán (equivalente a 106 mg/mL de fitusirán sódico) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) 5 mM para la administración subcutánea. El producto farmacológico se suministra comercialmente en forma de una solución de 0,8 mL en un vial de vidrio 2R Tipo I con un tapón de caucho butílico recubierto de teflón y precintos de desgarramiento central. El producto farmacológico no contiene conservantes y está destinado a un solo uso.

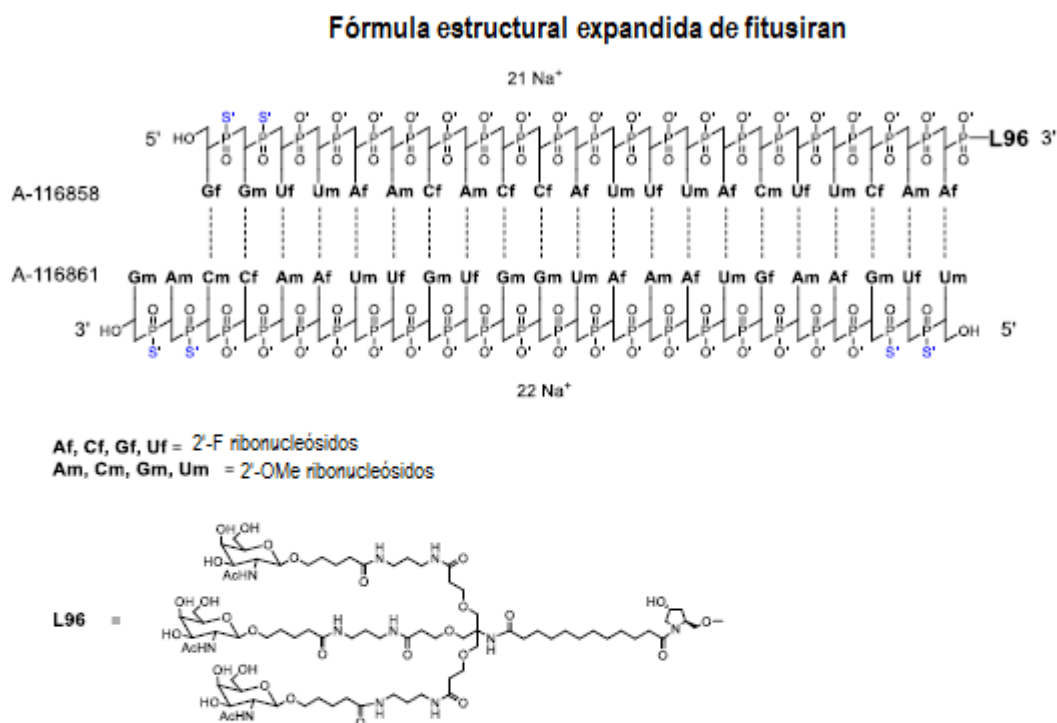
La composición del producto farmacológico de fitusirán se resume en la Tabla 2.

Tabla 2: Composición del Producto Farmacológico de Fitusiran

Componente, grado	Concentración (mg/mL)	Por vial (mg) ^a	Función
fitusiran (GMPc)	100	80	Ingrediente Activo
PBS:			
Monohidrato de Fosfato Monosódico (BP, USP)	0.0885	0.0708	Sal Tampón
Heptahidrato de Fosfato Disódico (USP)	1.169	0.9352	Sal Tampón
Cloruro sódico (Ph. Eur., BP, JP, USP)	4.909	3.9272	Sal Tampón
Agua para Inyectables (Ph. Eur., USP)	c.s.	c.s.	Diluyente

^a El hidróxido de sodio (USP, Ph. Eur.) y el ácido fosfórico (USP, Ph. Eur.) se utilizan sólo si es necesario ajustar el pH para un lote en particular. Abreviaturas: PBS = Solución Tamponada con Fosfato; BP = Farmacopea Británica; Ph. Eur. = Farmacopea europea; USP = Farmacopea de Estados Unidos; cs = cantidad suficiente

La estructura química de Fitusiran, que se muestra a continuación, se representa mediante una fórmula estructural expandida que muestra la cadena principal de fosfato. Las bases implicadas en la formación de pares de bases están conectadas con una línea de puntos. La estructura de L96, el ligando que contiene GalNAc y el conector que conjuga el ligando con el extremo 3' de la hebra efectora también se presenta a continuación. Las fórmulas moleculares y las masas del dúplex y las dos hebras sencillas (AD-116858, hebra efectora; A-116861, hebra antisentido) del dúplex de Fitusiran (AD-57213) también se proporcionan en la Tabla siguiente.



Fórmula molecular y masa molecular

	Fitusiran (Dúplex)	A-116858 (Hebra efectora)	A-116861 (Hebra antisentido)
Fórmula molecular sal de sodio	C ₅₂₀ H ₅₃₆ F ₂₁ N ₁₇₅ Na ₄₃ O ₃₀₉ P ₄₃ S ₆	C ₂₈₅ H ₃₆₉ F ₁₂ N ₈₅ Na ₂₁ O ₁₅₄ P ₂₁ S ₂	C ₂₃₅ H ₂₅₇ F ₉ N ₉₀ Na ₂₂ O ₁₄₅ P ₂₂ S ₄
Fórmula molecular ácido libre	C ₅₂₀ H ₅₇₉ F ₂₁ N ₁₇₅ O ₃₀₉ P ₄₃ S ₆	C ₂₈₅ H ₃₉₀ F ₁₂ N ₈₅ O ₁₅₄ P ₂₁ S ₂	C ₂₃₅ H ₂₈₉ F ₉ N ₉₀ O ₁₄₅ P ₂₂ S ₄
Peso molecular sal de sodio	17,193 Da	9,035 Da	8,159 Da
Peso molecular ácido libre	16,248 Da	8,573 Da	7,675 Da

Ejemplo 2: Desarrollo de la Formulación de Fitusiran

La formulación de fitusirán fue diseñada para la administración subcutánea. Las formulaciones diseñadas para la administración subcutánea no deben ser demasiado ácidas ni demasiado alcalinas para evitar el riesgo de una mayor irritación e incompatibilidad química. Con la debida consideración de la tonicidad, el pH y la viscosidad, la formulación fue diseñada

para ser lo más fisiológica posible. El pH de las soluciones acuosas del producto farmacológico de fitusirán a 100 mg/mL varía de 5,0 a 6,8. La presencia de contraiones de sodio con fosfodiéster aniónico aporta una cierta osmolalidad que depende de la concentración de la solución acuosa. En la formulación diana de 100 mg/mL de sustancia farmacológica, los

5 contraiones dan lugar a una solución de aproximadamente 118 mOsm/kg. Para mantener la isotonicidad y la capacidad amortiguadora del producto farmacológico, la sustancia farmacológica se disolvió en una solución salina tamponada con fosfato 5 mM (NaH₂PO₄ 0,64 mM, Na₂HPO₄ 4,36 mM, NaCl 84 mM).

La formulación del producto farmacológico descrita anteriormente tiene las siguientes

10 propiedades fisicoquímicas: pH de aproximadamente 6,8 a aproximadamente 7,2; Osmolalidad de aproximadamente 300 mOsm/kg; y una Densidad de aproximadamente 1,038 g/mL.

La fabricación del producto farmacológico de Fitusiran consistió en disolver la cantidad requerida del producto farmacológico de fitusirán en polvo (lío filizado) en solución salina tamponada con fosfato 5 mM y ajustar el pH con hidróxido de sodio o ácido fosfórico a

15 aproximadamente 7,0, seguido de filtración y carga estériles.

El producto farmacológico utilizado en el desarrollo temprano, incluidos los estudios no clínicos y clínicos de Fase 1/2, se suministró como una solución de 100 mg/mL (fitusirán sódico) en una cantidad nominal de 0,5 mL por vial. El producto farmacológico que se utiliza en el estudio de Fase 3 y que se destina a la producción comercial se suministra como 100 mg/mL

20 (ácido libre de fitusirán, equivalente a 106 mg/mL de fitusirán sódico) en una cantidad nominal de 0,8 mL por vial. La siguiente tabla resume las diferencias en las formulaciones del producto farmacológico de Fitusiran.

Lote de Producto Farmacológico	Escala de Fabricación [L]	Concentración [mg/mL]	Volumen de Carga [mL]
Desarrollo y lotes clínicos (Fase 1 y 2)	Aproximadamente 1,5	100 (fitusirán sódico) equivalente a 94 (ácido libre de fitusirán)	0,5
Lotes clínicos para Fase 3 (fabricante AMRI)	Aproximadamente 1,5	100 (ácido libre de fitusirán) equivalente a 106 (fitusirán sódico)	0,8
Lotes clínicos para Fase 3 (fabricante Vetter Pharma)	Aproximadamente 5,0	100 (ácido libre de fitusirán) equivalente a 106 (fitusirán sódico)	0,8

Ejemplo 3: Análisis Analíticos del Producto Farmacológico de Fitusiran

Se realizaron varias evaluaciones analíticas del producto farmacológico Fitusiran para demostrar que el fármaco era física y químicamente estable.

Apariencia

5 El producto farmacológico de fitusirán se examinó visualmente para determinar el color, la homogeneidad y la materia particulada contra un fondo de color blanco y negro bajo una iluminación uniforme difusa.

La prueba de apariencia para el producto farmacológico de fitusirán se realizó con la misma prueba visual en diferentes lotes y los resultados cumplieron con la especificación de
10 "solución clara, de incolora a color amarillo pálido, esencialmente libre de materia particulada".

Identidad por Tiempo de Retención del Dúplex

El producto farmacológico de fitusirán se analizó mediante IP RP-HPLC no desnaturalizante junto con un patrón de referencia de fitusirán y el tiempo de retención del
15 dúplex de la muestra se comparó con el del patrón de referencia. Todos los lotes de productos farmacológicos de fitusirán fabricados hasta la fecha cumplieron con la especificación de "tiempo de retención compatible con el del patrón de referencia", lo que confirma su identidad como dúplex de ARNip reasociado.

Ensayo del Producto Farmacológico de Fitusiran mediante UV

Se utilizó el método de absorbancia UV para la determinación del ensayo (mg/mL) de fitusirán en el producto farmacológico de fitusirán. La absorbancia de un fármaco adecuadamente diluido en solución salina al 0,9% se mide con un espectrofotómetro UV a 260 nm.

25
$$C = (A \times F \times M) / (\epsilon \times b),$$

donde A es la absorbancia medida, F es el factor de dilución, b es la longitud de la trayectoria de la celda (1 cm), ϵ es la absortividad molar del patrón de referencia del dúplex, M es el peso molecular y C es la concentración (mg/mL). Para tener en cuenta la pureza del dúplex, el resultado del ensayo de fitusirán para un producto farmacológico determinado se corrige por su factor de pureza (multiplicado por (área de HPLC IP-RP no desnaturalizante -%)/100).

El Ensayo del producto farmacológico de fitusirán (mg/mL) se determinó a partir de espectrofotometría UV y se corrigió la pureza del dúplex del método IP RP-HPLC no desnaturalizante y los resultados son referidos sobre la base de la concentración de la forma H (ácido libre) del dúplex. Todos los resultados estuvieron dentro de los límites de especificación
35 de 90 a 110 mg/mL (medidos como forma de ácido libre), con un valor de ensayo medio de

101,5 mg/mL y una desviación típica de 3,4%. Los resultados mostraron una buena comparabilidad entre los valores de ensayo de todos los lotes de fitusirán probados.

pH del Producto Farmacológico de Fitusiran

5 El pH del producto farmacológico de fitusirán se midió directamente. Se observó que los resultados comparativos de pH para los lotes de productos farmacológicos de fitusirán eran un pH de 7,1 con una desviación típica de 0,0. Todos los resultados cumplieron con la especificación actual de 6,0 a 8,0 para el pH del producto farmacológico de fitusirán. El análisis de los datos de pH para los lotes de productos farmacológicos de fitusirán indicó un alto grado de comparabilidad entre los lotes de fitusirán.

Osmolalidad del Producto Farmacológico de Fitusiran

La osmolalidad del producto farmacológico de fitusirán se basa en el principio de depresión del punto de congelación. La osmolalidad fue referida como valor en mOsm/kg. Dado que la formulación tiene concentraciones de sal fijas del dúplex de tampón de fosfato de sodio y fitusirán, los valores de osmolalidad observados mostraron sólo un intervalo estrecho. Los resultados de osmolalidad para los lotes del producto farmacológico de fitusirán variaron de 297-310 (mOsm/kg), una media de 304 mOsm/kg y una desviación típica de 5,3%. Todos los resultados estuvieron dentro de la especificación de 240-390 mOsm/kg para la osmolalidad del producto farmacológico de fitusirán.

Materia Particulada en el Producto Farmacológico de Fitusiran

El producto farmacológico de Fitusiran se analizó para determinar el número de partículas sub-visibles por recipiente mediante el método de oscurecimiento de la luz y los resultados fueron referidos en el número total de partículas ($\geq 10 \mu\text{m}$ y $\geq 25 \mu\text{m}$) por recipiente. Para partículas $\geq 10 \mu\text{m}$ en el producto farmacológico de fitusirán, el intervalo observado fue de aproximadamente 29-588 partículas ($\geq 10 \mu\text{m}$), una media de aproximadamente 188 partículas y una desviación típica de 268,2%. Todos los resultados estuvieron dentro de la especificación de no más de 6.000 por recipiente de producto farmacológico de fitusirán.

30 Para partículas $\geq 25 \mu\text{m}$, el intervalo observado fue de aproximadamente 0-46 partículas, una media de aproximadamente 13 partículas y una desviación típica de 22,4%. Todos los resultados estuvieron dentro de la especificación de NMT 600 por recipiente de producto farmacológico de fitusirán.

Volumen en el Recipiente para el Producto Farmacológico de Fitusiran

El volumen de los recipientes que comprenden el producto farmacológico de fitusirán se midió con un límite de especificación establecido en no menos de (NLT) 0,8 mL. El volumen en los recipientes observado en los diferentes lotes de producto farmacológico de fitusirán mostró un buen grado de comparabilidad entre los lotes de producto farmacológico de fitusirán con una desviación típica de 0,0.

Endotoxinas Bacterianas y Esterilidad en Lotes de Productos Farmacológicos de Fitusiran

Todos los lotes del producto farmacológico de fitusirán cumplieron con los criterios de prueba de seguridad microbiana para endotoxinas bacterianas (no más de (NMT) 100 unidades de endotoxina (UE)/mL), lo que demuestra un control adecuado para el proceso del producto farmacológico de Fitusiran y su perfil de seguridad microbiana.

Pureza del Dúplex mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución de Fase Inversa por Apareamiento Iónico No Desnaturalizante (IP RP-HPLC)

La IP RP-HPLC no desnaturalizante resuelve el dúplex de cualquier hebra única residual. La pureza por porcentaje de área del dúplex se determina mediante este método. La identidad de la sustancia farmacológica en el producto farmacológico de fitusirán se estableció mediante un tiempo de retención compatible con el del patrón de referencia del dúplex.

Se utilizó el método de IPRP-HPLC no desnaturalizante para la identificación de las hebras sencillas constitutivas, hebras efectoras y antisentido en el producto farmacológico en tándem con espectrometría de masas (ESI-MS). Puesto que el pico del dúplex se resolvió a partir de la hebra única residual, se determinó la pureza del dúplex mediante este método. En la Figura 1 se muestra un cromatograma IP RP representativo del producto farmacológico de fitusirán.

Fase estacionaria: columna Waters XBridge C8 2.1 × 50, tamaño de partícula de 2,5 µm.

Fase móvil A: 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) 95 mM, trietilamina (TEA) 16 mM, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 5 µM en agua.

Fase móvil B: metanol al 100% con EDTA 5 µM.

Velocidad de flujo: 0,25 mL/min.

Temperatura de la columna: 15°C

Gradiente:

Tiempo (min)	% A	% B
Inicial	80	20
1,00	80	20
15,25	35	65
15,75	20	80
16,75	20	80
17,00	80	20

24,00	80	20
-------	----	----

Detección: UV a 260 nm y MS en modo de iones negativos de 700 a 2700 Da

Preparación de la muestra: La muestra se preparó en 1X PBS a una concentración de ~ 0,1 mg/mL para productos intermedios de hebra sencilla y 0,2 mg/mL para la sustancia

5 farmacológica dúplex (fitusirán).

El volumen de inyección es de 20 µL.

Límites de detección: Se utilizó el Soporte Lógico de Cromatografía para integrar e informar sobre todos los picos $\geq$ a 0,05% de área.

10 Cálculo de la pureza: El % de área del pico del dúplex principal se calculó mediante soporte lógico de cromatografía y fue referido como pureza del dúplex. También se informó sobre el % de área de hebra sencilla residual y otras impurezas.

Identidad: La identidad de las hebras sencillas constitutivas, efectoras y antisentido presentes bajo el mismo pico del dúplex, se estableció mediante el peso molecular determinado a partir de la desconvolución de los espectros del pico del dúplex mediante espectrometría de masas acoplada a cromatografía líquida (LC-MS) utilizando soporte lógico de cromatografía.

15 El perfil no desnaturalizante del producto farmacológico de fitusirán mediante IP RP-HPLC no desnaturalizante confirmó la presencia del producto farmacológico en su forma dúplex. La pureza del dúplex indicó el porcentaje de ARNip dúplex reasociado en el producto farmacológico de fitusirán. Para los lotes de productos farmacológicos incluidos en este estudio, los valores de pureza del dúplex estaban en el intervalo de aproximadamente 98,9 a 99,5% de área. El análisis de los datos arrojó una pureza media ($n = 4$) de aproximadamente el 99,2% con una desviación típica de aproximadamente 0,3% y mostró que los valores de pureza del dúplex eran compatibles y similares entre sí para todos los lotes de productos farmacológicos de fitusirán comparados en este informe.

25

Impurezas Totales mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución de Fase Inversa por Emparejamiento Iónico No desnaturalizante (IP RP-HPLC)

Las impurezas no dúplex (no reasociadas) mediante IP RP-HPLC no desnaturalizante fueron referidas como la suma de todos los picos (no dúplex) $\geq 0,050\%$ de área. Se observó que los resultados para las impurezas totales mediante IP RP-HPLC no desnaturalizante estaban dentro de 2% y cumplían con la especificación de NMT 10,0% de área para todos los lotes de producto farmacológico de fitusirán incluidos en este estudio. El valor medio ($n = 4$) para las impurezas totales mediante IP RP-HPLC no desnaturalizante fue de 0,85% con una desviación típica de 0,3%. En general, los resultados mostraron que los lotes de producto farmacológico de

fitusirán examinados en este informe tenían perfiles muy similares en términos de impurezas tanto especificadas (hebras sencillas) como no especificadas.

Pureza mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución de Intercambio Aniónico

5 *Desnaturalizante (AX-HPLC)*

Para determinar la pureza de las hebras sencillas en el producto farmacológico, se realizó un análisis mediante AX-HPLC desnaturalizante.

La presencia de múltiples picos para la hebra antisentido se debió a los diastereómeros de fosforotioato. En la Figura 2 se muestra un cromatograma de AX-HPLC representativo del
10 producto farmacológico de fitusirán.

Fase estacionaria: columna Dionex DNA Pac PA200, 4 x 250 mm

Fase móvil A: Fosfato de Sodio 20 mM, ACN al 10%, pH 11

Fase móvil B: Fosfato de Sodio 20 mM, NaBr 1 M, ACN al 10%, pH 11

Gradiente:

Tiempo (min)	% A	% B
Inicial	65	35
26,00	36,5	63,5
27,00	0	100
29,00	0	100
30,00	65	35
35,00	65	35

15

Límites de detección: Se utilizó el Soporte Lógico de cromatografía para integrar e informar sobre todos los picos $\geq$ a 0,05% de área

Cálculo de la pureza: El % de área de cada uno de los picos principales (efectora y antisentido) se calculó mediante soporte lógico de cromatografía y la suma del % de área de las
20 hebras efectora y antisentido fue referido como pureza. La suma del % de área de impurezas por encima de 0,050% de área fue referida como impurezas totales.

Identidad: La identidad de una sola hebra se confirmó comparando los tiempos de retención de la muestra de prueba con los del patrón de referencia correspondiente.

La AX-HPLC desnaturaliza el dúplex de Fitusiran para formar las hebras sencillas
25 efectora y antisentido constitutivas. La pureza por porcentaje de área de las hebras sencillas se determinó mediante este método.

El método de AX-HPLC desnaturalizante mide la pureza de las hebras sencillas individuales que comprenden el dúplex de fitusirán. La suma de los porcentajes de área de hebras sencillas representa la pureza desnaturalizante del producto farmacológico de fitusirán. El
30 análisis de la suma del % de área de las hebras efectora y antisentido para los lotes de fitusirán en

este estudio arrojó un valor medio (n = 4) de 94,2% de área con una desviación típica de 0,8%. Todos los resultados de los lotes representativos de producto farmacológico de fitusirán cumplieron con la especificación de NLT 85,0% de área e indicaron resultados de pureza comparables en general para el producto farmacológico de fitusirán.

5

Impurezas Totales Mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución de Intercambio Aniónico Desnaturalizante (AX-HPLC)

El análisis de los datos arroja un valor medio (n = 4) de 5,6% para la suma de todas las impurezas NLT de 0,050% de área con una desviación típica de 0,7%. Los resultados muestran que el valor total de impurezas para los lotes de fitusirán incluidos en este informe es compatible y comparable.

Pureza Mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución de Fase Inversa por Apareamiento Iónico Desnaturalizante (IP RP-HPLC)

La IP RP-HPLC desnaturaliza el dúplex de Fitusiran para formar las hebras sencillas efectora y antisentido constitutivas. La pureza por porcentaje de área de las hebras sencillas se determina mediante este método.

El método de IP RP-HPLC desnaturalizante es ortogonal respecto a AX-HPLC y mide la pureza de las hebras sencillas individuales que comprenden el dúplex de fitusirán en el producto farmacológico. La suma de los porcentajes de área de hebras sencillas representa la pureza mediante IP RP-HPLC desnaturalizante del producto farmacológico de fitusirán.

También se realizó un análisis mediante IP RP-HPLC desnaturalizante para determinar la pureza de las hebras sencillas en el producto farmacológico.

Fase estacionaria: columna Waters XBridge C18 (OST o XP) 2,1 × 50, tamaño de partícula de 2,5 µm. Fase móvil A: 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) 550 mM, trimetilamina (TEA) 13 mM y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 5 M en agua:metanol 90:10.

Fase móvil B: metanol al 100%

Velocidad de flujo: 0,40 mL/min.

Temperatura de la columna: 80°C

Gradiente:

Tiempo (min)	% A	% B
Inicial	94	6
2,0	94	6
35,0	82,5	17,5
40,0	56,5	43,5

40,5	30	70
42,5	30	70
43,0	94	6
49,0	94	6

Detección: UV a 260 nm y MS en modo de iones negativos de 700 a 2700 Da

Preparación de la muestra: La muestra se preparó en 1X PBS a una concentración de ~0,1 mg/mL para productos intermedios de hebra sencilla y 0,2 mg/mL para la sustancia

5 farmacológica dúplex (fitusirán).

El volumen de inyección fue de 25 µl.

Límites de detección: Se utilizó el Soporte Lógico de Cromatografía para integrar e informar sobre todos los picos $\geq$ a 0,05% de área.

10 Cálculo de la pureza: El % de área del pico dúplex principal se calculó mediante soporte lógico de cromatografía y fue referido como pureza del dúplex. También se informó sobre el % de área de hebra sencilla residual y otras impurezas.

En la Figura 3 se muestra un perfil cromatográfico representativo de IP RP-HPLC desnaturalizante del producto farmacológico de fitusirán.

15 El análisis de la suma del % de área de las hebras efectora y antisentido para los lotes de fitusirán en este estudio arrojó un valor medio ($n = 4$) de 88,7% de área con una desviación típica de 1,4%. Todos los resultados para los lotes de producto farmacológico de fitusirán cumplieron con la especificación de NLT 80,0% de área y mostraron, dentro de la variabilidad analítica, resultados de pureza comparables para los lotes de productos farmacológicos de fitusirán.

20 *Impurezas totales mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución de Fase Inversa por Apareamiento Iónico Desnaturalizante (IP RP-HPLC)*

El análisis de los datos arroja un valor medio ($n = 4$) de 11,0% para la suma de todas las impurezas NLT 0,050% de área con una desviación típica de 1,5%. Los resultados muestran que el valor total de impurezas para todos los lotes de fitusirán incluidos en este informe es

25 compatible y comparable.

Ejemplo 4: Sistema de Cierre de Recipientes y Compatibilidad del Producto Farmacológico de Fitusiran

30 El sistema de cierre de recipientes para el producto farmacológico de fitusirán se eligió para proteger el producto estéril de la contaminación microbiológica. Los viales se esterilizan y se someten a despirogenación mediante calor seco a $\geq 300^{\circ}\text{C}$ durante ≥ 5 minutos. Los precintos de caucho butílico se esterilizan en autoclave a $121\text{-}125^{\circ}\text{C}$ durante ≥ 60 minutos. Los tapones de

caucho butílico se esterilizan con vapor en autoclave a través de un ciclo validado. Todos los componentes son elementos convencionales para productos parenterales. Los estudios de estabilidad del producto farmacológico de fitusirán se llevan a cabo utilizando el producto farmacológico almacenado en un sistema de cierre de recipiente idéntico.

5 Fitusiran está formulado para inyección subcutánea. En función de las dosis calculadas estimadas que se deban administrar, se utilizarán jeringas de 1 mL o 3 mL. Se probaron dos tipos de jeringas, una con material de construcción de policarbonato y el segundo con material de construcción de polipropileno, para verificar su compatibilidad con fitusirán. El producto farmacológico, 100 mg/mL cargado en los viales, se introdujo en las jeringas. Un juego de
10 jeringas cargadas se incubó a 25°C durante 8 h y otro juego de jeringas cargadas se incubó a 2-8°C durante 48 h junto con los controles. Después de la incubación, el producto farmacológico se probó para determinar el ensayo y la pureza mediante AX-HPLC y se comparó con el producto farmacológico introducido en los viales. No hubo diferencia entre el producto farmacológico de control y el producto farmacológico incubado en los dos tipos de jeringas en términos de lo
15 informado en la etiqueta y la pureza, indicando compatibilidad de fitusirán con los dispositivos de inyección deseados como se muestra más abajo en la Tabla 3.

Tabla 3: Datos de Compatibilidad

Descripción	Material de Construcción	Tiempo de Incubación (hr)	Temperatura (°C)	Ensayo (mg/mL) ¹	AX-HPLC Pureza (% área)
Control en vial	NA	T0	2 - 8	99.2	89.6
Jeringa 1 mL	policarbonato	8	25	100	89.8
Jeringa 3 mL	polipropileno	8	25	99.7	89.6
Jeringa 1 mL	policarbonato	48	2 - 8	98.2	89.8
Jeringa 3 mL	polipropileno	48	2 - 8	98.7	89.7
Control en vial	NA	48	2 - 8	99.4	89.7

20 Abreviaturas: AX-HPLC = cromatografía líquida de alta resolución de intercambio aniónico; NA = no aplicable; Control en vial = producto farmacológico de fitusirán en los viales destinados al estudio clínico.

¹ En el momento de este estudio, los valores de ensayo se expresaron en fitusirán sodio

25 También se evaluó el uso de agujas de calibre más grande (orificio más estrecho) para extraer y dispensar el producto farmacológico sin diluir, con las jeringas de los mismos materiales de construcción que se muestran en la Tabla 3. Se analizaron dos tipos de jeringas y dos velocidades de dispensación. Los resultados se muestran en la Tabla 4 y demuestran que la

integridad del producto farmacológico de fitusirán permanece intacta cuando se utiliza con agujas 29 o 30 G.

Tabla 4: Datos de Compatibilidad Adicionales

Descripción	Ensayo, mg/mL	IP RP-HPLC No desnaturalizante		AX-HPLC
		Pureza dúplex, % Área	Suma de impurezas $\geq 0,050$ % área	Suma de % área para hebras efectoras y antisentido
Control en vial	99.3	98.7	1.3	89.0
Jeringa Luer-Lok™ dispensación lenta	100.4	98.7	1.3	88.9
Jeringa Luer-Lok™ dispensación rápida	99.7	98.7	1.2	89.0
Jeringa de insulina, dispensación lenta	99.2	98.7	1.3	88.8
Jeringa de insulina, dispensación rápida	99.8	98.7	1.3	89.0

Abreviaturas: AX-HPLC = cromatografía líquida de alta resolución de intercambio aniónico; Control en vial = producto farmacológico de fitusirán en los viales destinados al estudio clínico.

Ejemplo 5: Análisis de Estabilidad de Almacenamiento del Producto Farmacológico de Fitusiran

Los datos de estabilidad de almacenamiento del producto farmacológico de fitusirán se recopilaron en las condiciones de almacenamiento recomendadas de 2-8°C y en una o más condiciones aceleradas. Los estudios de estabilidad fueron diseñados de acuerdo con la Conferencia Internacional sobre Armonización de Requisitos Técnicos para el Registro de Productos Farmacéuticos para Uso Humano (ICH) Directriz Q1A (R2) y las muestras se almacenaron en un recipiente con cierre idéntico al utilizado para el almacenamiento de material clínico (es decir, vial de vidrio Tipo I de 2 mL de la USP con tapón de caucho butílico revestido de Teflón). Los datos de estabilidad se recopilaron como se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5: Protocolo de Estabilidad para el Producto Farmacológico de Fitusiran

Atributo	Criterios de Aceptación	Tiempo de almacenamiento (meses)									
		0	1	3	6	9	12	18	24	36	
Apariencia	Solución de incolora a amarillo pálido, clara esencialmente libre de materia particulada	S	SA	SA	SA	S	S	S	S	S	
IPRP-HPLC no desnaturalizante de pureza Dúplex Hebras sencillas Impurezas	NLT 90.0 % área NMT 5.0 % área Informe suma de % área (X.X) de picos de todos los picos ≥0,050 % área	S	SA	SA	SA	S	S	S	S	S	
AX-HPLC desnaturalizante de pureza Hebras sencillas totales Impurezas	NLT 85.0 % área Informe suma de % área (X.X) de picos de todos los picos ≥0,050 % área	S	SA	SA	SA	S	S	S	S	S	
IPRP-HPLC desnaturalizante de pureza Hebras sencillas totales Impurezas	NLT 80.0 % área Informe suma de % área (0,0) de picos de todos los picos ≥0,050 % área	S	SA	SA	SA	S	S	S	S	S	
Ensayo	90 a 110 mg/mL	S	SA	SA	SA	S	S	S	S	S	
Osmolalidad	240-390 mg/mL	S	SA	SA	SA	S	S	S	S	S	
pH	6.0 – 8.0	S	SA	SA	SA	S	S	S	S	S	
Materia Particulada ≥ 10 µm ≥ 25 µm	NMT 6,000 por recipiente NMT 600 por recipiente	S			A		S		S	S	
Endotoxinas bacterianas	NMT 100 UE/mL	S			A		S		S	S	
Esterilidad	Conforme a la farmacopea actual	S			A						
Integridad cierre recipiente	Sin evidencia de entrada de tinte						S		S	S	

S – Ensayo realizado para muestras almacenadas a $2-8^{\circ}\text{C}$, y $25 \pm 2^{\circ}\text{C} / 60 \pm 5\%$ de HR

A – Ensayo realizado para muestras almacenadas a $40 \pm 2^{\circ}\text{C} / 75 \pm 5\%$ de HR

Abreviaturas: AX-HPLC =HPLC de Intercambio Aniónico; IPRP-HPL = HPLC de fase inversa por Apareamiento Iónico

La estabilidad del producto farmacológico de fitusirán se evaluó para determinar las tendencias utilizando los siguientes procedimientos analíticos: apariencia visual, ensayo mediante espectrofotometría UV, pH, osmolalidad, pureza del dúplex mediante IPRP-HPLC no desnaturalizante y pureza de hebra sencilla medida mediante dos métodos ortogonales: pureza mediante AX HPLC desnaturalizante, y pureza mediante IPRP-HPLC desnaturalizante.

Con el fin de dilucidar adicionalmente la estabilidad térmica del producto farmacológico, varios estudios de estabilidad incluyeron una evaluación a largo plazo del fármaco a $25^{\circ}\text{C}/60\%$ de HR, así como un estudio de envejecimiento acelerado de 6 meses realizado a $40^{\circ}\text{C}/75\%$ de RH. Los datos adicionales (es decir, más allá de 6 meses a $25^{\circ}\text{C}/60\%$ de HR, y todos los datos recopilados a $40^{\circ}\text{C}/75\%$ de HR) se recopilaron para evaluar la idoneidad del fármaco para el almacenamiento a largo plazo en condiciones climáticas de la Zona II de ICH.

Los datos de estabilidad de almacenamiento para tres lotes representativos del producto farmacológico de Fitusiran (P02314, P02715 y P07916) se proporcionan en las Tablas 6-14 y se resumen a continuación.

En las condiciones de almacenamiento recomendadas de $2-8^{\circ}\text{C}$, se han recopilado hasta 36 meses de datos de estabilidad para el producto farmacológico de fitusirán. No se han

identificado cambios significativos para ningún parámetro durante el almacenamiento a 2-8°C, lo que indica que estas condiciones son adecuadas para el almacenamiento a largo plazo del fármaco. Además, no se han observado cambios significativos durante el almacenamiento a 25°C/60% RH, o incluso durante el almacenamiento a 40°C/75% de RH. Sobre esta base, y una
5 evaluación de la idoneidad del fármaco para el almacenamiento a largo plazo en las condiciones climáticas de la Zona II de la ICH (es decir, 25°C/60% de HR), se ha asignado una vida útil de 36 meses al producto farmacológico de fitusirán almacenado a 2-8°C, y se confirmó adicionalmente mediante datos adicionales recopilados desde el momento de la última actualización.

Tabla 6 - Estabilidad a largo plazo a 5°C del lote P02314

Producto farmacológico:		Fitusiran - solución para inyectable - 100 mg/mL										Núm. lote: P02314	
Recipiente/cierre:		Vial										Tamaño lote: 1.0 L	
Condiciones almacenamiento:		+5°C±3°C										Fabricante: AMRI	
Orientación en el almacenamiento:		Vertical											
Elemento de prueba		Criterios de aceptación		Tiempo									
		Resultados iniciales	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses	18 meses	24 meses	36 meses				
Apariencia (inspección visual)		Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa				
Pureza de dúplex (IPRP HPLC UV no desnaturalizante))		99.2	98.8	99.1	99.1	99.2	99.1	99.2	99.2				
Hebras sencillas		0.4	0.4	0.3	0.4	0.4	0.6	0.8	0.5				
Impurezas		0.4	0.6	0.4	0.4	0.3	0.4	0.0	0.3				
Pureza AX HPLC UV (desnaturalizante)		42.2	42.2	43.6	43.1	43.9	45.8	43.8	43.1				
Hebra Efectora		48.7	48.5	50.1	50.2	50.9	51.9	50.9	50.5				
Hebra Antisensido		90.9	90.7	93.7	93.3	94.8	97.7	94.7	93.6				
Hebras sencillas totales		6.9	7.5	5.7	5.6	4.8	3.5	5.3	5.1				
Impurezas													
Pureza (IPRP HPLC UV (desnaturalizante))		40.3	39.1	40.7	41.1	42.3	39.7	41.2	40.9				
Hebra Efectora		47.8	47.8	47.6	49.1	48.1	46.2	48.5	47.6				
Hebra Antisensido		88.1	86.9	88.3	90.2	90.4	85.9	89.7	88.5				
Hebras sencillas totales		10.1	11.8	10.9	8.4	8.9	13.1	9.5	10.5				
Impurezas													
Ensayo (absorción UV)		100	101	97	100	98	99	98	103				

Tabla 6 - Estabilidad a largo plazo a 5°C del lote P02314 (Continuación)

Producto farmacológico:	Fitusiran - solución para inyectable - 100 mg/mL										Núm. lote:	P02314	
Recipiente/cierre:	Vial											Tamaño lote:	1.0 L
Condiciones almacenamiento:	+5°C±3°C										Fabricante:	AMRI	
Orientación en el almacenamiento:	Vertical												
Elemento de prueba	Criterios de aceptación	Tiempo											
		Resultados iniciales	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses	18 meses	24 meses	36 meses				
pH (Ph. Eur. 2.2.3, USP <791>)	Informe de datos	6.9	7.0	6.9	6.9	6.8	6.9	6.9	7.1				
Osmolalidad (Ph. Eur. 2.2.35, USP <785>)	Informe de datos (mOsm/kg)	292	290	292	294	287	291	292	292				
Materia particulada (USP <788>)	NMT 6,000 por recipiente NMT 600 por recipiente	21	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	80			
		0	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	2			
Endotoxinas bacterianas	NMT 100 UE/mL	70	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	51			
Esterilidad	Conforme	Pasa	NS	NS	NS	Pasa	NS	Pasa	Pasa	Pasa			

Abreviaturas : NS = No programado; ND = No detectado

Tabla 7 - Estabilidad a largo plazo a 25°C/50% de HR del lote P02314

Producto farmacológico:		Fitusiran - solución para inyectable - 100 mg/mL								Núm. lote: P02314	
Recipiente/cierre:		Vial								Tamaño lote: 1.0 L	
Condiciones almacenamiento:		+25°C±2°C/60%±5% RH								Fabricante: AMRI	
Orientación en el almacenamiento:		Vertical									
Elemento de prueba		Criterios de aceptación		Tiempo							
		Resultados iniciales	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses	18 meses	24 meses	36 meses		
Apariencia (inspección visual)		Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa		
Pureza de dúplex (IPRP HPLC UV no desnaturalizante))		99.2	98.8	99.0	99.1	99.3	99.2	99.2	99.2		
Hebras sencillas		0.4	0.4	0.4	0.5	0.4	0.8	0.8	0.5		
Impurezas		0.4	0.6	0.5	0.4	0.3	0.0	0.0	0.3		
Pureza AX HPLC UV (desnaturalizante)		42.2	42.2	42.9	43.0	43.8	46.2	44.3	43.1		
Hebra Efectora		48.7	48.6	49.7	50.1	51.0	51.4	50.7	50.5		
Hebra Antiséptico		90.9	90.8	92.6	93.1	94.8	97.6	95.0	93.6		
Hebras sencillas totales		6.9	7.6	7.5	5.7	4.8	1.9	5.1	4.9		
Impurezas											
Pureza (IPRP HPLC UV (desnaturalizante))		40.3	39.1	41.5	41.1	42.2	39.6	41.2	37.8		
Hebra Efectora		47.8	47.9	48.7	49.1	48.0	46.1	48.6	47.8		
Hebra Antiséptico		88.1	87.0	90.2	90.2	90.2	85.7	89.8	85.6		
Hebras sencillas totales		10.1	11.7	8.9	8.6	9.1	13.4	9.5	13.0		
Impurezas											
Ensayo (absorción UV)		100	101	97	100	99	99	100	107		
		90 a 110 mg/mL									

Tabla 7 - Estabilidad a largo plazo a 25°C/50% de HR del lote P02314 (continuación)

Producto farmacológico:		Fitusiran - solución para inyectable - 100 mg/mL										Núm. lote:		P02314	
Recipiente/cierre:		Vial										Tamaño lote:		1.0 L	
Condiciones almacenamiento:		+25°C±2°C/60%±5% RH										Fabricante:		AMRI	
Orientación en el almacenamiento:		Vertical													
Elemento de prueba		Criterios de aceptación	Tiempo												
			Resultados iniciales	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses	18 meses	24 meses	36 meses					
pH (Ph. Eur. 2.2.3, USP <791>)		Informe de datos	6.9	6.9	6.9	6.9	6.9	6.9	6.8	7.0					
Osmolalidad (Ph. Eur. 2.2.35, USP <785>)		Informe de datos (mOsm/kg)	292	291	293	296	292	294	294	294					
Materia particulada (USP <788>)															
≥10 µm		NMT 6,000 por recipiente	21	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	90			
≥25 µm		NMT 600 por recipiente	0	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0			
Endotoxinas bacterianas		NMT 100 UE/mL	70	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	26			
Esterilidad		Conforme	Pasa	NS	NS	NS	NS	Pasa	NS	Pasa	Pasa	Pasa			

Abreviaturas : NS = No programado; ND = No detectado

Tabla 8 - Estabilidad acelerada lote P02314

Producto farmacológico:		Fitusiran - solución para inyectable - 100 mg/mL		Núm. lote: Tamaño lote: Fabricante:		P02314 1.0 L AMRI	
Recipiente/cierre:		Vial					
Condiciones almacenamiento:		+40°C±2°C/75%±5% RH					
Orientación en el almacenamiento:		Vertical					
Elemento de prueba		Criterios de aceptación		Resultados iniciales		Tiempo	
				Pasa		3 meses	
						Pasa	
						6 meses	
Apariencia (inspección visual)		Solución de incolora a amarillo pálido, clara esencialmente libre de materia particulada		Pasa		Pasa	
Pureza de dúplex (IPRP HPLC UV no desnaturalizante)		NLT 90.0 % área		99.2		98.8	
Hebras sencillas		Informe de datos (% área)		0.4		0.4	
Impurezas		Informe de suma de % área de todos los picos $\geq 0.20\%$ área		0.4		0.7	
Pureza AX HPLC UV (desnaturalizante)							
Hebra Efectora		Informe de datos (% área)		42.2		42.1	
Hebra Antisérido		Informe de suma de % área de todos los picos $\geq 0.20\%$ área		48.7		48.7	
Hebras sencillas totales				90.9		90.8	
Impurezas				6.9		7.2	
Pureza (IPRP HPLC UV (desnaturalizante))		NLT 90.0 % área		40.3		38.9	
Hebra Efectora		Informe de datos (% área)		47.8		47.9	
Hebra Antisérido		Informe de suma de % área de todos los picos $\geq 0.20\%$ área		88.1		86.8	
Hebras sencillas totales				10.1		12.1	
Impurezas				100		100	
Ensayo (absorción UV)		90 a 110 mg/mL		6.9		6.9	
pH (Ph. Eur. 2.2.3, USP <791>)		Informe de datos		292		292	
Osmolalidad (Ph. Eur. 2.2.35, USP <785>)		Informe de datos (mOsm/kg)					
Materia particulada (USP <788>)		NMT 6,000 por recipiente		21		NS	
$\geq 10 \mu\text{m}$		NMT 600 por recipiente		0		NS	
$\geq 25 \mu\text{m}$		NMT 100 UE/mL		70		NS	
Endotoxinas bacterianas		Conforme		Pasa		NS	
Esterilidad						Pasa	

Abreviaturas: NS = No programado

Tabla 9 - Estabilidad a largo plazo a 5°C del lote P02715

Producto farmacológico:		Fitusiran - solución para inyectable - 100 mg/mL					Núm. lote:		P02715			
Recipiente/cierre:		Vial					Tamaño lote:		1.4 L			
Condiciones almacenamiento:		+5°C±3°C					Fabricante:		AMRI			
Orientación almacenamiento:		Invertido										
Elemento de prueba		Criterios de aceptación		Tiempo								
				Resultados iniciales	1 mes	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses	18 meses	24 meses	36 meses
Apariencia (inspección visual)		Solución de incolora a amarillo pálido clara esencialmente libre de m. part		Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa
Pureza de dúplex (IPRP HPLC UV no desnaturalizante)		NLT 90.0 % área		99.2	99.1	99.2	99.3	99.2	99.1	98.5	99.1	99.1
Hebras sencillas		Informe de datos (% área)		0.5	0.9	0.8	0.7	0.8	0.9	0.6	0.5	0.5
Impurezas		Informe de suma de % área de todos los picos ≥ 0,20% área		0.3	ND	ND	ND	ND	ND	0.9	0.3	0.3
Pureza AX HPLC UV (desnaturalizante)		Informe de datos (% área)		43.9	44.2	44.4	44.1	43.4	42.8	42.9	43.1	42.6
Hebra Efectora		Informe de suma de % área de todos los picos ≥ 0,20% área		50.0	50.8	50.6	50.8	49.9	49.3	50.0	50.5	49.8
Hebra Antisensido				93.9	95.0	95.0	94.9	93.3	92.1	92.9	93.6	92.4
Hebras sencillas totales				5.6	4.9	4.3	4.9	5.7	6.5	6.0	5.2	6.6
Impurezas												
Pureza (IPRP HPLC UV (desnaturalizante))		Informe de datos (% área)		41.0	40.5	40.6	41.8	41.1	41.2	40.3	42.5	38.9
Hebra Efectora				47.7	47.6	48.0	48.0	49.0	48.5	46.7	47.7	45.7
Hebra Antisensido				88.7	88.1	88.6	89.8	90.1	89.7	87.0	90.2	84.6
Hebras sencillas totales				10.3	10.7	10.8	8.7	9.1	9.4	11.7	9.0	13.4
Impurezas												
Ensayo (absorción UV)		90 a 110 mcd/mL		99	NT ^a	98	97	100	100	98	108	101

Tabla 9 - Estabilidad a largo plazo a 5°C del lote P02715 (continuación)

Producto farmacológico:		Fitusiran - solución para inyectable - 100 mg/mL					Núm. lote:		P02715						
Recipiente/cierre:		Vial					Tamaño lote:		1.4 L						
							Fabricante:		AMRI						
Condiciones almacenamiento:		+5°C±3°C													
Orientación almacenamiento:		Invertido													
Elemento de prueba		Criterios de aceptación					Time								
							Resultados iniciales	1 mes	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses	18 meses	24 meses	36 meses
pH (Ph. Eur. 2.2.3, USP <791>)		Informe de datos					6.9	7.0	6.9	6.9	6.9	7.0	7.0	6.9	6.9
Osmolalidad(Ph. Eur. 2.2.35, USP <785>)		Informe de datos (mOsm/kg)					295	292	291	290	293	292	292	291	291
Materia particulada (USP <788>)															
≥10 µm		NMT 6,000 por recipiente					50	NS	NS	NS	NS	12	NS	827	10
≥25 µm		NMT 600 por recipiente					2	NS	NS	NS	NS	0	NS	37	0
Endotoxinas bacterianas		NMT 100 UE/mL					41	NS	NS	NS	NS	25	NS	37	37
Esterilidad		Conforme					Pasa	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	Pasa
Integridad cierre recipiente		Sin evidencia de entrada de tinte					NS	NS	NS	NS	NS	Pasa	NS	Pasa	NS

Abreviaturas: NS = No programado; ND = No detectado; NT = No sometido a prueba a véase desviación AMRI D33015

Tabla 10 - Estabilidad a largo plazo a 25°C/60% de HR del lote P02715

Producto farmacológico:		Fitusiran - solución para inyectable - 100 mg/mL					Núm. lote: P02715			
Recipiente/cierre:		Vial					Tamaño lote: 1.4 L			
Condiciones almacenamiento:		+25°C±2°C/60%±5% RH					Fabricante: AMRI			
Orientación en el almacenamiento:		Invertido								
Elemento de prueba	Criterios de aceptación	Tiempo								
		Resultados iniciales	1 mes	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses	18 meses	24 meses	36 meses
Apariencia (inspección visual)	Solución de incolora a amarillo pálido, clara esencialmente libre de materia particulada	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa
Pureza de dúplex (IPRP HPLC UV no desnaturalizante) Hebras sencillas Impurezas	NLT 90.0 % área	99.2	99.2	99.3	99.3	99.1	99.2	98.5	99.1	99.1
	Informe de datos (% área)	0.5	0.8	0.7	0.7	0.9	0.8	0.6	0.5	0.5
	Informe de suma de % área de todos los picos ≥ 0,20% área	0.3	ND	<0.20	<0.20	<0.20	ND	0.9	0.3	0.3
Pureza AX HPLC UV (desnaturalizante) Hebra Efectora Hebra Antiséptico Hebras sencillas totales Impurezas	Informe de datos (% área)	43.9	44.0	44.2	43.7	43.5	42.9	42.9	43.1	42.7
		50.0	50.9	50.6	50.9	49.8	50.2	50.2	50.6	50.1
		93.9	94.9	94.8	94.6	93.3	93.1	93.1	93.7	92.8
		5.6	4.9	4.8	5.3	5.2	55.5	5.5	4.7	5.5
	Informe de suma de % área de todos los picos ≥ 0,20% área									
Pureza (IPRP HPLC UV (desnaturalizante)) Hebra Efectora Hebra Antiséptico Hebras sencillas totales Impurezas	Informe de datos (% área)	41.0	40.6	40.8	41.1	41.2	41.0	40.6	42.5	39.0
		47.7	47.7	48.2	48.4	49.1	48.3	47.0	47.9	46.0
		88.7	88.3	89.0	89.5	90.3	89.3	87.6	90.4	85.0
		10.3	10.5	10.2	9.2	9.0	9.5	11.5	9.0	12.9
	Informe de suma de % área de todos los picos ≥ 0,20% área									
Ensayo (absorción UV)	90 a 110 mg/mL	99	NT	98	97	100	101	98	107	102

Tabla 10 - Estabilidad a largo plazo a 25°C/60% de HR del lote P02715 (continuación)

Producto farmacológico:	Fitusiran - solución para inyectable - 100 mg/mL										Núm. lote:	P02715
Recipiente/cierre:	Vial										Tamaño lote:	1.4 L
Condiciones almacenamiento:	+25°C±2°C/60%±5% RH										Fabricante:	AMRI
Orientación en el almacenamiento:	Invertido											
Elemento de prueba	Criterios de aceptación	Tiempo										
		Resultados iniciales	1 mes	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses	18 meses	24 meses	36 meses		
pH (Ph. Eur. 2.2.3, USP <791>)	Informe de datos	6.9	7.0	6.9	6.9	6.9	6.9	6.9	6.9	6.9		
Osmolalidad (Ph. Eur. 2.2.35, USP <785>)	Informe de datos (mOsm/kg)	295	293	291	293	294	292	292	295	294		
Materia particulada (USP <788>)	≥10 µm	50	NS	NS	NS	NS		NS	12	7		
	≥25 µm	2	NS	NS	NS	NS		NS	0	0		
Endotoxinas bacterianas	NMT 100 UE/mL	41	NS	NS	NS	NS		NS	21	21		
Esterilidad	Conforme	Pasa	NS	NS	NS	NS		NS	NS	Pasa		
Integridad cierre recipiente	Sin evidencia de entrada de tinte	NS	NS	NS	NS	NS		Pasa	Pasa	NS		

Abreviaturas: NS = No programado; ND = No detectado; NT = No sometido a prueba * vease desviación AMRI D33015

Tabla 11 - Estabilidad acelerada del lote P02715

Producto farmacológico: Fitusiran - solución para inyectable - 100 mg/mL		Núm. lote: P02715			
Recipiente/cierre: Vial		Tamaño lote: 1.4 L			
Condiciones almacenamiento: +40°C±2°C/75%±5% RH		Fabricante: AMRI			
Orientación en el almacenamiento: Vertical					
Elemento de prueba	Criterios de aceptación	Tiempo			
		Resultados iniciales	1 mes	3 meses	6 meses
Apariencia (inspección visual)	Solución de incolora a amarillo pálido, clara esencialmente libre de materia particulada	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa
Pureza de dúplex (IPRP HPLC UV no desnaturalizante)	NLT 90.0 % área	99.2	99.1	99.3	99.4
Hebras sencillas	Informe de datos (% área)	0.5	0.5	0.9	0.7
Impurezas	Informe de suma de % área de todos los picos ≥ 0,20% área	0.3	ND	ND	ND
Pureza AX HPLC UV (desnaturalizante)	Informe de datos (% área)	43.9	44.1	43.8	43.7
Hebra Efectora		50.0	50.9	50.8	51.3
Hebra Antiséptico		93.9	95.0	94.6	95.0
Hebras sencillas totales	Informe de suma de % área de todos los picos ≥ 0,20% área	5.6	4.9	5.0	4.8
Impurezas					
Pureza (IPRP HPLC UV (desnaturalizante))	Informe de datos (% área)	41.0	40.7	41.0	41.0
Hebra Efectora		47.7	47.8	48.6	48.0
Hebra Antiséptico		88.7	88.5	89.6	89.0
Hebras sencillas totales	Informe de suma de % área de todos los picos ≥ 0,20% área	10.3	10.1	10.0	10.0
Impurezas					
Ensayo (absorción UV)	90 a 110 mg/mL	99	NT	98	97
pH (Ph. Eur. 2.2.3, USP <791>)	Informe de datos	6.9	7.0	6.8	6.8
Osmolalidad (Ph. Eur. 2.2.35, USP <785>)	Informe de datos (mOsm/kg)	295	292	293	296
Materia particulada (USP <788>)					
≥10 µm	NMT 6,000 por recipiente	50	NS	NS	22
≥25 µm	NMT 600 por recipiente	2	NS	NS	1
Endotoxinas bacterianas	NMT 100 UE/mL	41	NS	NS	7
Estilidad	Conforme	Pasa	NS	NS	Pasa

Abreviaturas: NS = No programado

Tabla 12 - Estabilidad a largo plazo a 5°C del lote P07916

Producto farmacológico:		Fitusiran - solución para inyectable - 100 mg/mL					Núm. lote: Tamaño lote: Fabricante:		P07916 2.0 L AMRI			
Recipiente/cierre:		Vial										
Condiciones almacenamiento:		+5°C±3°C										
Orientación en el almacenamiento:		Invertido										
Elemento de prueba		Criterios de aceptación		Tiempo								
				Resultados Iniciales	1 mes	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses	18 meses	24 meses	36 meses
Apariencia (inspección visual)		Solución de incolora a amarillado, clara esencialmente libre de materia particulada		Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Todavía no disponible	
Pureza de dúplex (IPRP HPLC UV no desnaturalizante)		NLT 90% área		98.5	98.5	98.5	98.5	98.6	98.6	98.5		
Hebras sencillas		Informe datos (% área)		0.7	0.7	0.6	0.7	0.7	0.7	0.7		
Impurezas		Informe suma de % área de todos los picos $\geq 0,20\%$ área		0.9	0.8	0.9	0.9	0.8	0.7	0.8		
Pureza AX HPLC UV (desnaturalizante)		Informe datos (% área)		44.5	44.5	45.0	44.9	44.5	44.3	44.2	Todavía no disponible	
Hebra Efectora		Informe suma de % área de todos los picos $\geq 0,20\%$ área		50.3	50.3	50.8	50.7	50.4	50.1	50.0		
Hebra Antiséptico				94.7	94.7	95.8	95.5	94.8	94.4	94.3		
Hebras sencillas totales				5.1	5.1	4.0	4.2	4.9	5.6	5.6		
Impurezas												
Pureza (IPRP HPLC UV (desnaturalizante))		Informe datos (% área)		42.0	41.8	42.5	43.7	40.6	40.6	41.7		
Hebra Efectora		Informe suma de % área de todos los picos $\geq 0,20\%$ área		46.9	48.5	48.7	77.9	46.0	46.0	46.3		
Hebra Antiséptico				88.9	90.3	91.2	91.6	86.6	86.7	88.0		
Hebras sencillas totales				10.9	9.2	8.6	8.2	13.2	13.0	11.9		
Impurezas												
Ensayo (absorción UV)		90 a 110 mg/mL		100	100	101	101	102	101	101		

Tabla 12 - Estabilidad a largo plazo a 5°C del lote P07916 (continuación)

Producto farmacológico:		Fitusiran - solución para inyectable - 100 mg/mL					Núm. lote:		P07916		
Recipiente/cierre:		Vial					Tamaño lote:		2.0 L		
Condiciones almacenamiento:		+5°C±3°C					Fabricante:		AMRI		
Orientación en el almacenamiento:		Invertido									
Elemento de prueba		Criterios de aceptación		Time							
		Resultados Iniciales	1 mes	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses	18 meses	24 meses	36 meses	
pH (Ph. Eur. 2.2.3, USP <791>)	Informe de datos	7.1	7.0	7.0	7.0	7.1	7.0	7.0			
Osmolalidad (Ph. Eur. 2.2.35, USP <785>)	Informe datos (mOsm/kg)	307	308	306	306	309	308	307			
Materia particulada (USP <788>)										Todavía no disponible	
	NMT 6,000 por recipiente	22	NS	NS	NS	NS	31	NS			
	NMT 600 por recipiente	1	NS	NS	NS	NS	2	NS			
Endotoxinas bacterianas	NMT 100 UE/mL	0.6	NS	NS	NS	NS	<0.1	NS			
Estérilidad	Conforme	Pasa	NS	NS	NS	NS	NS	NS			
Integridad cierre recipiente	Sin evidencia de entrada de tinte	NS	NS	NS	NS	NS	Pasa	NS			

Abreviaturas: NS = No programado; ND = No detectado

Tabla 13 - Estabilidad a largo plazo a 25°C/60% de HR del lote P07916

Producto farmacológico:		Fitusiran - solución para inyectable - 100 mg/mL					Núm. lote: P07916												
Recipiente/cierre:		Vial					Tamaño lote: 2.0 L												
Condiciones almacenamiento:		+25°C±2°C/60%±5% RH					Fabricante: AMRI												
Orientación en el almacenamiento:		Invertido																	
Elemento de prueba		Criterios de aceptación		Tiempo															
		Resultados Iniciales		1 mes		3 meses		6 meses		9 meses		12 meses		18 meses		24 meses		36 meses	
Apariencia (inspección visual)		Solución de incolora a amarillito pálido, clara esencialmente libre de materia particulada		Pasa		Pasa		Pasa		Pasa		Pasa		Pasa		Pasa		Todavía no disponible	
Pureza de dúplex (IPRP HPLC UV no desnaturalizante)		NLT 90% área		98.5		98.6		98.6		98.4		98.6		98.5		98.4			
Hebras sencillas		Informe datos (% área)		0.7		0.7		0.6		0.7		0.7		0.7		0.7			
Impurezas		Informe suma de % área de todos los picos $\geq 0,20\%$ área		0.9		0.8		0.8		0.9		0.7		0.7		0.9			
Pureza AX HPLC UV (desnaturalizante)		Informe datos (% área)		44.5		44.6		45.0		44.7		44.5		44.3		44.2			
Hebra Efectora		Informe suma de % área de todos los picos $\geq 0,20\%$ área		50.3		50.6		50.8		50.7		50.4		50.0		50.1			
Hebra Antiséptico				94.7		95.2		95.8		95.4		94.9		94.2		94.3			
Hebras sencillas totales				5.1		4.6		4.1		4.3		4.8		5.7		5.5			
Impurezas																			
Pureza (IPRP HPLC UV (desnaturalizante))		Informe datos (% área)		42.0		42.1		42.8		44.2		40.2		40.2		41.7			
Hebra Efectora		Informe suma de % área de todos los picos $\geq 0,20\%$ área		46.9		49.3		48.9		48.3		45.5		45.8		46.4			
Hebra Antiséptico				88.9		91.4		91.6		92.5		85.8		86.0		88.1			
Hebras sencillas totales				10.9		8.2		8.2		7.3		14.0		13.8		11.8			
Impurezas																			
Ensayo (absorción UV)		90 a 110 mg/mL		100		100		101		101		98		100		101			

Tabla 13 - Estabilidad a largo plazo a 25°C/60% de HR del lote P07916 (continuación)

Producto farmacológico:		Fitusiran - solución para inyectable - 100 mg/mL						Núm. lote: Tamaño lote: Fabricante:		P07916 2.0 L AMRI		
Recipiente/cierre:		Vial										
Condiciones almacenamiento:		+25°C±2°C/60%±5% RH										
Orientación en el almacenamiento:		Invertido										
Elemento de prueba		Criterios de aceptación		Tiempo								
				Resultados Iniciales	1 mes	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses	18 meses	24 meses	36 meses
pH (Ph. Eur. 2.2.3, USP <791>)		Informe de datos		7.1	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0		
Osmolalidad (Ph. Eur. 2.2.35, USP <785>)		Informe datos (mOsm/kg)		307	308	308	309	310	310	309		
Materia particulada (USP <788>) ≥10 µm ≥25 µm		NMT 6,000 por recipiente		22	NS	NS	NS	NS	NS	209	NS	Todavía no disponible
		NMT 600 por recipiente		1	NS	NS	NS	NS	NS	6	NS	
		NMT 100 UE/mL		0.6	NS	NS	NS	NS	NS	<0.1	NS	
Endotoxinas bacterianas												
Estérilidad		Conforme		Pasa	NS	NS	NS	NS	NS	NS		
Integridad cierre recipiente		Sin evidencia de entrada de aire		NS	NS	NS	NS	NS	Pasa	NS		

Abreviaturas: NS = No programado; ND = No detectado

Tabla 14 - Estabilidad acelerada del lote P07916

Producto farmacológico:		Fitusiran - solución para inyectable - 100 mg/mL			Núm. lote: Tamaño lote: Fabricante:		P07916 2.0 L AMRI	
Recipiente/cierre:		Vial						
Condiciones almacenamiento:		+40°C±2°C/75%±5% RH						
Orientación en el almacenamiento:		Vertical						
Elemento de prueba		Criterios de aceptación			Tiempo			
					Resultados iniciales	1 mes	3 meses	6 meses
Apariencia (inspección visual)		Solución de incolora a amarillo pálido, clara esencialmente libre de materia particulada			Pasa			
Pureza de dúplex (IPRP HPLC UV, no desnaturalizante)		NLT 90,0 % área			98.5	98.6	98.6	98.5
Hebras sencillas		Informe de datos (% área)			0.7	0.8	0.7	0.8
Impurezas		Informe de suma de % área de todos los picos ≥ 0,20% área			0.9	0.7	0.7	0.7
Pureza AX HPLC UV (desnaturalizante)		Informe de datos (% área)			44.5	44.4	44.8	44.5
Hebra Efectora		Informe de suma de % área de todos los picos ≥ 0,20% área			50.3	50.3	50.9	50.6
Hebra Antiséptico					94.7	94.7	95.7	95.1
Hebras sencillas totales					5.1	5.1	4.1	4.6
Impurezas								
Pureza (IPRP HPLC UV (desnaturalizante))		Informe de datos (% área)			42.0	42.1	42.7	44.2
Hebra Efectora					46.9	48.7	48.9	48.5
Hebra Antiséptico					88.9	90.8	91.6	92.7
Hebras sencillas totales					10.9	8.9	8.1	7.2
Impurezas								
Ensayo (absorción UV)		90 a 110 mg/mL			100	100	102	98
pH (Ph. Eur. 2.2.3, USP <791>)		Informe de datos			7.1	6.9	7.0	6.8
Osmolalidad (Ph. Eur. 2.2.35, USP <785>)		Informe de datos (mOsm/kg)			307	308	308	310
Materia particulada (USP <788>)								
≥10 µm		NMT 6,000 por recipiente			22	NS	NS	22
≥25 µm		NMT 600 por recipiente			1	NS	NS	3
Endotoxinas bacterianas		NMT 100 UE/mL			0.6	NS	NS	<0.1
Esterilidad		Conforme			Pasa	NS	NS	Pasa

Abreviaturas: NS = No programado