

Métodos para el tratamiento de la deficiencia de alfa-1 antitripsina (AATD)

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 **[0001]** La presente solicitud contiene un listado de secuencias que se presentó en formato ASCII y se incorpora en su totalidad mediante esta referencia. La copia ASCII se llama 30674_WO1_SequenceListing.txt y tiene un tamaño de 6 kb.

CAMPO DE LA INVENCION

10

[0002] En la presente se describen métodos para el tratamiento de la deficiencia de alfa-1 antitripsina (AATD, por sus siglas en inglés) en un sujeto humano, incluido el tratamiento de los síntomas y las enfermedades que causa la AATD, mediante el uso de composiciones farmacéuticas que incluyen agentes de interferencia de ARN (iARN) que inhiben la expresión del gen de alfa-1 antitripsina.

15

ANTECEDENTES

[0003] La alfa-1 antitripsina (AAT, α 1-antitripsina o A1AT) es un inhibidor de proteasas perteneciente a la superfamilia de las serpinas que es codificado en los seres humanos por el gen *SERPINA1*. La proteína AAT normal es un inhibidor de proteasas de carácter glucoproteico en circulación sintetizado principalmente en el hígado por los hepatocitos y secretado en la sangre. La función fisiológica conocida de la AAT es inhibir las proteasas neutrofílicas, lo cual sirve para proteger los tejidos del hospedador de lesiones inespecíficas durante los períodos de inflamación.

20 **[0004]** La deficiencia de alfa-1 antitripsina (AATD) es un trastorno genético codominante autosómico que da como resultado niveles bajos en circulación de AAT y provoca enfermedades pulmonares tempranas en adultos y enfermedades hepáticas en niños y adultos. El rango de prevalencia de la deficiencia de AAT (AATD) es de alrededor de 1 en cada entre 1500 y 5000 individuos y afecta con mayor frecuencia a personas de ascendencia europea.

30 **[0005]** La forma clínicamente más significativa de la AATD es provocada por la mutación Z. El alelo mutante Z, a través de una mutación en un solo punto, hace que la proteína AAT de la forma Z mutante (la «proteína Z-AAT») sea propensa a un plegamiento anormal que provoca la retención intracelular en el retículo endoplasmático (RE) de los hepatocitos. Otras mutaciones menos frecuentes también dan como resultado una proteína acumulada de plegamiento incorrecto en los hepatocitos. Los monómeros de la proteína Z-AAT mutante pueden acumularse en cúmulos poliméricos, que a veces se denominan

«glóbulos». Las masas de glóbulos poliméricos ejercen presión sobre el RE y desencadenan un ciclo de lesión y curación continua de los hepatocitos, lo cual conduce a fibrosis, cirrosis y aumento del riesgo de carcinoma hepatocelular. Además, la ausencia de actividad contra las proteasas en circulación pone al pulmón en riesgo de lesiones por la elastasa neutrofílica, particularmente en el contexto de la inflamación pulmonar, lo que da como resultado el desarrollo de complicaciones respiratorias tales como el enfisema u otra enfermedad pulmonar.

[0006] Los individuos con el genotipo PiZZ homocigótico tienen una deficiencia grave de AAT funcional. El uso semanal de la terapia de aumento de AAT, mediante el uso de AAT humana purificada, ayuda a prevenir el daño pulmonar en las personas afectadas. Esos productos que se comercializan actualmente incluyen, por ejemplo, Prolastin®-C, Prolastin®, Glassia™, Aralast® NP y Zemaira®. Sin embargo, si bien la administración de AAT purificada puede mejorar o ayudar a prevenir el daño pulmonar provocado por la ausencia o los niveles bajos de AAT secretada a nivel endógeno, los pacientes con AATD (con una mutación de AAT que da como resultado la formación de polímeros) siguen siendo vulnerables a la enfermedad de almacenamiento a nivel hepático del retículo endoplásmico provocada por el depósito y la acumulación de proteína AAT de plegamiento anormal en exceso. La proteína Z-AAT acumulada en una conformación de «glóbulo» en los hepatocitos es una característica histológica muy conocida de la enfermedad hepática por AATD y se cree que produce efectos proteotóxicos que son causantes de la inducción de lesiones hepáticas, incluido el daño y la muerte de las células hepáticas y la lesión hepática crónica en individuos con AATD (véase, p. ej., D. Lindblad et ál., *Hepatology* 2007, 46: 1228-1235). Se ha informado que los pacientes nulos/nulos, que no producen AAT, desarrollan enfermedades pulmonares graves, pero tienen una morfología hepática normal, lo cual proporciona pruebas de que la acumulación de la AAT mutante, y no la falta de la AAT en circulación, conduce a una enfermedad hepática (Feldman, G. et ál., *The Ultrastructure of Hepatocytes in alpha-1 antitrypsin deficiency with genotype Pi₀*, *Gut*. 1975; 16:796-799).

[0007] La AATD predispone a las personas a la enfermedad hepática en niños y adultos y al enfisema de aparición temprana en adultos. Los pacientes con AATD a menudo desarrollan enfermedad hepática, que puede ser grave o mortal, incluso en la infancia. Si bien algunos pacientes con AATD escapan a la detección inicialmente, se termina por acumular la fibrosis y esto conduce a una enfermedad hepática clínicamente evidente. Las presentaciones clínicas de la lesión hepática incluyen la hepatitis crónica, la cirrosis, el aumento del riesgo de carcinoma hepatocelular, la transaminitis, la colestasis, la fibrosis e incluso la insuficiencia hepática fulminante.

[0008] La acumulación de glóbulos de proteína Z-AAT en los hepatocitos se ha identificado claramente como la causa de la enfermedad hepática progresiva en los pacientes con AATD. La eliminación de la acumulación de proteínas mutantes en los hepatocitos puede detener la progresión de la enfermedad

hepática. La eliminación de la agresión de las proteínas mutantes también puede permitir la regresión de la fibrosis ya presente. Actualmente no existe un tratamiento clínicamente aprobado para prevenir la aparición, enlentecer la progresión o tratar de otro modo la enfermedad hepática provocada por la AATD.

[0009] Los agentes de iARN han surgido como una vía auspiciosa para el tratamiento de pacientes con AATD. Las estrategias de administración de dosis son una consideración importante en el tratamiento de la AATD con agentes de iARN. Los pacientes valoran una administración de dosis con menor frecuencia, lo cual conduce a un mayor cumplimiento, y cantidades de dosificación más pequeñas pueden ser beneficiosas en el perfil de seguridad global del fármaco. Por lo tanto, existe la necesidad de un método de dosis bajas y poco frecuentes para el tratamiento de la AATD.

COMPENDIO

[0010] En la presente se describen métodos para tratar la deficiencia de alfa-1 antitripsina (AATD) en un sujeto humano que lo necesite. En un aspecto, los métodos comprenden administrar al sujeto humano una composición farmacéutica que incluye la composición descrita en la Tabla 2 (es decir, la sustancia farmacológica de iARN de AAT, también denominada en la presente ADS-001) en una dosis de entre alrededor de 5 mg y alrededor de 300 mg de la sustancia farmacológica de iARN de AAT, donde la composición farmacéutica se administra por vía subcutánea y hay al menos alrededor de un mes entre las dosis (es decir, dosificación al menos mensual). En algunas modalidades, la composición farmacéutica usada en los métodos descritos en la presente comprende, consiste o consiste esencialmente en la sustancia farmacológica de iARN de AAT formulada como se describirá en la Tabla 3 (también denominada en la presente ADS-001-1).

[0011] Además, en la presente se describen métodos de tratamiento de la AATD en un sujeto humano que lo necesite, donde los métodos comprenden administrar al sujeto humano una composición farmacéutica que incluye la sustancia farmacológica de iARN de AAT tal como se describirá en la Tabla 2 (es decir, ADS-001) en una dosis de entre alrededor de 5 mg y alrededor de 200 mg, donde la composición farmacéutica se administra por vía subcutánea y hay al menos alrededor de un mes entre las administraciones de dosis (es decir, dosificación mensual).

[0012] Además, en la presente se describen métodos de tratamiento de la AATD en un sujeto humano que lo necesite, donde los métodos comprenden administrar al sujeto humano una composición farmacéutica que incluye la sustancia farmacológica de iARN de AAT tal como se describirá en la Tabla 2 (es decir, ADS-001) en una dosis de entre alrededor de 5 mg y alrededor de 300 mg, donde la composición farmacéutica se administra por vía subcutánea y hay alrededor de tres meses entre las administraciones de dosis (es decir, dosificación trimestral).

[0013] En la presente también se describen métodos de tratamiento de la AATD en un sujeto humano que lo necesite, donde los métodos comprenden administrar al sujeto humano una composición farmacéutica que incluye la sustancia farmacológica de iARN de AAT tal como se describirá en la Tabla 2 (es decir, ADS-001) en una dosis de entre alrededor de 5 mg y alrededor de 200 mg, donde la composición farmacéutica se administra por vía subcutánea y hay alrededor de tres meses entre las administraciones de dosis (es decir, dosificación trimestral).

[0014] En la presente se describen métodos de tratamiento de la AATD en un sujeto humano que lo necesite, donde los métodos comprenden administrar al sujeto humano una composición farmacéutica que incluye la sustancia farmacológica de iARN de AAT tal como se describirá en la Tabla 2 (es decir, ADS-001) en una dosis de entre alrededor de 5 mg y alrededor de 300 mg, donde la composición farmacéutica se administra por vía subcutánea, y donde la dosis inicial es seguida por una segunda dosis alrededor de un mes después, y posteriormente para las dosis posteriores hay al menos alrededor de tres meses entre las administraciones de dosis.

[0015] En la presente se describen métodos de tratamiento de la AATD en un sujeto humano que lo necesite, donde los métodos comprenden administrar al sujeto humano una composición farmacéutica que incluye la sustancia farmacológica de iARN de AAT tal como se describirá en la Tabla 2 (es decir, ADS-001) en una dosis de entre alrededor de 5 mg y alrededor de 200 mg, donde la composición farmacéutica se administra por vía subcutánea, y donde la dosis inicial es seguida por una segunda dosis alrededor de un mes después, y posteriormente para las dosis posteriores hay al menos alrededor de tres meses entre las administraciones de dosis.

[0016] En algunas modalidades, la dosis de la sustancia farmacológica de iARN de AAT administrada en cada dosis es de entre alrededor de 25 mg y alrededor de 200 mg. En algunas modalidades, la dosis de la sustancia farmacológica de iARN de AAT administrada en cada dosis es de entre alrededor de 100 mg y alrededor de 200 mg. En algunas modalidades, la dosis de la sustancia farmacológica de iARN de AAT administrada en cada dosis es de alrededor de 100 mg. En algunas modalidades, la dosis de la sustancia farmacológica de iARN de AAT administrada en cada dosis es de alrededor de 200 mg. En algunas modalidades, la dosis de la sustancia farmacológica de iARN de AAT administrada en cada dosis es de no más de 200 mg.

[0017] Los métodos de tratamiento descritos en la presente pueden enlentecer o detener la progresión de la enfermedad hepática en un sujeto humano con AATD, lo cual puede permitir la reparación del tejido fibrótico. Los métodos descritos en la presente pueden, en algunas modalidades, tratar enfermedades hepáticas por AATD que incluyen la fibrosis, la cirrosis, el aumento del riesgo de carcinoma hepatocelular, la hepatitis crónica, la transaminitis, la colestasis, la insuficiencia hepática fulminante y otras afecciones y enfermedades relacionadas con el hígado provocadas por la AATD.

[0018] Las composiciones farmacéuticas que incluyen agentes de iARN de AAT descritos en la presente pueden administrarse a un sujeto humano para inhibir la expresión del gen de alfa-1 antitripsina en el sujeto. En algunas modalidades, el sujeto es un ser humano al que se le ha diagnosticado previamente una AATD.

5 **[0019]** Otro aspecto de la invención proporciona el uso de la sustancia farmacológica de iARN de AAT descrita en la Tabla 2 para el tratamiento de la deficiencia de alfa-1 antitripsina (AATD) en un sujeto humano que lo necesite, donde el uso comprende administrar al paciente una composición farmacéutica que comprende la sustancia farmacológica de iARN de AAT descrita en la Tabla 2 en una dosis de entre
10 alrededor de 5 mg y alrededor de 300 mg de la sustancia farmacológica de iARN de AAT, donde la composición farmacéutica se administra una vez al mes mediante inyección subcutánea.

[0020] Otro aspecto de la invención proporciona el uso de la sustancia farmacológica de iARN de AAT descrita en la Tabla 2 para el tratamiento de la deficiencia de alfa-1 antitripsina (AATD) en un sujeto humano que lo necesite, donde el uso comprende administrar al paciente una composición farmacéutica que comprende la sustancia farmacológica de iARN de AAT descrita en la Tabla 2 en una dosis de entre
15 alrededor de 5 mg y alrededor de 300 mg de la sustancia farmacológica de iARN de AAT, donde la composición farmacéutica se administra una vez cada tres meses mediante inyección subcutánea.

[0021] Otros objetos, elementos, aspectos y beneficios de la invención serán evidentes a partir de la descripción detallada que sigue, las figuras adjuntas y las reivindicaciones.

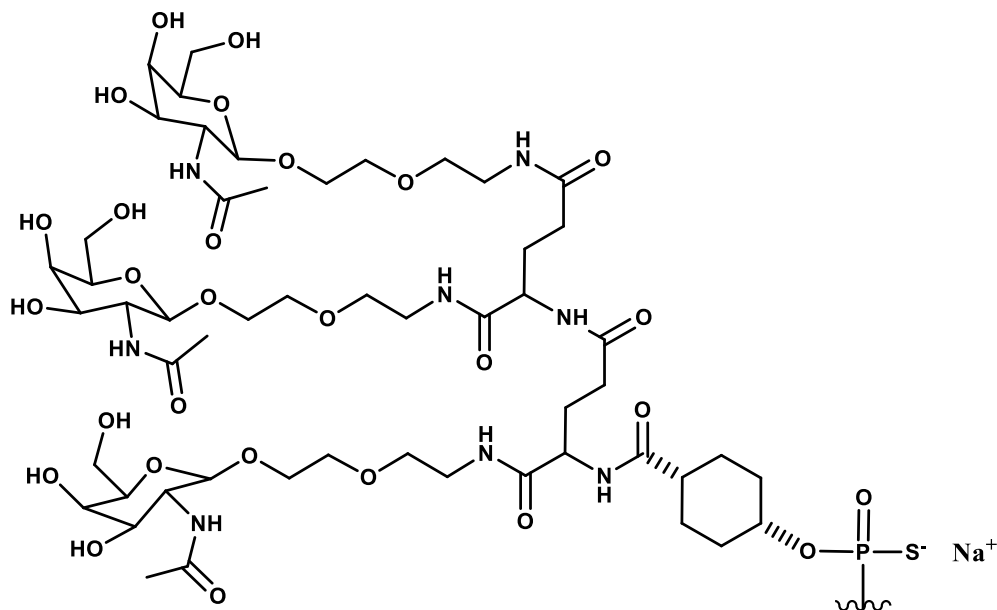
20 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

[0022] Figuras 1A a 1E. Representación de la estructura química de la sustancia farmacológica de iARN de AAT descrita en la Tabla 2 (denominada en la presente ADS-001; es decir, el agente de iARN de AAT conjugado con un grupo dirigido a la N-acetil-galactosamina de carácter tridentado en el extremo
25 5' de la cadena codificante), que se muestra en forma de una sal de sodio.

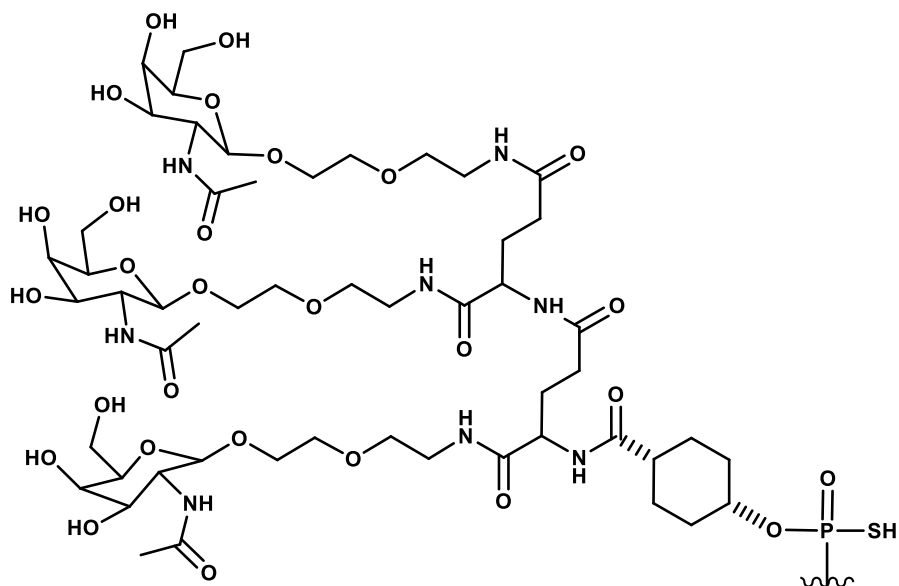
[0023] Figuras 2A a 2E. Representación de la estructura química de la sustancia farmacológica de iARN de AAT descrita en la Tabla 2, mostrada en forma de un ácido libre.

[0024] FIG. 3. Diagrama esquemático de las cadenas codificante y no codificante de la sustancia farmacológica de iARN de AAT descrita en la Tabla 2 (mencionada en la presente como ADS-001; es
30 decir, agente de iARN de AAT conjugado con un grupo dirigido a la N-acetil-galactosamina de carácter tridentado en el extremo 5' de la cadena codificante). En la Figura 3 se usan las siguientes abreviaturas: a, c, g y u son nucleótidos modificados con 2'-O-metilo; Af, Cf, Gf y Uf son nucleótidos modificados con 2'-fluoro (también denominados en la técnica 2'-desoxi-2'-fluoro); o es un enlace fosfodiéster; s es un

enlace fosforotioato; invAb es una subunidad o un residuo abásico invertido; y (NAG37) s es un ligando dirigido a N-acetil-galactosamina de carácter tridentado que tiene la siguiente estructura química:



(se muestra en forma de sal de sodio),



5

(se muestra en forma de ácido libre).

[0025] FIG. 4. Diseño final del estudio de fase I y calendario de aumento de dosis para el estudio clínico de fase I descrito en el Ejemplo 2.

[0026] FIG. 5. Gráfico que muestra los niveles de AAT en suero en voluntarios humanos de salud normal (NHV) que reciben la administración de placebo (todas las cohortes) o 35 mg de la sustancia farmacológica de iARN de AAT (cohorte 1) del estudio clínico de fase I descrito en el Ejemplo 2. Tal

como se muestra en las Figuras 5 a 11, «activa» hace referencia a la sustancia farmacológica de iARN de AAT descrita en la Tabla 2 (administrada como la sustancia farmacológica de iARN de AAT formulada tal como se describirá en la Tabla 3).

[0027] FIG. 6. Gráfico que muestra los niveles de AAT en suero en NHV que reciben la administración de placebo (todas las cohortes) o una sola dosis de 100 mg de la sustancia farmacológica de iARN de AAT (Cohorte 2b) del estudio clínico de fase I descrito en el Ejemplo 2.

[0028] FIG. 7. Gráfico que muestra los niveles de AAT en suero en NHV que reciben la administración de placebo (todas las cohortes) o una sola dosis de 200 mg de la sustancia farmacológica de iARN de AAT (Cohorte 3b) del estudio clínico de fase I descrito en el Ejemplo 2.

[0029] FIG. 8. Gráfico que muestra los niveles de AAT en suero en NHV que reciben la administración de placebo (todas las cohortes) o una sola dosis de 300 mg de la sustancia farmacológica de iARN de AAT (Cohorte 4b) del estudio clínico de fase I descrito en el Ejemplo 2.

[0030] FIG. 9. Gráfico que muestra los niveles de AAT en suero en NHV que reciben la administración de placebo (todas las cohortes) o tres dosis de 100 mg de la sustancia farmacológica de iARN de AAT administradas mensualmente (Cohorte 2) del estudio clínico de fase I descrito en el Ejemplo 2.

[0031] FIG. 10. Gráfico que muestra los niveles de AAT en suero en NHV que reciben la administración de placebo (todas las cohortes) o tres dosis de 200 mg de la sustancia farmacológica de iARN de AAT administradas mensualmente (Cohorte 3) del estudio clínico de fase I descrito en el Ejemplo 2.

[0032] FIG. 11. Gráfico que muestra los niveles de AAT en suero en NHV que reciben la administración de placebo (todas las cohortes) o tres dosis de 300 mg de la sustancia farmacológica de iARN de AAT administradas mensualmente (Cohorte 4) del estudio clínico de fase I descrito en el Ejemplo 2.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Agentes de iARN

[0033] Los métodos descritos en la presente incluyen la administración de una composición farmacéutica a un sujeto humano, donde la composición farmacéutica incluye una composición que contiene un agente de interferencia de ARN (iARN) (al que se hace referencia en la presente y en la técnica como un agente de iARN o un activador de iARN) capaz de inhibir la expresión de un gen de AAT. En algunas modalidades, los métodos descritos en la presente incluyen la administración de una composición farmacéutica a un sujeto humano, donde la composición farmacéutica incluye la sustancia farmacológica de iARN de AAT descrita en la Tabla 2 (también denominada ADS-001). Las

composiciones adecuadas para el uso en los métodos descritos en la presente están compuestas por un agente de iARN que inhibe la expresión de un gen de AAT en un sujeto humano, y un resto dirigido o grupo dirigido. En algunas modalidades, el agente de iARN incluye las secuencias de nucleótidos proporcionadas en la Tabla 1A y 1B, y la cadena codificante del agente de iARN se enlaza o conjuga de manera adicional con un grupo dirigido que comprende tres restos dirigidos a la N-acetil-galactosamina (véase, p. ej., la Tabla B). Un agente de iARN que inhibe la expresión de un gen de AAT en un sujeto humano se denomina «agente de iARN de AAT».

[0034] En general, los agentes de iARN de AAT comprenden una cadena codificante (también denominada «cadena pasajera») y una cadena no codificante (también denominada «cadena guía») que se hibridan para formar un dúplex. Los agentes de iARN de AAT descritos en la presente incluyen una molécula oligonucleotídica de ARN o similar a ARN (p. ej., ARN modificado químicamente) capaz de degradar o inhibir la traducción de transcripciones de ARN mensajero (ARNm) del ARNm de AAT de manera específica con respecto a la secuencia. Los agentes de iARN de AAT descritos en la presente pueden funcionar a través del mecanismo de interferencia del ARN (es decir, la inducción de la interferencia del ARN a través de la interacción con la maquinaria de la vía de interferencia del ARN (complejo de silenciamiento inducido por el ARN o RISC [por sus siglas en inglés]) de células de mamíferos), o mediante una o más vías o mecanismos alternativos cualesquiera. Si bien se cree que los agentes de iARN de AAT, tal como se usa esa expresión en la presente, funcionan principalmente a través del mecanismo de interferencia de ARN, los agentes de iARN descritos no están vinculados ni limitados a ninguna vía o mecanismo de acción particular. Los agentes de iARN en general están compuestos por una cadena codificante y una cadena no codificante que tienen cada una en cada caso de 16 a 49 nucleótidos de longitud, e incluyen, de modo no taxativo: ARN interferentes pequeños o cortos (ARNip), ARN bicatenarios (ARNbc), micro-ARN (miARN), ARN de horquilla corta (ARNhc) y sustratos de dicer.

[0035] La longitud de una cadena codificante del agente de iARN de AAT tiene normalmente de 16 a 49 nucleótidos de longitud, y la longitud de una cadena no codificante del agente de iARN de AAT tiene normalmente de 18 a 49 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, las cadenas codificante y no codificante tienen de manera independiente entre 17 y 26 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, las cadenas codificante y no codificante tienen de manera independiente entre 21 y 26 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, las cadenas codificante y no codificante tienen de manera independiente entre 21 y 24 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, las cadenas codificantes y/o no codificante tienen de manera independiente 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, la cadena codificante y la cadena no codificante tienen ambas 21 nucleótidos de longitud. Las cadenas codificante y no codificante pueden

tener la misma longitud o longitudes diferentes. Las cadenas codificante y no codificante también pueden formar una saliente de nucleótidos en uno o ambos extremos del agente de iARN de AAT.

[0036] Los agentes de iARN de AAT inhiben, silencian o desactivan la expresión del gen de AAT. Tal como se usan en la presente, las expresiones «silenciar», «reducir», «inhibir», «regular a la baja» o «desactivar», cuando hacen referencia a la expresión de AAT, significan que la expresión del gen, medida según el nivel de ARN que se transcribe a partir del gen o el nivel de polipéptido, proteína o subunidad proteica que se traduce a partir del ARNm en una célula, un grupo de células, un tejido, un órgano o un sujeto en el que se transcribe el gen, se reduce cuando la célula, el grupo de células, el tejido, el órgano o el sujeto se trata con el agente de iARN en comparación con una segunda célula, grupo de células, tejido, órgano o sujeto que no ha sido tratado o no lo ha sido de esa manera. En algunos casos, la reducción en la expresión génica se mide mediante la comparación de los niveles de referencia de ARNm de AAT o proteína AAT en un sujeto humano antes de la administración de una composición que comprende un agente de iARN de AAT, con los niveles de ARNm de AAT o proteína AAT después de la administración del producto terapéutico.

[0037] La inhibición, el silenciamiento o la desactivación del gen de AAT pueden medirse mediante cualquier ensayo o método adecuado conocido en la técnica. Los ejemplos no taxativos que se indican en la presente, así como los ejemplos que se indican en la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 2018/132432 (solicitud de patente n.º PCT/US2018/013102), que se incorpora en su totalidad mediante referencia, proporcionan determinados ejemplos de ensayos adecuados para medir la inhibición de la expresión del gen de AAT. Se puede encontrar una transcripción del gen de ARNm de AAT de referencia (SERPINA1) para seres humanos normales (denominada variante de transcripción 1; GenBank NM_000295.4) en la SEQ ID NO:1.

[0038] Los agentes de iARN de AAT adecuados para el uso en los métodos descritos en la presente pueden conjugarse o enlazarse de manera covalente con un grupo dirigido que incluya uno o más restos de N-acetil-galactosamina. En las modalidades, los agentes de iARN de AAT adecuados para el uso en los métodos descritos en la presente se conjugan o se enlazan o de manera covalente con un grupo dirigido que incluye uno o más restos de N-acetil-galactosamina, mediante lo cual se forma la sustancia farmacológica de iARN de AAT descrita en la Tabla 2. En algunas modalidades, los métodos descritos en la presente incluyen la administración de la sustancia farmacológica de iARN de AAT descrita en la Tabla 2. La sustancia farmacológica de iARN de AAT descrita en la Tabla 2 incluye el agente de iARN de AAT que se muestra en la Tabla 1A (cadena no codificante) y la Tabla 1B (cadena codificante). Los restos de N-acetil-galactosamina facilitan el direccionamiento del agente de iARN de AAT a los receptores de asialoglucoproteína (ASGPr) presentes fácilmente en la superficie de los hepatocitos, lo que conduce a la internalización del agente de iARN de AAT mediante endocitosis u otros

medios.

[0039] Los agentes de iARN de AAT que pueden ser adecuados para el uso en los métodos descritos en la presente incluyen una cadena no codificante que tiene una región de complementariedad con al menos una parte de un ARNm de AAT. Los agentes de iARN de AAT y las sustancias farmacológicas de iARN de AAT adecuadas para el uso en los métodos descritos se describen en la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 2018/132432 (solicitud de patente n.º PCT/US2018/013102), que tal como se indicó anteriormente se incorpora en su totalidad a la presente mediante referencia.

[0040] Tal como se usan en la presente, las expresiones «secuencia» y «secuencia de nucleótidos» significan una sucesión o un orden de nucleobases o nucleótidos, descritos con una sucesión de letras mediante nomenclatura convencional. Tal como se usan en la presente, las expresiones «nucleobase» y «nucleótido» tienen el mismo significado que se entiende comúnmente en la técnica.

[0041] Tal como se usa en la presente, el término «complementario», cuando se usa para describir una primera secuencia de nucleótidos (p. ej., una cadena no codificante de agente de iARN) en relación con una segunda secuencia de nucleótidos (p. ej., una cadena codificante del agente de iARN o secuencia de ARNm seleccionada como diana), hace referencia a la capacidad de un oligonucleótido que incluye la primera secuencia de nucleótidos de hibridarse (formar enlaces de hidrógeno de pares de bases en condiciones fisiológicas de mamíferos (o condiciones adecuadas) y formar un dúplex o una estructura de doble hélice en determinadas condiciones convencionales con un oligonucleótido que incluye la segunda secuencia de nucleótidos. El experto en la técnica podrá seleccionar el conjunto de condiciones más adecuado para una prueba de hibridación. Las secuencias complementarias incluyen pares de bases de Watson-Crick o pares de bases que no son de Watson-Crick e incluyen nucleótidos naturales o modificados o imitadores de nucleótidos, al menos en la medida en que se cumplan los requisitos de hibridación anteriores. La identidad o complementariedad de las secuencias es independiente de la modificación. Por ejemplo, a y Af, tal como se definen en la presente, son complementarios a U (o T) e idénticos a A a los efectos de determinar la identidad o complementariedad.

[0042] Tal como se usan en la presente, «perfectamente complementario/a» o «totalmente complementario/a» significa que todas (100 %) las bases en una secuencia contigua de un primer oligonucleótido se hibridarán con la misma cantidad de nucleótidos en una secuencia contigua de un segundo oligonucleótido. La secuencia contigua puede comprender la totalidad o parte de una primera o segunda secuencia de nucleótidos.

[0043] Tal como se usa en la presente, «parcialmente complementario/a» significa que, en un par hibridado de secuencias de nucleótidos, al menos el 70 %, pero no la totalidad, de las bases en una secuencia contigua de un primer oligonucleótido se hibridarán con la misma cantidad de bases en una secuencia contigua de un segundo polinucleótido.

[0044] Tal como se usa en la presente, «esencialmente complementario/a» significa que, en un par hibridado de secuencias de nucleótidos, al menos el 85 %, pero no la totalidad, de las bases en una secuencia contigua de un primer oligonucleótido se hibridarán con la misma cantidad de bases en una secuencia contigua de un segundo polinucleótido. Las expresiones «complementario/a», «totalmente complementario/a», «parcialmente complementario/a» y «esencialmente complementario/a» en la presente se usan con respecto a la coincidencia de nucleótidos entre la cadena codificante y la cadena no codificante de un agente de iARN, o entre la cadena no codificante de un agente de iARN y una secuencia de un ARNm de AAT.

[0045] Tal como se usa en la presente, la expresión «esencialmente idéntico/a» o «identidad esencial» aplicada a la secuencia de ácido nucleico significa que una secuencia de ácido nucleico comprende una secuencia que tiene al menos alrededor de 85 % de identidad de secuencia o más, p. ej., al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 99 % de identidad, en comparación con una secuencia de referencia. El porcentaje de identidad de secuencia se determina mediante la comparación de dos secuencias alineadas de manera óptima en un intervalo de comparación. El porcentaje se calcula mediante la determinación de la cantidad de posiciones en las que aparece la base de ácido nucleico idéntica en ambas secuencias para proporcionar la cantidad de posiciones coincidentes, la división de la cantidad de posiciones coincidentes entre la cantidad total de posiciones en el intervalo de comparación y la multiplicación del resultado por 100 para proporcionar el porcentaje de identidad de secuencia. Las invenciones descritas en la presente abarcan secuencias de nucleótidos esencialmente idénticas a las descritas en la presente.

Nucleótidos modificados y enlaces entre nucleósidos modificados

[0046] Los agentes de iARN de AAT descritos en la presente pueden estar compuestos por nucleótidos modificados, que pueden conservar la actividad del agente de iARN y al mismo tiempo aumentar la estabilidad del suero, así como minimizar la posibilidad de activar la actividad del interferón en los seres humanos. Tal como se usa en la presente, un «nucleótido modificado» es un nucleótido distinto de un ribonucleótido (nucleótido de 2'-hidroxilo). En algunas modalidades, al menos el 50 % (p. ej., al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o el 100 %) de los nucleótidos son nucleótidos modificados. Tal como se usan en la presente, los nucleótidos modificados incluyen cualquier nucleótido modificado conocido en la técnica, lo cual incluye, de modo no taxativo, desoxirribonucleótidos, imitadores de nucleótidos, nucleótidos con modificaciones en 2', nucleótidos invertidos, nucleótidos que comprenden nucleobases con modificaciones, nucleótidos con puentes, ácidos nucleicos peptídicos

(PNA, por sus siglas en inglés), imitadores de 2',3'-seco nucleótidos (análogos de nucleobase con desbloqueo), nucleótidos bloqueados, nucleótidos de 3'-O-metoxi (con enlaces entre nucleósidos 2'), nucleótidos de 2'-F-arabino, nucleótidos de 5'-Me, 2'-fluoro, nucleótidos de morfolino, nucleótidos que contienen fosfonato de vinilo y nucleótidos que contienen fosfonato de ciclopropilo. En algunas modalidades, los nucleótidos modificados de un agente de iARN de AAT son nucleótidos con modificaciones en 2' (es decir, un nucleótido con un grupo distinto de un grupo hidroxilo en la posición 2' del anillo de azúcar de cinco miembros). Los nucleótidos con modificaciones en 2' incluyen, de modo no taxativo, nucleótidos de 2'-O-metilo, nucleótidos de 2'-desoxi-2'-fluoro (comúnmente denominados simplemente nucleótidos de 2'-fluoro), nucleótidos de 2'-desoxi, nucleótidos de 2'-metoxietilo (2'-O-2-metoxietilo), nucleótidos de 2'-amino y nucleótidos de 2'-alquilo. Se conocen en la técnica nucleótidos con modificaciones en 2' adicionales. No es necesario que todos los nucleótidos de un agente de iARN determinado se modifiquen de manera uniforme. Además, se puede incorporar más de una modificación en un solo agente de iARN de AAT o incluso en un solo nucleótido de este. Las cadenas codificantes del agente de iARN de AAT pueden sintetizarse y/o modificarse mediante métodos conocidos en la técnica. La modificación en un nucleótido es independiente de la modificación en otro nucleótido.

[0047] En algunas modalidades, se puede modificar la nucleobase (a la que a menudo se hace referencia simplemente como la «base»). Tal como se usa comúnmente en la técnica, las nucleobases naturales incluyen las bases de purina primarias adenina y guanina, y las bases de pirimidina primarias citosina, timina y uracilo. Una nucleobase puede modificarse para incluir, de modo no taxativo, bases universales, bases hidrófobas, bases promiscuas, bases con expansión de tamaño y bases fluoradas. (Véase, p. ej., *Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine*, Herdewijn, P. ed. Wiley-VCH, 2008). La síntesis de esas nucleobases modificadas (incluidos los compuestos de fosforamida que incluyen nucleobases modificadas) es conocida en la técnica.

[0048] Las nucleobases modificadas incluyen, por ejemplo, pirimidinas con sustitución en 5, 6-azapirimidinas y purinas con sustituciones N-2, N-6 y O-6 (p. ej., 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo o 5-propinilcitosina), 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetil citosina, inosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, derivados de 6-alquilo (p. ej., 6-metilo, 6-etilo, 6-isopropilo o 6-n-butilo) de adenina y guanina, 2-alquilo (p. ej., 2-metilo, 2-etilo, 2-isopropilo o 2-n-butilo) y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina, 2-tiociosina, 5-halouracilo, citosina, 5-propinil uracilo, 5-propinil citosina, 6-azo uracilo, 6-azo citosina, 6-azo timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 8-halo, 8-amino, 8-sulfhidrido, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo y otras adeninas y guaninas con sustituciones en 8, 5-halo (p. ej., 5-bromo), 5-trifluorometilo y otros uracilos y citosinas con sustituciones en 5, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-desazaguanina, 7-desazaadenina, 3-desazaguanina y 3-desazaadenina.

[0049] En algunas modalidades, todos o esencialmente todos los nucleótidos de un agente de iARN de AAT son nucleótidos modificados. Tal como se usa en la presente, un agente de iARN en el que esencialmente todos los nucleótidos presentes son nucleótidos modificados es un agente de iARN en el que cuatro o menos (es decir, 0, 1, 2, 3 o 4) nucleótidos tanto en la cadena codificante como en la cadena no codificante son ribonucleótidos (es decir, no están modificados). Tal como se usa en la presente, una cadena codificante en la que sustancialmente todos los nucleótidos presentes son nucleótidos modificados es una cadena codificante en la que dos o menos (es decir, 0, 1 o 2) nucleótidos son ribonucleótidos. Tal como se usa en la presente, una cadena no codificante en la que sustancialmente todos los nucleótidos presentes son nucleótidos modificados es una cadena no codificante en la que dos o menos (es decir, 0, 1 o 2) nucleótidos son ribonucleótidos.

[0050] En algunas modalidades, uno o más nucleótidos de un agente de iARN de AAT están enlazados mediante enlaces o estructuras principales no convencionales (es decir, enlaces o estructuras principales entre nucleósidos con modificaciones). Los enlaces o las cadenas principales entre nucleósidos con modificaciones incluyen, de modo no taxativo, grupos fosforotioato, fosforotioatos quirales, tiofosfatos, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquil-fosfotriésteres, alquilfosfonatos (p. ej., metilfosfonatos o 3'-alquilenfosfonatos), fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos (p. ej., 3'-amino fosforamidato, aminoalquilfosforamidatos o tionofosforamidatos), tionoalquil-fosfonatos, tionoalquilfosfotriésteres, enlaces morfolino, boranofosfatos con enlaces 3'-5' normales, análogos con enlaces 2'-5' de boranofosfatos, o boranofosfatos con polaridad invertida donde los pares adyacentes de unidades de nucleósidos están enlazados de 3'-5' a 5'-3' o de 2'-5' a 5'-2'. En algunas modalidades, un enlace o una estructura principal entre nucleósidos con modificaciones carece de un átomo de fósforo. Los enlaces entre nucleósidos modificados que carecen de un átomo de fósforo incluyen, de modo no taxativo, enlaces entre azúcares alquilo o cicloalquilo de cadena corta, enlaces entre azúcares alquilo o cicloalquilo y de heteroátomos mixtos, o uno o más enlaces entre azúcares heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta. En algunas modalidades, las estructuras principales entre nucleósidos modificadas incluyen, de modo no taxativo, estructuras principales de siloxano, estructuras principales de sulfuro, estructuras principales de sulfóxido, estructuras principales de sulfonas, estructuras principales de formacetilo y tioformacetilo, estructuras principales de metileno formacetilo y tioformacetilo, estructuras principales que contienen alqueno, estructuras principales de sulfamato, estructuras principales de metilenimino y metilenhidraxino, estructuras principales de sulfonato y sulfonamida, estructuras principales de amida y otras estructuras principales con componentes mixtos de N, O, S y CH₂.

[0051] En algunas modalidades, una cadena codificante de un agente de iARN de AAT puede contener 1, 2, 3, 4, 5 o 6 enlaces fosforotioato, una cadena no codificante de un agente de iARN de AAT

puede contener 1, 2, 3, 4, 5 o 6 enlaces fosforotioato, o tanto la cadena codificante como la cadena no codificante pueden contener de manera independiente 1, 2, 3, 4, 5 o 6 enlaces fosforotioato. En algunas modalidades, una cadena codificante de un agente de iARN de AAT puede contener 1, 2, 3 o 4 enlaces fosforotioato, una cadena no codificante de un agente de iARN de AAT puede contener 1, 2, 3 o 4 enlaces fosforotioato, o tanto la cadena codificante como la cadena no codificante pueden contener de manera independiente, 1, 2, 3 o 4 enlaces fosforotioato.

[0052] En algunas modalidades, una cadena codificante del agente de iARN de AAT contiene al menos dos enlaces entre nucleósidos fosforotioato. En algunas modalidades, los dos o más enlaces entre nucleósidos fosforotioato están entre los nucleótidos en las posiciones 1-3 desde el extremo 3' de la cadena codificante. En algunas modalidades, los dos o más enlaces entre nucleósidos fosforotioato están entre los nucleótidos en las posiciones 1-3, 2-4, 3-5, 4-6, 4-5 o 6-8 desde el extremo 5' de la cadena codificante. En algunas modalidades, los enlaces entre nucleósidos de fosforotioato se usan para enlazar los nucleótidos de los extremos en la cadena codificante con los residuos de protección presentes en el extremo 5', el extremo 3' o ambos extremos 5' y 3' de la secuencia de nucleótidos. En algunas modalidades, los enlaces entre nucleósidos de fosforotioato se usan para enlazar un grupo dirigido a la cadena codificante.

[0053] En algunas modalidades, una cadena codificante del agente de iARN de AAT contiene tres o cuatro enlaces entre nucleósidos fosforotioato. En algunas modalidades, una cadena codificante del agente de iARN de AAT contiene tres enlaces entre nucleósidos fosforotioato. En algunas modalidades, los tres enlaces entre nucleósidos fosforotioato están entre los nucleótidos en las posiciones 1-3 desde el extremo 5' de la cadena no codificante y entre los nucleótidos en las posiciones 19-21, 20-22, 21-23, 22-24, 23-25 o 24-26 desde el extremo 5'. En algunas modalidades, un agente de iARN de AAT contiene al menos dos enlaces entre nucleósidos fosforotioato en la cadena codificante y tres o cuatro enlaces entre nucleósidos fosforotioato en la cadena no codificante.

[0054] En algunas modalidades, un agente de iARN de AAT contiene uno o más nucleótidos modificados y uno o más enlaces entre nucleósidos modificados. En algunas modalidades, un nucleósido modificado en 2' se combina con un enlace entre nucleósidos modificado.

Residuos o restos de protección

[0055] En algunas modalidades, la cadena codificante puede incluir uno o más residuos o restos de protección, a los que a veces se hace referencia en la técnica como un «casquete», un «casquete de extremo» o un «residuo de protección». Tal como se usa en la presente, un «residuo de protección» es un compuesto no nucleotídico u otro resto que puede incorporarse en uno o más extremos de una

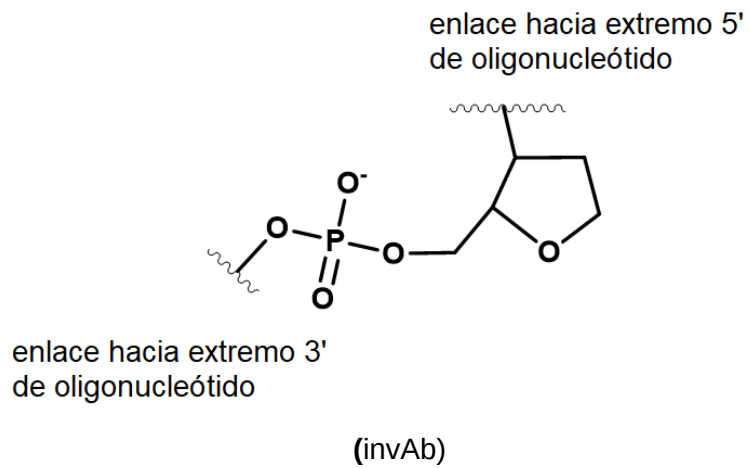
secuencia de nucleótidos de un agente de iARN descrito en la presente. Un residuo de protección puede proporcionar al agente de iARN, en algunos casos, determinadas propiedades beneficiosas, tales como, por ejemplo, la protección contra la degradación de las exonucleasas. En algunas modalidades, los residuos abásicos invertidos (invAb) (también denominados en la técnica «sitios abásicos invertidos») se añaden como residuos de protección (véase la Tabla A). (Véase, p ej., F. Czauderna, *Nucleic Acids Res.*, 2003, 31(11), 2705-16). Los residuos de protección son conocidos en términos generales en la técnica e incluyen, por ejemplo, residuos abásicos invertidos, así como cadenas de carbono tales como un C_3H_7 de extremo (propilo), C_6H_{13} (hexilo) o grupos $C_{12}H_{25}$ (dodecilo). En algunas modalidades, un residuo de protección está presente en el extremo 5', el extremo 3' o los extremos 5' y 3' de la cadena codificante. En algunas modalidades, el extremo 5' y/o el extremo 3' de la cadena codificante pueden incluir más de un resto de desoxirribosa de carácter abásico invertido como residuo de protección.

[0056] En algunas modalidades, se añaden uno o más residuos abásicos invertidos (invAb) al extremo 3' de la cadena codificante. En algunas modalidades, se añaden uno o más residuos abásicos invertidos (invAb) al extremo 5' de la cadena codificante. En algunas modalidades, se insertan uno o más residuos abásicos invertidos o sitios abásicos invertidos entre el ligando de direccionamiento y la secuencia de nucleótidos de la cadena codificante del agente de iARN. En algunas modalidades, la inclusión de uno o más residuos abásicos invertidos o sitios abásicos invertidos en el extremo o los extremos de la cadena codificante de un agente de iARN, o cerca de estos, permite una mejora en la actividad u otras propiedades deseadas de un agente de iARN.

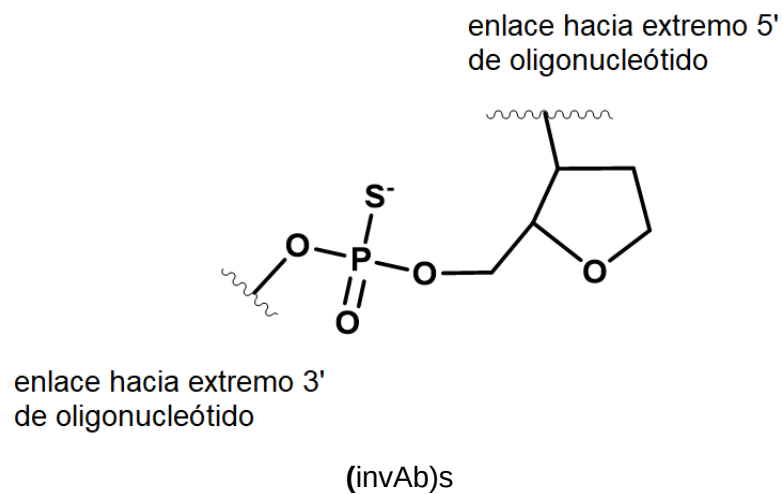
[0057] En algunas modalidades, se añaden uno o más residuos abásicos invertidos (invAb) al extremo 5' de la cadena codificante. En algunas modalidades, se puede insertar uno o más residuos abásicos invertidos entre el ligando de direccionamiento y la secuencia de nucleótidos de la cadena codificante del agente de iARN. Los residuos abásicos invertidos pueden enlazarse a través de enlaces entre nucleósidos fosfato, fosforotioato (p. ej., que se muestran en la presente como (invAb)s)) o de otro tipo. Las estructuras químicas de los residuos de desoxirribosa de carácter abásico invertido se muestran en la Tabla A a continuación, así como en las estructuras químicas mostradas en las Figuras 1A a 1E y las Figuras 2A a 2E.

[0058] Tabla A. Estructuras químicas abásicas invertidas (de desoxirribosa)

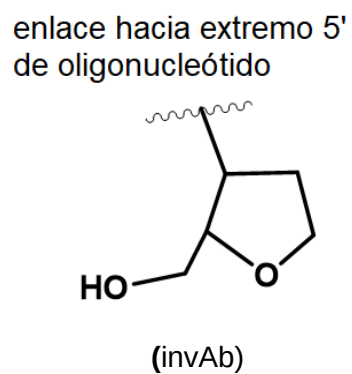
Cuando se ubica internamente en un oligonucleótido:



Cuando se ubica internamente en un oligonucleótido:



Cuando se ubica en el extremo 3' del oligonucleótido:



Restos y grupos dirigidos

[0059] Un agente de iARN de AAT puede conjugarse con uno o más grupos no nucleotídicos que incluyen, de modo no taxativo, un resto dirigido o un grupo dirigido. Un resto dirigido o grupo dirigido puede mejorar el direccionamiento o suministro del agente de iARN. En la técnica se conocen ejemplos de restos dirigidos y grupos dirigidos. En la Tabla B se proporcionan ejemplos específicos del grupo dirigido (NAG37)s utilizado en la sustancia farmacológica de iARN de AAT descrita en la Tabla 2 en la presente, que incluye tres restos dirigidos a la N-acetil-galactosamina. El resto dirigido o grupo dirigido puede enlazarse de manera covalente al extremo 3' y/o 5' de la cadena codificante y/o la cadena no codificante. En algunas modalidades, un agente de iARN de AAT contiene un grupo dirigido enlazado al extremo 3' y/o 5' de la cadena codificante. En algunas modalidades, un grupo dirigido se enlaza al extremo 5' de una cadena codificante del agente de iARN de AAT. En algunas modalidades, el grupo dirigido comprende, consiste esencialmente en o consiste en la estructura (NAG37)s, y está enlazado al extremo 5' de una cadena codificante del agente de iARN de AAT. Un grupo dirigido puede enlazarse directa o indirectamente al agente de iARN a través de un enlazador/grupo de enlace. En algunas modalidades, un grupo dirigido se enlaza al agente de iARN a través de un enlace o enlazador lábil, escindible o reversible. En algunas modalidades, un grupo dirigido se enlaza a un residuo abásico invertido en el extremo 5' de la cadena codificante.

[0060] Los grupos dirigidos o restos dirigidos pueden mejorar las propiedades farmacocinéticas o de biodistribución de un conjugado o agente de iARN al que estén unidos para mejorar la distribución con especificidad celular y la absorción con especificidad celular del conjugado o agente de iARN. En algunas modalidades, un grupo dirigido mejora la endocitosis del agente de iARN. Un grupo dirigido puede ser monovalente, divalente, trivalente, tetravalente o tener una mayor valencia para la diana a la que se dirige. Los grupos dirigidos representativos incluyen, de modo no taxativo, compuestos con afinidad con respecto a moléculas de la superficie celular, ligandos de receptores celulares, haptenos, anticuerpos, anticuerpos monoclonales, fragmentos de anticuerpos e imitadores de anticuerpos con afinidad con respecto a moléculas de la superficie celular.

[0061] En algunas modalidades, un grupo de direccionamiento comprende un ligando del receptor de asialoglucoproteína. En algunas modalidades, un ligando del receptor de asialoglucoproteína incluye o consiste en uno o más derivados de galactosa. Tal como se usa en la presente, la expresión «derivado de galactosa» incluye tanto la galactosa como los derivados de galactosa con afinidad con respecto al receptor de asialoglucoproteínas que es igual o mayor que la de la galactosa. Los derivados de galactosa incluyen, de modo no taxativo: galactosa, galactosamina, N-formilgalactosamina, N-acetilgalactosamina, N-propionil-galactosamina, N-n-butanoil-galactosamina y N-iso-butanoil-galactosamina.

(véase, por ejemplo: S. T. Iobst y K. Drickamer, J.B.C., 1996, 271, 6686). En la técnica se conocen derivados de galactosa y conjuntos de derivados de galactosa que son útiles para el direccionamiento *in vivo* de oligonucleótidos y otras moléculas hacia el hígado (véase, por ejemplo, Baenziger y Fiete, 1980, Cell, 22, 611-620; Connolly et ál., 1982, J. Biol. Chem., 257, 939-945).

5 **[0062]** Se han usado derivados de galactosa para dirigir moléculas a hepatocitos *in vivo* a través de su unión al receptor de asialoglucoproteínas expresado en la superficie de los hepatocitos. La unión de los ligandos del receptor de asialoglucoproteínas al o a los receptores de asialoglucoproteínas facilita el direccionamiento con especificidad celular a los hepatocitos y la endocitosis de la molécula en los hepatocitos. Los ligandos de receptores de asialoglucoproteínas pueden ser monoméricos (p. ej., tener
10 un solo derivado de galactosa) o multiméricos (p. ej., tener múltiples derivados de galactosa). El derivado de galactosa o el «conjunto» de derivados de galactosa puede unirse al extremo 3' o 5' de la cadena codificante o no codificante del agente de iARN mediante métodos conocidos en la técnica.

[0063] En algunas modalidades, un grupo dirigido comprende un conjunto de derivados de galactosa. Tal como se usa en la presente, un conjunto de derivados de galactosa comprende una molécula con
15 entre dos y cuatro derivados de galactosa de extremo. Un derivado de galactosa de extremo se une a una molécula a través de su carbono C-1. En algunas modalidades, el conjunto de derivados de galactosa es un trímero de derivados de galactosa (también denominado «derivado de galactosa triantenario» o «derivado de galactosa trivalente»). En algunas modalidades, el conjunto de derivados de galactosa comprende N-acetil-galactosaminas. En algunas modalidades, el conjunto de derivados de
20 galactosa comprende tres N-acetil-galactosaminas. En algunas modalidades, el conjunto de derivados de galactosa es un tetrámero de derivados de galactosa (también denominado «derivado de galactosa tetraantenario» o «derivado de galactosa tetravalente»). En algunas modalidades, el conjunto de derivados de galactosa comprende cuatro N-acetil-galactosaminas.

[0064] Tal como se usa en la presente, un trímero derivado de galactosa contiene tres derivados de
25 galactosa, cada uno enlazado a un punto de ramificación central. Tal como se usa en la presente, un tetrámero derivado de galactosa contiene cuatro derivados de galactosa, cada uno enlazado a un punto de ramificación central. Los derivados de galactosa pueden unirse al punto de ramificación central a través de los carbonos C-1 de los sacáridos. En algunas modalidades, los derivados de galactosa se enlazan al punto de ramificación mediante enlazadores o separadores. En algunas modalidades, el
30 enlazador o separador es un separador hidrófilo flexible, tal como un grupo PEG (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5,885,968; Biessen et ál. J. Med. Chem. 1995, tomo 39, pág. 1538-1546). El punto de ramificación puede ser cualquier molécula pequeña que permite la unión de tres derivados de galactosa y permite la unión del punto de ramificación al agente de iARN. Un ejemplo de grupo de puntos de ramificación es una di-lisina o un di-glutamato. La unión del punto de ramificación al agente

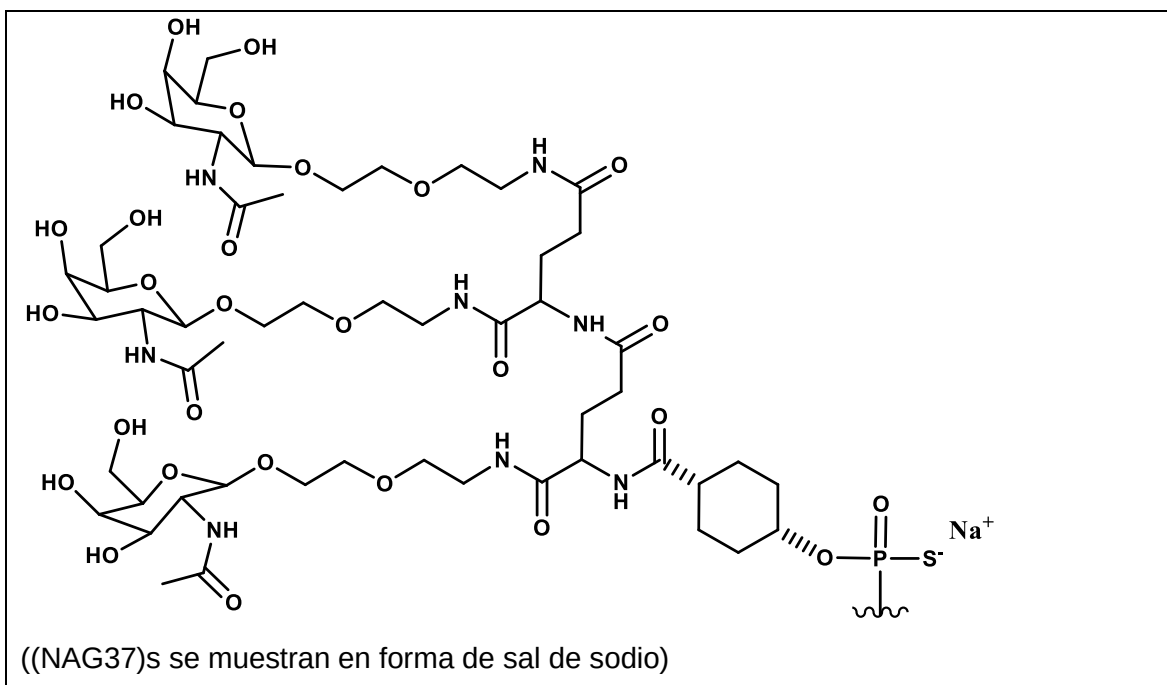
de iARN puede ocurrir a través de un enlazador o separador. En algunas modalidades, el enlazador o separador comprende un separador hidrófilo flexible, tal como, de modo no taxativo, un separador de PEG. En algunas modalidades, el enlazador comprende un enlazador rígido, tal como un grupo cíclico. En algunas modalidades, un derivado de galactosa comprende o consiste en N-acetil-galactosamina.

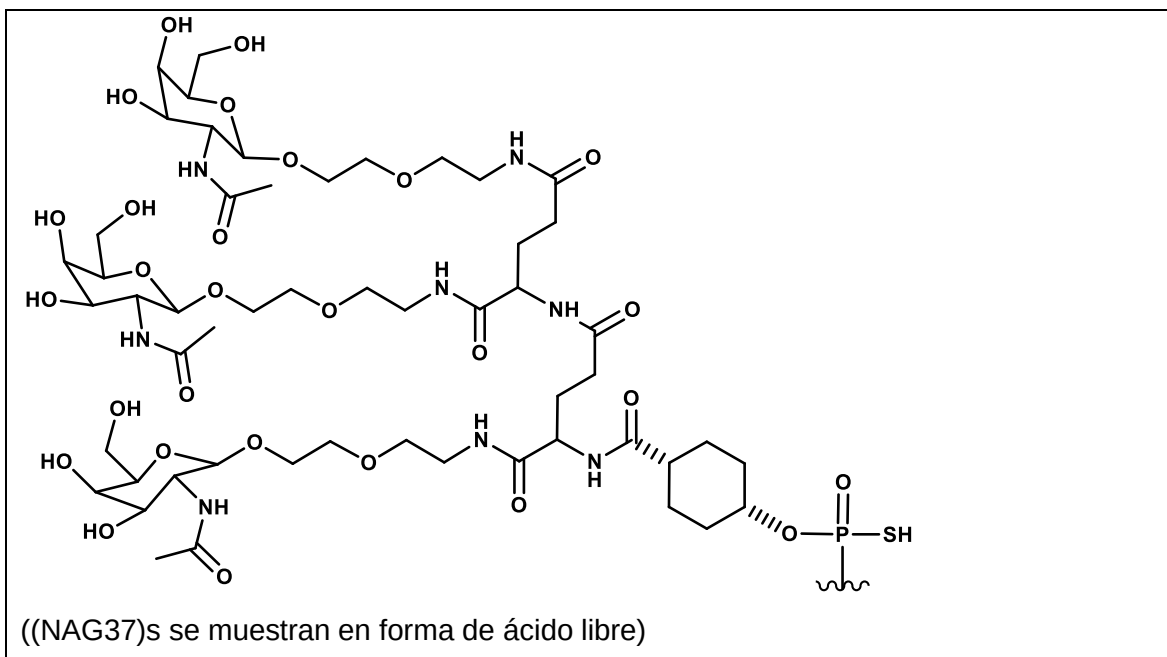
- 5 En algunas modalidades, el conjunto de derivados de galactosa está compuesto por un tetrámero de derivados de galactosa, que puede ser, por ejemplo, un tetrámero de N-acetil-galactosamina.

[0065] La preparación de grupos dirigidos, tales como conjuntos de derivados de galactosa que incluyen N-acetil-galactosamina, se describe, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 2018/044350 (solicitud de patente n.º PCT/US2017/021147) y publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 2017/156012 (solicitud de patente n.º PCT/US2017/021175),
10 cuyo contenido se incorpora en ambos casos en su totalidad a la presente mediante referencia.

[0066] Por ejemplo, el ligando de direccionamiento conjugado con el agente de iARN de AAT descrito en las Tablas 1A y 1B tiene la estructura química de (NAG37)s, tal como se muestra en la Tabla B que sigue.

- 15 **[0067] Tabla B.** Estructura química de (NAG37)s.





Agentes de iARN de AAT y sustancia farmacológica de iARN de AAT (ADS-001)

[0068] En algunas modalidades, el agente de iARN de AAT usado en los métodos descritos en la presente tiene las secuencias de nucleótidos de la sustancia farmacológica de iARN de AAT (ADS-001) que se muestran en la Tabla 2. Las secuencias de nucleótidos del agente de iARN de AAT encontradas en la sustancia farmacológica de iARN de AAT incluyen una secuencia de nucleótidos de cadena no codificante tal como se indica en la Tabla 1A que sigue, y una secuencia de nucleótidos de cadena codificante tal como se indica en la Tabla 1B que sigue.

[0069] Tabla 1A. Secuencia de cadena no codificante del agente de iARN de AAT

SEQ ID NO.	Secuencia no codificante (modificada) (5' → 3')	SEQ ID NO.	Secuencia de base subyacente (5' → 3')
2	usGfsuUfaAfacaugCfcUfaAfaCfgCfsu	3	UGUUAACAUGCCUAAACGCU

[0070] Tabla 1B. Secuencia de nucleótidos de la cadena codificante del agente de iARN de AAT (se muestra como la versión modificada sin residuos abásicos invertidos o grupo dirigido NAG presente en la sustancia farmacológica de iARN de AAT)

SEQ ID NO.	Secuencia codificante (modificada) (5' → 3')	SEQ ID NO.	Secuencia de base subyacente (5' → 3')
4	agcguuuuGfGfCfauguuuuaca	5	AGCGUUUAGGCAUGUUUAACA

5 **[0071]** Tal como se usan en las Tablas 1A, 1B y 2 de la presente, las siguientes notaciones se usan para indicar nucleótidos modificados, grupos dirigidos y grupos de enlace: A, G, C y U representan adenosina, citidina, guanosina o uridina; a, c, g y u representan 2'-O-metil adenosina, citidina, guanosina o uridina, respectivamente; Af, Cf, Gf y Uf representan 2'-fluoro adenosina, citidina, guanosina o uridina, respectivamente; s representa un enlace fosforotioato; (invAb) representa un residuo de desoxirribosa de carácter abásico invertido (véase la Tabla A); y (NAG37)s representa la estructura mostrada en la Tabla B anterior.

15 **[0072]** Tal como comprenderá fácilmente el experto en la materia, a menos que la secuencia indique lo contrario (tal como, por ejemplo, mediante un enlace fosforotioato «s»), cuando están presentes en una cadena, los monómeros se enlazan entre sí mediante enlaces 5'-3'-fosfodiéster. Tal como comprenderá claramente el experto en la materia, la inclusión de un enlace fosforotioato tal como se muestra en las secuencias de nucleótidos modificadas descritas en la presente reemplaza el enlace fosfodiéster presente normalmente en los oligonucleótidos. Además, el experto en la técnica comprenderá fácilmente que el nucleótido de extremo en el extremo 3' de una secuencia de oligonucleótidos determinada tendría normalmente un grupo hidroxilo (-OH) en la posición 3' respectiva del monómero determinado en lugar de un resto fosfato *ex vivo*. Además, para las modalidades descritas en la presente, cuando se visualiza la cadena respectiva 5' → 3', los residuos abásicos invertidos se insertan de forma tal que la posición 3' de la desoxirribosa esté enlazada en el extremo 3' del monómero precedente en la cadena respectiva. Además, como el experto en la materia comprenderá y reconocerá fácilmente que, mientras que las estructuras químicas de fosforotioato representadas en la presente normalmente muestran el anión en el átomo de azufre, las invenciones descritas en la presente abarcan todos los tautómeros de fosforotioato (p. ej., donde el átomo de azufre tiene un doble enlace y el anión está en un átomo de oxígeno). A menos que se indique expresamente lo contrario en la presente, esos conocimientos del experto en la técnica se usan cuando se describen los agentes de iARN de AAT y las composiciones que incluyen agentes de iARN de AAT descritos en la presente.

30 **[0073]** Cada cadena codificante y/o cadena no codificante puede tener cualquier grupo dirigido o grupo

de enlace enumerado anteriormente, así como otros grupos de direccionamiento o de enlace, conjugados con el extremo 5' y/o 3' de la secuencia.

[0074] La secuencia de la cadena no codificante del agente de iARN de AAT está diseñada para dirigirse a las transcripciones de ARNm de genes de AAT tanto normales como mutantes, mediante lo cual se silencia la traducción de proteínas Z-AAT mutantes a través de un mecanismo de interferencia de ARN para sujetos humanos con AATD.

[0075] En algunas modalidades, los métodos descritos en la presente usan la sustancia farmacológica de iARN de AAT que se indica en la Tabla 2 que sigue:

[0076] **Tabla 2.** Sustancia farmacológica de iARN de AAT (ADS-001)

Cadenas codificantes y no codificantes (Las cadenas codificante y no codificante se hibridan para formar un dúplex):		
Cadena codificante (secuencia modificada) (5' → 3'):	(NAG37)s(invAb)sagcguuuuGfGfCfauguuuuacac(invAb)	(SEQ ID NO:6)
Cadena no codificante (secuencia modificada) (5' → 3'):	usGfsuUfaAfacaugCfcUfaAfaCfgCfsu	(SEQ ID NO:2)
Fórmula química:	C493H610F11N163Na43O312P43S6 (forma Na+) C493H653F11N163O312P43S6 (forma H+)	
Peso molecular:	16532,9 Da (forma Na+) 15587,6 Da (forma H+)	
Apariencia física:	Polvo blanco a blanquecino	

[0077] En la Figura 3 se muestra una representación esquemática de la sustancia farmacológica de iARN de AAT (ADS-001), y las representaciones de las estructuras químicas completas se muestran en las Figuras 1A a 1E (forma de sal de sodio) y las Figuras 2A a 2E (forma de ácido libre). En algunas modalidades, la sustancia farmacológica de iARN de AAT se prepara o proporciona como una sal, una sal mixta o un ácido libre. En modalidades preferidas, la forma es una sal de sodio.

Formulaciones y composiciones farmacéuticas

[0078] Los agentes de iARN de AAT adecuados para el uso en los métodos descritos en la presente pueden prepararse como formulaciones o composiciones farmacéuticas para la administración a sujetos

humanos. Las composiciones farmacéuticas pueden usarse para tratar a un sujeto con una enfermedad o un trastorno que se beneficie a partir de la inhibición de la expresión de ARNm de AAT o la reducción del nivel de proteína AAT, por ejemplo, los sujetos humanos con AATD. En algunas modalidades, los métodos incluyen administrar un agente de iARN de AAT enlazado a un grupo dirigido o ligando dirigido tal como se describe en la presente, a un sujeto que necesite tratamiento. En algunas modalidades, se añaden uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables (incluidos vehículos, portadores, diluyentes y/o polímeros de suministro) a las composiciones farmacéuticas que incluyen un agente de iARN de AAT, mediante lo cual se forma una formulación farmacéutica adecuada para el suministro *in vivo* a un sujeto humano.

10 **[0079]** Las composiciones farmacéuticas que incluyen un agente de iARN de AAT, cuando se administran a un sujeto humano mediante los métodos descritos en la presente, disminuyen el nivel de ARNm de AAT en el sujeto.

[0080] En algunas modalidades, las composiciones farmacéuticas descritas que incluyen un agente de iARN de AAT se usan para tratar o manejar presentaciones clínicas en un sujeto con AATD, tales como hepatitis crónica, cirrosis, aumento del riesgo de carcinoma hepatocelular, transaminitis, colestasis, fibrosis e incluso insuficiencia hepática fulminante. En algunas modalidades, se administra una cantidad con eficacia terapéutica o profiláctica de una o más de las composiciones farmacéuticas a un sujeto que necesita ese tratamiento. En algunas modalidades, la administración de cualquiera de los agentes de iARN de AAT descritos puede usarse para disminuir la cantidad, gravedad y/o frecuencia de los síntomas de una enfermedad en un sujeto.

[0081] Las composiciones farmacéuticas descritas que incluyen un agente de iARN de AAT pueden usarse para tratar al menos un síntoma en un sujeto con una enfermedad o un trastorno que se beneficie a partir de la reducción o inhibición de la expresión de ARNm de AAT. En algunas modalidades, el sujeto recibe la administración de una cantidad con eficacia terapéutica de una o más composiciones farmacéuticas que incluyen un agente de iARN de AAT, mediante lo cual se trata el síntoma. En otras modalidades, al sujeto recibe la administración de una cantidad con eficacia profiláctica de uno o más agentes de iARN de AAT, mediante lo cual se previene el o los síntomas.

[0082] Los agentes de iARN de AAT descritos en la presente pueden administrarse mediante cualquier vía adecuada en una preparación adaptada de manera adecuada a la vía particular. Por lo tanto, las composiciones farmacéuticas descritas en la presente pueden administrarse mediante inyección, por ejemplo, por vía intravenosa o subcutánea. En algunas modalidades, las composiciones farmacéuticas descritas en la presente se administran mediante inyección subcutánea.

[0083] Tal como se usa en la presente, una composición farmacéutica o un medicamento incluye una cantidad con eficacia farmacológica de al menos un agente de iARN de AAT y uno o más excipientes

farmacéuticamente aceptables. Los excipientes farmacéuticamente aceptables (excipientes) son sustancias distintas del ingrediente farmacéutico activo (API [por sus siglas en inglés], producto terapéutico, p. ej., agente de iARN de AAT) que se incluyen intencionalmente en el sistema de suministro de fármacos. Los excipientes no ejercen o no se pretende que ejerzan un efecto terapéutico en la dosis prevista. Los excipientes pueden actuar para a) ayudar en el procesamiento del sistema de suministro de fármacos durante la fabricación, b) proteger, respaldar o mejorar la estabilidad, biodisponibilidad o aceptabilidad del API por parte del paciente, c) ayudar en la identificación del producto y/o d) mejorar cualquier otro atributo de la seguridad general, la eficacia o el suministro de la API durante el almacenamiento o uso. Un excipiente farmacéuticamente aceptable puede ser o no una sustancia inerte.

[0084] Los excipientes pueden incluir, de modo no taxativo: potenciadores de la absorción, antiadherentes, agentes antiespumantes, antioxidantes, aglutinantes, agentes de amortiguación, portadores, agentes de recubrimiento, colorantes, potenciadores del suministro, polímeros de suministro, dextrano, dextrosa, diluyentes, desintegrantes, emulsionantes, extensores, rellenos, sabores, deslizantes, humectantes, lubricantes, aceites, polímeros, conservantes, solución salina, sales, solventes, azúcares, agentes de suspensión, matrices de liberación sostenida, endulzantes, agentes espesantes, agentes de tonicidad, vehículos, agentes repelentes de agua y agentes humectantes.

[0085] Las composiciones farmacéuticas adecuadas para el uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (cuando sean solubles en agua). Para la administración subcutánea o intravenosa, los portadores adecuados pueden incluir solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor® ELTM (BASF, Parsippany, NJ) o solución salina amortiguada con fosfato (PBS, por sus siglas en inglés). Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El portador puede ser un solvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido) y mezclas adecuadas de estos.

[0086] Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse mediante la incorporación del compuesto activo en la cantidad requerida en un solvente adecuado con uno, o una combinación, de los ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, tras lo cual sigue la esterilización mediante filtración. Por lo general, las dispersiones se preparan mediante la incorporación del compuesto activo en un vehículo estéril, que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente.

[0087] En algunas modalidades, una composición farmacéutica adecuada para el uso en los métodos descritos en la presente incluye los componentes identificados en la sustancia farmacológica de iARN de AAT formulada proporcionada en la Tabla 3, más adelante.

[0088] Los agentes de iARN de AAT pueden formularse en composiciones en forma de unidad de

dosificación para facilitar la administración y uniformidad de la dosificación. La forma de dosificación unitaria hace referencia a unidades físicamente individualizadas adecuadas como dosificaciones unitarias para el sujeto a tratar; donde cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo que se calcula que producirá el efecto terapéutico deseado junto con el portador farmacéutico requerido. En algunas modalidades, la unidad de dosificación es de entre alrededor de 5 mg y alrededor de 300 mg de la sustancia farmacológica de iARN de AAT. En algunas modalidades, la unidad de dosificación es de entre alrededor de 25 mg y alrededor de 200 mg de la sustancia farmacológica de iARN de AAT. En algunas modalidades, la unidad de dosificación es de entre alrededor de 100 mg y alrededor de 200 mg de la sustancia farmacológica de iARN de AAT. En algunas modalidades, la unidad de dosificación es de alrededor de 100 mg de la sustancia farmacológica de iARN de AAT. En algunas modalidades, la unidad de dosificación es de alrededor de 200 mg de la sustancia farmacológica de iARN de AAT.

[0089] Una composición farmacéutica puede contener otros componentes adicionales que se encuentran comúnmente en las composiciones farmacéuticas. Esos componentes adicionales incluyen, de modo no taxativo: antipruriginosos, astringentes, anestésicos locales o agentes antiinflamatorios (p. ej., antihistamínico, difenhidramina, etc.).

[0090] Tal como se usa en la presente, «cantidad con eficacia farmacológica», «cantidad con eficacia terapéutica» o simplemente «cantidad eficaz» hace referencia a la cantidad de un agente de iARN para producir un resultado farmacológico, terapéutico o preventivo.

[0091] Las formulaciones farmacéuticamente aceptables descritas pueden envasarse en kits, recipientes, paquetes o dispensadores. Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente pueden envasarse en jeringas o viales precargados.

Sustancia farmacológica de iARN de AAT formulada

[0092] En algunas modalidades, la sustancia farmacológica de iARN de AAT tal como se proporciona en la Tabla 2 (ADS-001) se formula con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables para formar una composición farmacéutica adecuada para la administración a un sujeto humano. En algunas modalidades, la sustancia farmacológica de iARN de AAT descrita en la Tabla 2 se formula a 230 mg/mL en un agente de amortiguación de fosfato de sodio acuoso (fosfato de sodio monobásico a 0,5 mM, fosfato de sodio dibásico a 0,5 mM), mediante lo cual se forma la sustancia farmacológica de iARN de AAT formulada (ADS-001-1) que se muestra en la Tabla 3:

[0093] **Tabla 3.** Composición de la sustancia farmacológica de iARN de AAT formulada, por cada 1,0 mL

Componente	Función	Calidad/Grado	Concentración
ADS-001	Ingrediente activo	Interno	230 mg
Fosfato de sodio monobásico, monohidrato	Agente de suspensión	USP, Ph. Eur.	0,061 mg
Fosfato de sodio dibásico, anhidro	Agente de suspensión	USP, Ph. Eur.	0,062 mg
Agua para inyección (WFI)	Vehículo	USP, Ph. Eur.	879,2 mg

[0094] La Sustancia farmacológica de iARN de AAT formulada de acuerdo con la Tabla 3 se prepara como una formulación estéril. En algunas modalidades, la sustancia farmacológica de iARN de AAT formulada se envasa en un recipiente, tal como un vial de vidrio. En algunas modalidades, la sustancia farmacológica de iARN de AAT formulada se envasa en un vial de vidrio con un volumen de llenado de alrededor de 1,1 mL, y se puede calcular el volumen deseado para la administración en función del nivel de dosis deseado que se vaya a administrar.

[0095] En algunas modalidades, la sustancia farmacológica de iARN de AAT formulada indicada en la Tabla 3 se administra a un sujeto humano mediante los métodos descritos en la presente.

Sujetos humanos con AATD y diagnóstico de AATD

[0096] Los métodos descritos en la presente incluyen el tratamiento de la deficiencia de alfa-1 antitripsina (AATD) en un sujeto humano que lo necesite, incluido el tratamiento de los síntomas y las enfermedades que provoca la AATD en el sujeto humano, mediante el uso de composiciones farmacéuticas que incluyen la sustancia farmacológica de iARN de AAT descrita en la Tabla 2. En algunas modalidades, el sujeto humano recibe un diagnóstico de AATD antes de la administración. Tal como se indica en la presente, la AATD es un trastorno genético provocado por mutaciones en la transcripción génica, lo cual da como resultado la traducción de una forma mutante de la proteína AAT, para lo cual algunas formas mutantes que son propensas a un plegamiento anormal conducen a una retención intracelular en los hepatocitos. Si bien se han identificado diversas mutaciones del gen *SERPINA1*, la forma más común y grave de la AATD, el genotipo PiZZ, es provocada por una sustitución de un solo par de bases. En sujetos con el genotipo PiZZ, los niveles en circulación de AAT a menudo se informan como menos del 15 % de los niveles en seres humanos normales. En muchos casos, a los

pacientes se les diagnostica inicialmente una EPOC, asma u otra enfermedad pulmonar sin identificar la causa subyacente. Con el tiempo, pueden desarrollarse enfermedades hepáticas tales como fibrosis y cirrosis debido a la retención intercelular de la proteína de plegamiento incorrecto («Z-AAT») y la incapacidad de secretar adecuadamente la proteína a partir de las células hepáticas. Los pacientes pediátricos suelen presentar síntomas clínicos de enfermedad hepática, que pueden incluir hepatitis crónica asintomática, retraso del crecimiento, mala alimentación o hepatomegalia y esplenomegalia. La AATD puede diagnosticarse y confirmarse mediante el genotipado convencional de muestras de sangre del sujeto.

10 Dosificación e inhibición de la expresión del gen de AAT

[0097] Por lo general, una cantidad eficaz de un agente de iARN de AAT se encontrará en el intervalo de alrededor de 0,1 a alrededor de 10 mg/kg de peso corporal/día, p. ej., de alrededor de 0,25 a alrededor de 5 mg/kg de peso corporal/día. En algunas modalidades, una cantidad eficaz de un agente de iARN de AAT se encontrará en el intervalo de alrededor de 0,5 a alrededor de 4 mg/kg de peso corporal por dosis. En algunas modalidades, la cantidad eficaz es una dosis fija. En algunas modalidades, una dosis fija de entre 5 mg y 300 mg de la sustancia farmacológica de iARN de AAT es una dosis eficaz. En algunas modalidades, una dosis fija de entre 25 mg y 200 mg de la sustancia farmacológica de iARN de AAT es una dosis eficaz. La cantidad administrada probablemente dependerá de variables tales como la edad general y el estado de salud general del paciente, la eficacia biológica relativa del compuesto suministrado, la formulación del fármaco, la presencia y los tipos de excipientes en la formulación y la vía de administración. En algunas modalidades, una dosis fija de alrededor de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260 o 280 mg a alrededor de 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280 o 300 mg es una dosis eficaz. En algunas modalidades, una dosis fija de alrededor de 25 mg, alrededor de 100 mg o alrededor de 200 mg es una dosis eficaz.

[0098] Además, se ha de comprender que la dosis inicial administrada puede, en algunos casos, aumentarse más allá del nivel superior anterior para alcanzar rápidamente el nivel en sangre o en tejido deseado, o la dosis inicial puede, en algunos casos, ser menor que la óptima. Por ejemplo, en algunas modalidades, se administra una dosis inicial de alrededor de 25 mg a alrededor de 200 mg de la sustancia farmacológica de iARN de AAT, seguida por una segunda dosis de alrededor de 25 a 200 mg de la sustancia farmacológica de iARN de AAT alrededor de 1 mes después, y posteriormente se administran dosis adicionales (un concepto similar a las «dosis de mantenimiento») una vez cada tres meses (es decir, una vez por trimestre).

[0099] Para el tratamiento de una enfermedad o para la formación de un medicamento o una composición para el tratamiento de una enfermedad, las composiciones farmacéuticas descritas en la presente que incluyen un agente de iARN de AAT pueden combinarse con un excipiente o con un segundo agente terapéutico o tratamiento que incluya, de modo no taxativo: un segundo u otro agente de iARN, un fármaco de molécula pequeña, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un péptido y/o un aptámero.

[0100] En algunas modalidades, el nivel de expresión génica y/o el nivel de ARNm de un gen de AAT en un sujeto al que se le administra un agente de iARN de AAT descrito se reduce en al menos alrededor de 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más del 99 % con respecto al sujeto antes de la administración del agente de iARN de AAT o con respecto a un sujeto que no recibe el agente de iARN de AAT. El nivel de expresión génica y/o el nivel de ARNm en el sujeto se reduce en una célula, un grupo de células y/o un tejido del sujeto.

[0101] En algunas modalidades, el nivel de proteína de AAT en un sujeto al que se le ha administrado un agente de iARN de AAT descrito se reduce en al menos alrededor de 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más del 99 % con respecto al sujeto antes de la administración del agente de iARN de AAT o con respecto a un sujeto que no recibe el agente de iARN de AAT. El nivel de proteína en el sujeto se reduce en una célula, un grupo de células, un tejido, sangre y/u otro fluido del sujeto.

[0102] En algunas modalidades, el nivel de proteína polimérica Z-AAT en un sujeto con AATD al que se le ha administrado un agente de iARN de AAT descrito se reduce en al menos alrededor de 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más del 99 % con respecto al sujeto antes de la administración del agente de iARN de AAT o con respecto a un sujeto que no recibe el agente de iARN de AAT. En algunas modalidades, el nivel de proteína polimérica Z-AAT en un sujeto al que se le ha administrado un agente de iARN de AAT descrito se reduce en al menos alrededor de 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más del 99 % con respecto al sujeto antes de la administración del agente de iARN de AAT o con respecto a un sujeto que no recibe el agente de iARN de AAT.

[0103] Se puede evaluar y cuantificar una reducción en la expresión del gen AAT, el ARNm de AAT o los niveles de proteína de AAT mediante métodos generales conocidos en la técnica. Los ejemplos descritos más adelante en la presente son métodos generalmente conocidos para evaluar la inhibición de la expresión del gen de AAT y la reducción de los niveles de la proteína AAT. En la presente se hace referencia a la reducción o disminución en el nivel de ARNm de AAT y/o el nivel de proteína (incluido el

monómero y/o polímero de Z-AAT) de manera colectiva como una reducción o disminución de la AAT o inhibición o reducción de la expresión de la AAT.

[0104] Tal como se usan en la presente, los términos «tratar», «tratamiento» y similares hacen referencia a los métodos o las medidas que se toman para proporcionar alivio o paliación de la cantidad, gravedad y/o frecuencia de uno o más síntomas de una enfermedad en un sujeto. Tal como se usan en la presente, «tratar» y «tratamiento» pueden incluir la prevención, el manejo, el tratamiento profiláctico y/o la inhibición de la cantidad, gravedad y/o frecuencia de uno o más síntomas de una enfermedad en un sujeto.

[0105] Tal como se usa en la presente, «dosificación mensual» o administración «mensual» significa cada 28 días. Tal como se usa en la presente, «dosificación trimestral» o administración «trimestral» significa cada 84 días. La expresión «alrededor de», cuando se usa en relación con la dosificación mensual significa una dosificación mensual +/- 3 días. La expresión «alrededor de», cuando se usa en relación con la dosificación trimestral significa una dosificación trimestral +/- 9 días.

[0106] Tal como se usa en la presente, la expresión «introducir en una célula», cuando hace referencia a un agente de iARN, significa suministrar funcionalmente el agente de iARN en una célula. La expresión «suministro funcional» significa suministrar el agente de iARN a la célula de una manera que se permita que el agente de iARN tenga la actividad biológica esperada, p. ej., la inhibición específica de la secuencia de la expresión génica.

[0107] A menos que se indique lo contrario, el uso del símbolo  tal como se usa en la presente significa que uno o más grupos cualesquiera pueden estar enlazados allí de acuerdo con el alcance de las invenciones descritas en la presente.

[0108] Tal como se usa en la presente, a menos que se identifique específicamente en una estructura que esta tenga una conformación particular, para cada estructura en la que estén presentes centros asimétricos y que, por lo tanto, den lugar a enantiómeros, diastereoisómeros u otras configuraciones estereoisoméricas, se pretende que cada estructura descrita en la presente represente todos los posibles isómeros, incluidas sus formas ópticamente puras y racémicas. Por ejemplo, se pretende que las estructuras descritas en la presente abarquen mezclas de diastereómeros, así como estereoisómeros individuales.

[0109] Tal como se usa en una reivindicación en la presente, la expresión «que consiste en» excluye cualquier elemento, etapa o ingrediente que no se especifique en la reivindicación. Cuando se usa en una reivindicación en la presente, la expresión «que consiste esencialmente en» limita el alcance de una reivindicación a los materiales o etapas que se especifican y aquellos que no afectan la esencia de la o las características básicas y novedosas de la invención reivindicada.

[0110] El experto en la materia comprenderá y se dará cuenta fácilmente de que los compuestos y las composiciones que se describen en la presente pueden tener determinados átomos (p. ej., átomos de N, O o S) en un estado protonado o desprotonado, dependiendo del entorno en el que se encuentre el compuesto o la composición. Por consiguiente, tal como se usa en la presente, las estructuras descritas en la presente prevén que determinados grupos funcionales, tales como, por ejemplo, OH, SH o NH, puedan protonarse o desprotonarse. La descripción en la presente está destinada a cubrir los compuestos y las composiciones que se describen independientemente de su estado de protonación en función del entorno (por ejemplo, el pH), como comprenderá fácilmente el experto en la técnica.

[0111] A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado que entiende comúnmente el experto en la técnica. Aunque se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente en la práctica o evaluación de la presente invención, a continuación se describirán métodos y materiales adecuados. Todas las publicaciones, solicitudes de patentes, patentes y otras referencias mencionadas en la presente se incorporan en su totalidad mediante referencia. En caso de discrepancias, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluidas las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solamente ilustrativos y no se pretende que sean taxativos.

[0112] Las modalidades y los elementos proporcionados anteriormente se ilustrarán a continuación con los ejemplos no taxativos que siguen.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Síntesis y formulación de la sustancia farmacológica de iARN de AAT (ADS-001)

[0113] La sustancia farmacológica de iARN de AAT adecuada para el uso en los métodos descritos en la presente puede sintetizarse mediante el uso de tecnología de fosforamidita convencional en síntesis de oligonucleótidos en fase sólida tal como se conoce en la técnica. Se pueden usar sintetizadores de oligonucleótidos disponibles en el mercado (p. ej., MerMade96E® (Bioautomation) o MerMade12® (Bioautomation)). Las síntesis pueden realizarse sobre un soporte sólido hecho de vidrio de poro controlado (CPG, 500 Å o 600Å, obtenido de Prime Synthesis, Aston, PA, EE. UU.). El monómero colocado en el extremo 3' de la cadena respectiva puede unirse al soporte sólido como punto de partida para la síntesis. Todos los ARN, las fosforamiditas de ARN con modificaciones en 2' y las fosforamiditas abásicas invertidas pueden adquirirse en el mercado. Se pueden sintetizar fosforamiditas que contengan grupos dirigidos que sean adecuadas para la adición al extremo 5' de la cadena codificante. Se pueden utilizar etapas convencionales de escisión, desprotección, purificación e

hibridación tal como se conoce en la técnica. Se puede encontrar una descripción adicional relacionada con la síntesis de agentes de iARN de AAT, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 2018/132432 (solicitud n.º PCT/US2018/013102) y WO 2018/044350 (PCT/US2017/021147), cada una de las cuales se incorpora en su totalidad a la presente mediante referencia. A continuación, se puede formular la sustancia farmacológica de iARN de AAT disolviéndola en excipientes farmacéuticamente aceptables convencionales que se conocen generalmente en la técnica. Por ejemplo, la Tabla 3 muestra una sustancia farmacológica de iARN de AAT formulada que es adecuada para el uso en los métodos descritos en la presente.

Ejemplo 2. Ensayo clínico de fase I de la sustancia farmacológica de iARN de AAT (ADS-001) en voluntarios humanos sanos normales (NHV).

[0114] Se llevó a cabo un estudio de fase 1, de aumento de la dosis en una sola o en múltiples instancias para evaluar la seguridad, la tolerabilidad, la farmacocinética y el efecto de la sustancia farmacológica de iARN de AAT (ADS-001) sobre los niveles de AAT en suero en voluntarios sanos (NHV). La población de sujetos de estudio incluyó hombres y mujeres adultos sanos de 18-52 años de edad con un IMC de entre 19,0 y 35,0 kg/m².

[0115] Los sujetos NHV se dividieron en un total de siete cohortes. Las cohortes 1 a 4 se distribuyeron al azar para recibir la sustancia farmacológica de iARN de AAT o placebo (4 de activo: 4 de placebo) en dosis únicas escalonadas de 35 mg (Cohorte 1) y múltiples dosis escalonadas de 100 mg (Cohorte 2), 200 mg (Cohorte 3) y 300 mg (Cohorte 4) administrados como una inyección subcutánea. Las Cohortes 1 a 4 fueron de doble ciego. Las Cohortes 2b, 3b y 4b fueron de etiqueta abierta y consistieron en 4 sujetos que recibieron dosis únicas de 100, 200 y 300 mg de la sustancia farmacológica de iARN de AAT. Un total de 44 completaron el estudio. La Figura 4 muestra el diseño del estudio final para el ensayo clínico de fase I. Los parámetros del estudio se resumen en la Tabla 4 que sigue.

[0116] Tabla 4. Parámetros del estudio clínico de fase I

Fase de desarrollo	Fase 1: Primero en seres humanos
Objetivos del estudio	Objetivos principales: Determinar la incidencia y frecuencia de episodios adversos posiblemente o probablemente relacionados con el tratamiento como una medida de la seguridad y tolerabilidad de la sustancia farmacológica de iARN de AAT (ADS-001) mediante el uso de

	dosis únicas en aumento y dosis múltiples en aumento en voluntarios humanos sanos normales (NHV). Objetivos secundarios: • Evaluar la farmacocinética de dosis únicas y múltiples de la sustancia farmacológica de iARN de AAT en NHV. • Determinar la reducción de la AAT en suero en respuesta a la sustancia farmacológica de iARN de AAT como medida de la actividad farmacológica. Objetivos exploratorios: • Evaluar el efecto de dosis únicas de la sustancia farmacológica de iARN de AAT sobre las citocinas (panel de citocinas A: interleucina-6 [IL-6], proteína quimioatrayente de monocitos-1 [MCP-1], factor de necrosis tumoral-alfa [TNF-alfa], interleucina-8 [IL-8], interleucina-1beta [IL-1beta], interferón alfa [IFN alfa], IL-10, IL-12 [p40], IL-12 [p70], proteína inflamatoria de macrófagos-1alfa [Mip-1alfa]) en NHV. • Evaluar el efecto de dosis únicas en aumento de la sustancia farmacológica de iARN de AAT sobre los factores del complemento Bb, CH50, C5a, C4a y C3a en NHV. • Recolectar muestras de plasma en NHV para la posterior identificación de metabolitos (esto se describe en un informe separado fuera de este estudio). • Recolectar muestras de orina en NHV para la posterior determinación de la excreción urinaria e identificación de metabolitos (esto se describe en un informe separado fuera de este estudio).
Diseño del estudio	Cohortes 1 a 4: aleatorizadas, doble ciego, controladas con placebo Cohortes 2b, 3b y 4b: abiertas
Población del estudio	Este estudio se llevó a cabo en NHV adultos de ambos sexos, de 18-52 años de edad con un IMC de entre 19,0 y 35,0 kg/m².
Producto en investigación	Sustancia farmacológica de iARN de AAT (ADS-001) (véase la Tabla 2), administrada como la sustancia farmacológica de iARN de AAT (véase la Tabla 3)

Dosis y frecuencia	Cohorte 1: aleatorizada para recibir la sustancia farmacológica de iARN de AAT (ADS-001) o placebo (4 de activo: 4 de placebo) en una dosis única de 35 mg administrada en una sola inyección subcutánea. Cohortes 2-4: aleatorizada para recibir tres dosis mensuales (es decir, los días 1, 29 y 57) de 100 mg (Cohorte 2), 200 mg (Cohorte 3) o 300 mg (Cohorte 4) de sustancia farmacológica de iARN de AAT (4 de activo: 4 de placebo), mediante inyección subcutánea. Cohortes 2b, 3b y 4b: inscritas para recibir una dosis única de 100 mg (Cohorte 2b), 200 mg (Cohorte 3b) o 300 mg (Cohorte 4b) de sustancia farmacológica de iARN de AAT (4 de activo) administrada en una sola inyección subcutánea.
Formulación de referencia	Placebo (PBO): solución salina normal (0,9 %) administrada por vía subcutánea con el volumen correspondiente.
Criterios de evaluación de seguridad	La seguridad se evaluó según los episodios adversos, los episodios adversos graves, los exámenes físicos, las mediciones de los signos vitales (presión arterial, frecuencia cardíaca, temperatura y frecuencia respiratoria), mediciones de ECG en reposo, pruebas de laboratorio clínico, medicamentos/terapia concomitantes, reacciones en el lugar de la inyección (ISR, por sus siglas en inglés), motivos para la interrupción del tratamiento y seguimiento del embarazo 90 días después del Día 29 (Cohorte 1) y posterior al Día 113 (todas las demás cohortes).
Evaluación de farmacocinética	Se recolectarán muestras de sangre de cada sujeto para análisis de farmacocinética después de la dosis 1 (Cohorte 1) y después de la dosis 1 y 3 (Cohortes 2, 3 y 4).

Análisis de datos	Datos de detección, cumplimiento, tolerabilidad y seguridad: Se realizarán análisis de seguridad y los resultados se resumirán por cohorte. La incidencia y frecuencia de los episodios adversos (AE, por sus siglas en inglés), episodios adversos graves (SAE, por sus siglas en inglés), AE relacionados, SAE relacionados y AE que conducen a la interrupción se resumirán por cohorte según SOC, PT y gravedad. Otros parámetros de seguridad se resumirán en cada momento programado. Farmacocinética (solo sujetos NHV): Las concentraciones en plasma de los constituyentes de la sustancia farmacológica de iARN de AAT se usarán para calcular los siguientes parámetros de PK: concentración en plasma máxima observada (C_{máx}), área bajo la curva de concentración en plasma-tiempo (AUC) de 0 a 24 horas (AUC₀₋₂₄), AUC de tiempo 0 extrapolado al infinito (AUC_{inf}) y semivida de eliminación terminal (t_{1/2}). Los parámetros de farmacocinética se determinarán mediante métodos no compartimentales. Las estadísticas descriptivas de los parámetros de PK incluirán la media, la desviación estándar (SD, por sus siglas en inglés), el coeficiente de variación, la mediana, el mínimo y el máximo. Los resultados de la farmacocinética se analizarán para determinar la proporcionalidad de las dosis y las diferencias según el sexo.
-------------------	--

[0117] Los resultados de la reducción de la AAT en suero del estudio mostraron que la administración de la sustancia farmacológica de iARN de AAT en dosis de 35 a 300 mg produjo una reducción profunda de la AAT en suero en comparación con el placebo. Inicialmente, se propuso una cohorte como parte del protocolo del ensayo clínico a 400 mg de la sustancia farmacológica de iARN de AAT por dosis. Sin embargo, en vista de la potencia inesperada en las dosis de 35, 100, 200 y 300 mg, la cohorte de 400 mg se eliminó del protocolo de estudio. Las dosis de 35 mg, 100 mg y 200 mg produjeron reducciones sustanciales de la AAT en suero, y tanto los 100 mg como los 200 mg alcanzaron una reducción media de la AAT en suero de alrededor del 90 % después de múltiples dosis en el estudio de fase I. Las Figuras 5 a 11 informan sobre las reducciones de AAT en suero de las diversas cohortes en el estudio de fase

[0118] No hubo una respuesta clara dependiente de la dosis en todos los niveles de dosis porque, de manera sorprendente e inesperada, los niveles de dosis de 100 mg y 200 mg produjeron una desactivación sustancial (alcanzando aproximadamente el 90 %) y similar a la dosis más alta de 300 mg. Si bien la dosis más baja de 35 mg también fue bastante activa, no fue tan activa como los 100 mg administrados en una dosis única, lo que indica un grado de respuesta a la dosis.

[0119] La duración de la reducción de la AAT en suero (>58 %) a partir de una única dosis de 35 mg fue mayor que lo previsto inicialmente, hasta 16 semanas después de la administración de la dosis con un posterior retorno al valor inicial. Por ejemplo, treinta y cuatro semanas después de la dosis única de 35 mg, el nivel de AAT en suero de un sujeto ha vuelto a estar por encima de 90 mg/dL, mientras que el nivel de AAT en suero de un segundo sujeto se mantuvo en 40 mg/dL (reducción del 60,4 % con respecto al valor inicial). No hubo diferencias significativas en la duración de la respuesta de dosis únicas de 100 mg a 300 mg de la sustancia farmacológica de iARN de AAT, y el retorno al valor inicial comenzó entre 8 y 16 semanas después de la dosis única.

[0120] Las dosis múltiples de la sustancia farmacológica de iARN de AAT mantienen una reducción profunda de la AAT en suero durante más tiempo que una dosis única en general. Estos datos sugieren que una segunda dosis recibida el Día 29 (es decir, después de un mes desde la dosis inicial) puede reducir de manera adicional los niveles de AAT en suero o mantener las reducciones, y se pueden administrar dosis posteriores para mantener la máxima reducción de la AAT en suero cada 12 semanas (es decir, de manera trimestral).

[0121] En el estudio de fase I no hubo muertes, episodios adversos graves (SAE) ni episodios adversos (AE) clasificados como graves en intensidad. Dos sujetos informaron que tres AE eran de intensidad moderada en los sujetos que recibieron la sustancia farmacológica de iARN de AAT (infección del tracto respiratorio superior, rinorrea, dolor torácico general). Tres sujetos informaron tres AE como de intensidad moderada en los sujetos que recibieron placebo (2 gastroenteritis, dolor torácico musculoesquelético del lado izquierdo). Todos los demás AE informados fueron leves. La mayoría de los sujetos informaron AE no relacionados con el tratamiento del estudio. Se produjo un AE en un sujeto que recibió AAT, lo cual condujo a la interrupción prematura del tratamiento, aunque se continuó con el seguimiento del sujeto en el estudio. Se informaron noventa y cuatro AE en 28 sujetos que recibieron al menos una dosis única de la sustancia farmacológica de iARN de AAT formulada. Se informaron cuarenta y seis AE en 17 sujetos que recibieron placebo. No hay un patrón claro de aumento de la frecuencia o intensidad de los AE con el aumento de la dosis.

[0122] Se produjeron seis AE en el lugar de la inyección en 6 sujetos de todas las cohortes de sustancia farmacológica de iARN de AAT formuladas, que ocurrieron todas en sujetos que recibieron el fármaco. No hubo AE en el lugar de la inyección en los sujetos que recibieron placebo. Las reacciones

en el lugar de la inyección informadas incluyeron hematomas, eritema y dolor en el lugar de la inyección. Estos EA combinados en el lugar de la inyección fueron informados por el 21,4 % de los sujetos que recibieron la sustancia farmacológica de iARN de AAT formulada. Seis de las 50 inyecciones de la sustancia farmacológica de iARN de AAT formulada dieron como resultado un AE en el lugar de inyección o un 12 %. No se informaron AE en el lugar de la inyección más de una vez en un solo sujeto. Todos los AE en el lugar de la inyección se han considerado de intensidad leve.

OTRAS MODALIDADES

- 10 **[0123]** Se ha de comprender que, si bien la invención se ha descrito junto con su descripción detallada, se pretende que la descripción que antecede ilustre y no limite el alcance de la invención, el cual es definido por el alcance de las reivindicaciones anexas. Otros aspectos, ventajas y modificaciones se encuentran dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.