



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112020000400-6 A2



(22) Data do Depósito: 10/07/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 14/07/2020

(54) **Título:** MÉTODOS E COMPOSIÇÕES PARA O TRATAMENTO DE UM CASO DE HEMORRAGIA EM UM INDIVÍDUO COM HEMOFILIA

(51) **Int. Cl.:** A61P 7/04; A61K 31/713.

(30) **Prioridade Unionista:** 05/01/2018 US 62/614,111; 10/07/2017 US 62/530,518; 15/12/2017 US 62/599,223; 18/05/2018 US 62/673,424.

(71) **Depositante(es):** GENZYME CORPORATION.

(72) **Inventor(es):** AKIN AKINC.

(86) **Pedido PCT:** PCT US2018041400 de 10/07/2018

(87) **Publicação PCT:** WO 2019/014187 de 17/01/2019

(85) **Data da Fase Nacional:** 08/01/2020

(57) **Resumo:** A presente invenção refere-se ao iRNA, por exemplo, ácido ribonucléico de fita dupla (dsRNA), composições visando o gene *Serpinc1*, e métodos para usar tal iRNA, por exemplo, composições de dsRNA, para tratar um caso de sangramento em um indivíduo com uma hemofilia (por exemplo, com ou sem inibidores).

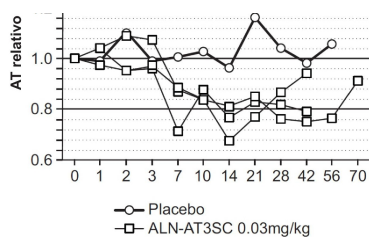


FIG. 1A

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para  
**"MÉTODOS E COMPOSIÇÕES PARA O TRATAMENTO DE UM  
CASO DE HEMORRAGIA EM UM INDIVÍDUO COM HEMOFILIA".**

**Pedidos de Patente Relacionados**

[001] Este pedido reivindica o benefício de prioridade ao pedido de patente provisório US nº 62/530.518, depositado em 10 de julho de 2017, pedido de patente provisório US nº 62/599.223, depositado em sexta-feira, 15 de dezembro de 2017, pedido de patente provisório US nº 62/614.111, depositado em 5 de janeiro de 2018, e o pedido de patente provisório US nº 62/673.424, depositado em 18 de maio de 2018. Todo o conteúdo de cada um dos pedidos de patente anteriores está aqui incorporado, a título de referência.

[002] Este pedido está também relacionado ao pedido internacional PCT/US2016/065245, depositado em 7 de dezembro de 2016, ao pedido de patente provisório US nº 62/264.013, depositado em 7 de dezembro de 2015, pedido de patente provisório US nº 62/315.228, depositado em 30 de março de 2016, pedido de patente provisório US nº 62/366.304, depositado em 25 de julho de 2016, e o pedido de patente provisório US nº 62/429.241, depositado em 2 de dezembro de 2016. Todo o conteúdo de cada um dos pedidos de patente anteriores está aqui incorporado, a título de referência.

[003] Além disso, este pedido está relacionado com o pedido de patente provisório US nº 61/992.057, depositado em segunda-feira, 12 de maio de 2014, pedido de patente provisório US nº 62/089.018, depositado em 8 de dezembro de 2014, pedido de patente provisório US nº 62/102.281, arquivado em 12 de janeiro de 2015, e pedido internacional PCT/US2015/030337, depositado em 12 de maio de 2015. Todo o conteúdo de cada um dos pedidos de patente anteriores está aqui incorporado, a título de referência.

[004] Este pedido também está relacionado com o pedido de

patente provisório US nº 61/638.952, depositado em quinta-feira, 26 de abril de 2012, pedido de patente provisório US nº 61/669.249, depositado em segunda-feira, 9 de julho de 2012, pedido de patente provisório US nº 61/734.573, depositado em 7 de dezembro de 2012, pedido de patente US nº 13/837.129, depositado em março 15 de 2013, agora patente US nº 9.127.274, U.S. Patente nº:pedido de patente US nº 14/806.084, depositado em 22 de julho de 2015, agora patente US nº 9.376.680, pedido de patente US nº 15/070.358, depositado em 15 de março de 2016, e pedido internacional PCT/US2013/038218, depositado em 25 de abril de 2013. Este pedido está também relacionado ao pedido internacional PCT/US2012/065601, depositado em 16 de novembro de 2012. Todo o conteúdo de cada um dos pedidos de patente anteriores está aqui incorporado, a título de referência.

### **Listagem de Sequências**

[005] O presente pedido contém uma Listagem de Sequências que foi submetida eletronicamente em formato ASCII e está aqui incorporada a título de referência em sua totalidade. A dita cópia ASCII, criada em 2 de julho de 2018, é denominada 117811-02720\_SL.TXT e tem 21.147 bites de tamanho.

### **Antecedentes da Invenção**

[006] Serpinc1 é um membro da super família do inibidor de serina protease (serpina). Serpinc1 é um inibidor da protease plasmática que inibe a trombina, bem como outras serinas proteases ativadas do sistema de coagulação, como fatores X, IX, XI, XII e VII e, assim, regula a cascata de coagulação sanguínea. A atividade anticoagulante de Serpinc1 é aumentada pela presença de heparina e outras glicosaminoglicanas relacionadas que catalisam a formação de complexos trombina:antitrombina (TAT).

[007] Distúrbios hemorrágicos, herdados ou adquiridos, são as

condições em que é a coagulação do sangue é inadequada. Por exemplo, a hemofilia é um grupo de distúrbios hemorrágicos genéticos hereditários que prejudica a capacidade do corpo para controlar a coagulação sanguínea ou coagulação. A hemofilia A é um distúrbio genético recessivo ligado ao cromossomo X envolvendo uma deficiência no fator VIII de coagulação funcional e representa 80% dos casos de hemofilia. A hemofilia B é um distúrbio genético recessivo ligado ao cromossomo X envolvendo uma deficiência no fator IX de coagulação funcional. Compreende cerca de 20% dos casos de hemofilia. A hemofilia C é um distúrbio genético autossômico envolvendo uma deficiência no fator XI de coagulação funcional. A hemofilia C não é completamente recessiva, pois indivíduos heterozigotos também mostram aumento de hemorragia.

[008] Embora atualmente não exista cura para a hemofilia, ela pode ser controlada com infusões regulares do fator de coagulação deficiente, por exemplo, fator VIII na hemofilia A. No entanto, alguns hemofílicos desenvolvem anticorpos (inibidores) contra os fatores de substituição dados a eles e, assim, tornam-se refratários à substituição de fatores de coagulação. Por conseguinte, hemorragias em tais indivíduos não podem ser adequadamente controlados.

[009] O desenvolvimento de inibidores de alta titulação para, por exemplo, fator VIII e outros fatores de coagulação é a complicação mais grave da terapia de hemofilia e torna o tratamento de hemorragias muito desafiador. Atualmente, as únicas estratégias para parar hemorragias em tais indivíduo são o uso de "agentes de desvio" como atividade de desvio de inibidor do fator oito (FEIBA) e fator VII recombinante ativado (rFVIIa), plasmaférese, substituição contínua de fator e terapia de tolerância imune, nenhum dos quais é completamente eficaz. Por conseguinte, existe a necessidade na técnica para tratamentos alternativos para os indivíduos com um

distúrbio hemorrágicos, como a hemofilia.

### **Sumário da Invenção**

[0010] A presente invenção é baseada, pelo menos em parte, na surpreendente descoberta de que, em indivíduos com hemofilia, sem inibidores, e administrados com uma quantidade terapêuticamente eficaz de uma composição de iRNA que afeta a clivagem mediada pelo complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) de transcrições de RNA de um gene *Serpinc1*, um caso de hemorragia pode ser tratado com uma quantidade terapêuticamente eficaz de um fator de substituição, como Fator VIII ou Fator XI, que é menos que a quantidade eficaz que o recomendado do fator de substituição, por exemplo, recomendado pela Federação Mundial de Hemofilia (ver, por exemplo, Srivastava, et al. "Guidelines for the Management of Hemophilia", Hemophilia Epub 6 Julho 2012; DOI:10.1111/j.1365-2516.2012.02909.x) e/ou pela Food and Drug Administration; e que em indivíduos com hemofilia, com presença de inibidores, e administrados com uma quantidade terapêuticamente eficaz de uma composição de iRNA que afeta a clivagem mediada pelo complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) de transcrições de RNA de um gene *Serpinc1*, um caso de hemorragia pode ser tratado com uma quantidade terapêuticamente eficaz de um agente de desvio, como, por exemplo, concentrado de complexo de protrombina ativada (aPCC) ou Fator VIIa recombinante (rFVIIa) que é menos do que a quantidade eficaz recomendada do agente de desvio, por exemplo, recomendado pela Federação Mundial de Hemofilia (ver, por exemplo, Srivastava, et al. "Guidelines for the Management of Hemophilia", Hemophilia Epub 6 Julho 2012; DOI:10.1111/j.1365-2516.2012.02909.x) e/ou pela Food and Drug Administration. .

[0011] Assim, em um aspecto a presente invenção fornece um método de tratamento de um caso de hemorragia em um indivíduo

com um distúrbio hemorrágico, como a hemofilia sem inibidores. O método inclui a administração ao indivíduo uma dose fixa de cerca de 30 mg a cerca de 90 mg de um agente de ácido ribonucléico (RNAi) de fita dupla que inibe a expressão de um Serpinc1, onde o agente de RNAi de fita dupla compreende uma fita senso e uma fita antissenso, a fita antissenso compreendendo uma região de complementaridade para um mRNA codificando um Serpinc1 que compreende pelo menos 15 nucleotídeos contíguos que diferem em não mais de 3 nucleotídeos da sequência de nucleotídeos de 5' - UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG - 3' (SEQ ID NO: 15), onde praticamente todos os nucleotídeos da fita senso e substancialmente todos os nucleotídeos da fita antissenso são nucleotídeos modificados, e onde a fita senso está conjugada com um ligante anexado no 3'-terminal; e a administração ao indivíduo de uma quantidade terapêuticamente eficaz de um fator de substituição, onde a quantidade eficaz do fator de substituição é reduzida em comparação com a quantidade eficaz recomendada do fator de substituição, de modo a tratar um caso de hemorragia no indivíduo tendo uma hemofilia sem inibidores.

[0012] Em outro aspecto, a presente invenção fornece um método de tratamento de um caso de hemorragia em um indivíduo com um distúrbio hemorrágico, como a hemofilia com inibidores. Os métodos incluem a administração ao indivíduo uma dose fixa de cerca de 30 mg a cerca de 90 mg de um agente de ácido ribonucléico (RNAi) de fita dupla que inibe a expressão de Serpinc1, onde o agente de RNAi de fita dupla compreende uma fita senso e uma fita antissenso, a fita antissenso compreendendo uma região de complementaridade para um mRNA codificando a Serpinc1 que compreende pelo menos 15 nucleotídeos contíguos que diferem em não mais de 3 nucleotídeos da sequência de nucleotídeos de 5' -

UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG – 3' (SEQ ID NO: 15), onde praticamente todos os nucleotídeos da fita senso e substancialmente todos os nucleotídeos da fita antissenso são nucleotídeos modificados, e onde a fita senso está conjugada com um ligante anexado no 3'-terminal; e a administração ao indivíduo de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um agente de desvio, onde a quantidade eficaz do agente de desvio é reduzida em comparação com a quantidade eficaz recomendada do agente de desvio, de modo a tratar um caso de hemorragia no indivíduo tendo uma hemofilia com inibidores.

[0013] Em um aspecto a presente invenção fornece um método de tratamento de um caso de hemorragia em um indivíduo com um distúrbio hemorrágico, como a hemofilia sem inibidores. O método inclui a administração ao indivíduo uma dose fixa de cerca de 40 mg a cerca de 90 mg de um agente de ácido ribonucléico (RNAi) de fita dupla que inibe a expressão de um Serpinc1, onde o agente de RNAi de fita dupla compreende uma fita senso e uma fita antissenso, a fita antissenso compreendendo uma região de complementaridade para um mRNA codificando um Serpinc1 que compreende pelo menos 15 nucleotídeos contíguos que diferem em não mais de 3 nucleotídeos da sequência de nucleotídeos de 5' - UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG – 3' (SEQ ID NO: 15), onde praticamente todos os nucleotídeos da fita senso e substancialmente todos os nucleotídeos da fita antissenso são nucleotídeos modificados, e onde a fita senso está conjugada com um ligante anexado no 3'-terminal; e a administração ao indivíduo de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um fator de substituição, onde a quantidade eficaz do fator de substituição é reduzida em comparação com a quantidade eficaz recomendada do fator de substituição, de modo a tratar um caso de hemorragia no indivíduo tendo uma

hemofilia sem inibidores.

[0014] Em outro aspecto, a presente invenção fornece um método de tratamento de um caso de hemorragia em um indivíduo com um distúrbio hemorrágico, como a hemofilia com inibidores. Os métodos incluem a administração ao indivíduo uma dose fixa de cerca de 40 mg a cerca de 90 mg de um agente de ácido ribonucleico (RNAi) de fita dupla que inibe a expressão de *Serpinc1*, onde o agente de RNAi de fita dupla compreende uma fita senso e uma fita antissenso, a fita antissenso compreendendo uma região de complementaridade para um mRNA codificando a *Serpinc1* que compreende pelo menos 15 nucleotídeos contíguos que diferem em não mais de 3 nucleotídeos da sequência de nucleotídeos de 5' - UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG - 3' (SEQ ID NO: 15), onde praticamente todos os nucleotídeos da fita senso e substancialmente todos os nucleotídeos da fita antissenso são nucleotídeos modificados, e onde a fita senso está conjugada com um ligante anexado no 3'-terminal; e a administração ao indivíduo de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um agente de desvio, onde a quantidade eficaz do agente de desvio é reduzida em comparação com a quantidade eficaz recomendada do agente de desvio, de modo a tratar um caso de hemorragia no indivíduo tendo uma hemofilia com inibidores.

[0015] O agente de RNAi de fita dupla pode ser administrado ao indivíduo em duas ou mais doses.

[0016] Em algumas modalidades, o agente de RNAi de fita dupla é administrado ao indivíduo uma vez por mês, uma vez a cada cinco semanas, uma vez a cada seis semanas, uma vez a cada sete semanas, uma vez a cada dois meses, uma vez por trimestre, ou conforme necessário.

[0017] Em uma modalidade, o agente de RNAi de fita dupla é

administrado ao indivíduo uma vez por mês. Em outra modalidade, o agente de RNAi de fita dupla é administrado ao indivíduo uma vez a cada seis semanas. Em uma modalidade, o agente de RNAi de fita dupla é administrado ao indivíduo uma vez a cada 2 meses. Em ainda outra modalidade, o agente de RNAi de fita dupla é administrado ao indivíduo uma vez por trimestre.

[0018] O agente de RNAi de fita dupla pode ser administrado ao indivíduo como, por exemplo, uma dose fixa de entre cerca de 25 mg a cerca de 100 mg, por exemplo, entre cerca de 25 mg a cerca de 95 mg, entre cerca de 25 mg a cerca de 90 mg, entre cerca de 25 mg a cerca de 85 mg, entre cerca de 25 mg a cerca de 80 mg, entre cerca de 25 mg a cerca de 75 mg, entre cerca de 25 mg a cerca de 70 mg, entre cerca de 25 mg a cerca de 65 mg, entre cerca de 25 mg a cerca de 60 mg, entre cerca de 25 mg a cerca de 50 mg, entre cerca de 50 a cerca de 100 mg, entre cerca de 50 mg a cerca de 95 mg, entre cerca de 50 mg a cerca de 90 mg, entre cerca de 50 mg a cerca de 85 mg, entre cerca de 50 mg a cerca de 80 mg, entre cerca de 30 a cerca de 100 mg, entre cerca de 30 mg a cerca de 90 mg, entre cerca de 30 mg a cerca de 80 mg, entre cerca de 40 a cerca de 100 mg, entre cerca de 40 mg a cerca de 90 mg, entre cerca de 40 mg a cerca de 80 mg, entre cerca de 60 a cerca de 100 mg, entre cerca de 60 mg a cerca de 90 mg, entre cerca de 25 mg a cerca de 55 mg, entre cerca de 25 mg a cerca de 65 mg, entre cerca de 30 mg a cerca de 95 mg, entre cerca de 30 mg a cerca de 85 mg, entre cerca de 30 mg a cerca de 75 mg, entre cerca de 30 mg a cerca de 65 mg, entre cerca de 30 mg a cerca de 55 mg, entre cerca de 40 mg a cerca de 95 mg, entre cerca de 40 mg a cerca de 85 mg, entre cerca de 40 mg a cerca de 75 mg, entre cerca de 40 mg a cerca de 65 mg, entre cerca de 40 mg a cerca de 55 mg, ou entre cerca de 45 mg a cerca de 95 mg.

[0019] Em algumas modalidades, o agente de RNAi de fita dupla

pode ser administrado em uma dose fixa de cerca de 25 mg, cerca de 30 mg, cerca de 35 mg, cerca de 40 mg, cerca de 45 mg, cerca de 50 mg, cerca de 55 mg, cerca de 60 mg, cerca de 65 mg, cerca de 70 mg, cerca de 75 mg, cerca de 80 mg, cerca de 85 mg, cerca de 90 mg, cerca de 95 mg ou cerca de 100 mg.

[0020] Em algumas modalidades, o agente de RNAi de fita dupla é administrado ao indivíduo em uma dose fixa de cerca de 25 mg; ou em uma dose fixa de cerca de 50 mg; ou em uma dose fixa de cerca de 80 mg; ou em uma dose fixa de cerca de 100 mg.

[0021] Em uma modalidade, o agente de RNAi de fita dupla é administrado ao indivíduo subcutaneamente.

[0022] Em uma modalidade, o indivíduo é um ser humano.

[0023] A hemofilia pode ser hemofilia A, hemofilia B ou hemofilia C.

[0024] Em uma modalidade, todos os nucleotídeos da fita senso e todos os nucleotídeos da fita antissenso são nucleotídeos modificados.

[0025] Em uma modalidade, os nucleotídeos modificados são selecionados de forma independente do grupo consistindo em nucleotídeo modificado 2'-desóxi-2'-fluoro, nucleotídeo modificado 2'-desóxi, um nucleotídeo bloqueado, um nucleotídeo abásico, um nucleotídeo 2'-amino-modificado, um nucleotídeo 2'-alquil- modificado, um nucleotídeo morfolino, um fosforamidato, e uma base não natural compreendendo nucleotídeo.

[0026] A região de complementaridade pode ser de pelo menos 17 nucleotídeos de comprimento ou 19 nucleotídeos de comprimento.

[0027] Em uma modalidade, a região de complementaridade tem entre 19 e 21 nucleotídeos de comprimento. Em outra modalidade, a região de complementaridade tem entre 21 e 23 nucleotídeos de comprimento.

[0028] Em uma modalidade, cada fita tem mais de 30 nucleotídeos

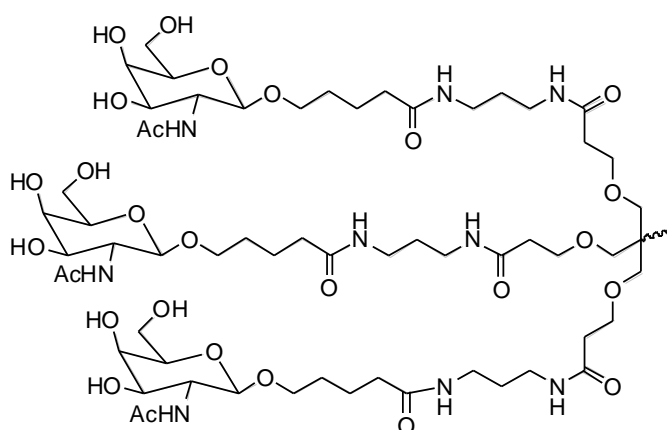
de comprimento.

[0029] Pelo menos uma fita do agente de RNAi de fita dupla pode compreender uma saliência 3' de pelo menos 1 nucleotídeo ou uma saliência 3' de pelo menos 2 nucleotídeos, como, por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ou 15 nucleotídeos. Em outras modalidades, pelo menos uma fita do agente de RNAi compreende uma saliência 5' de pelo menos 1 nucleotídeo. Em certas modalidades, pelo menos uma fita compreende uma saliência 5' de pelo menos 2 nucleotídeos, por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ou 15 nucleotídeos. Ainda em outras modalidades, ambas as extremidades 3' e 5' de uma fita do agente de RNAi compreende uma saliência de pelo menos 1 nucleotídeo.

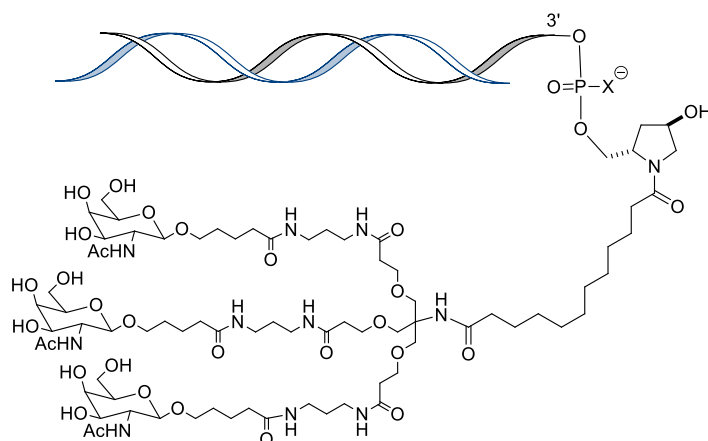
[0030] Em certas modalidades, o ligante é uma N-acetilgalactosamina (GalNAc). O ligante pode ser uma ou mais GalNAc fixada ao agente de RNAi através de um ligante monovalente, bivalente ou trivalente ramificado. O ligante pode ser conjugado com a extremidade 3' da fita senso do agente de RNAi de fita dupla, a extremidade 5' da fita senso do agente de RNAi de fita dupla, a extremidade 3' da fita antissenso do agente de RNAi de fita dupla ou a extremidade 5' da fita antissenso do agente de RNAi de fita dupla.

[0031] Em algumas modalidades, os agentes de RNAi de fita dupla da invenção compreendem uma pluralidade, por exemplo, 2, 3, 4, 5 ou 6, de GalNAc, cada um independentemente ligado a uma pluralidade de nucleotídeos do agente de RNAi de fita dupla através de uma pluralidade de ligantes monovalentes.

[0032] Em certas modalidades, o ligante é



[0033] Em uma modalidade, o agente de RNAi é conjugado com o ligante, como mostra o seguinte esquema



e, em que X é O ou S.

[0034] Em uma modalidade, o X é O.

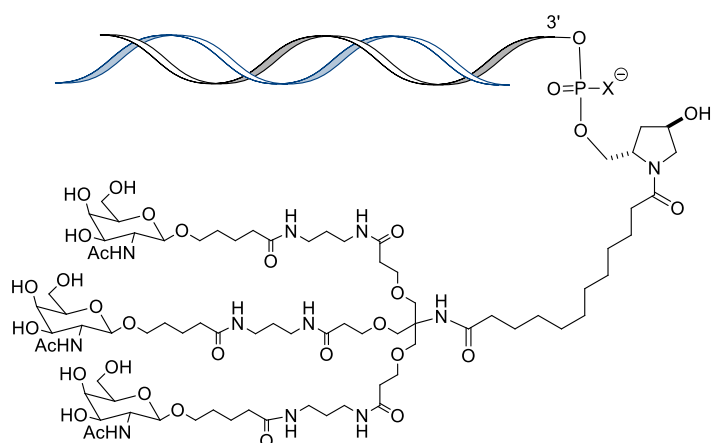
[0035] Em uma modalidade, a região de complementaridade consiste na sequência de nucleotídeos de 5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3'(SEQ ID NO: 15).

[0036] Em uma modalidade, o agente de RNAi de fita dupla compreende uma fita senso compreendendo a sequência de nucleotídeos de 5'-GGUUAACACCAUUUACUUCAA-3'(SEQ ID NO: 16), e uma fita antissenso compreendendo a sequência de nucleotídeos de 5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3'(SEQ ID NO: 15).

[0037] Em uma modalidade, a fita senso compreende 5'-GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf-3'(SEQ ID NO:13) e a fita anti-senso compreende 5'-usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg

– 3' (SEQ ID NO:14), em que a, c, g e u são 2'-O-metila (2'-OMe) A, C, G, ou U; Af, Cf, Gf ou Uf são 2'-fluoro A, C, G ou U; e s é um acoplamento fosforotioato.

[0038] Em uma modalidade, a fita senso compreende 5'-GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf – 3' (SEQ ID NO:13) e a fita antissenso compreende 5'-usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg – 3' (SEQ ID NO:14), em que a, c, g e u são 2'-O-metila (2'-OMe) A, C, G, ou U; Af, Cf, Gf ou Uf são 2'-fluoro A, C, G ou U; e s é um acoplamento fosforotioato; e em que a fita senso está conjugada com o ligante, como mostra o seguinte esquema



, em que X é O ou S.

[0039] Em uma modalidade, o agente é administrado como uma composição farmacêutica. Em uma modalidade, o agente de RNAi é administrado em uma solução sem tampão, como solução salina ou água.

[0040] Em outra modalidade, o siRNA é administrado com uma solução tampão, como uma solução tampão compreendendo acetato, citrato, prolamina, carbonato ou fosfato ou qualquer combinação destes. Em uma modalidade, a solução tampão é solução salina tamponada com fosfato (PBS).

[0041] Em uma modalidade, a administração do agente dsRNA ao indivíduo diminui a atividade da Serpinc1 por cerca de 75% ou mais.

[0042] Em uma modalidade, o fator de substituição é o Fator VIII. A quantidade terapeuticamente eficaz do Fator VIII administrada ao

indivíduo pode ser menos que 200 UI/kg, ou menos que cerca de 190 UI/kg, ou menos que cerca de 180 UI/kg, ou menos que cerca de 170 UI/kg, ou menos que cerca de 160 UI/kg, ou menos que cerca de 150 UI/kg, ou menos que cerca de 140 UI/kg, ou menos que cerca de 130 UI/kg, ou menos que cerca de 120 UI/kg, ou menos que cerca de 110 UI/kg, ou menos que cerca de 100 UI/kg, ou menos que cerca de 90 UI/kg, ou menos que cerca de 80 UI/kg, ou menos que cerca de 70 UI/kg, ou menos que cerca de 60 UI/kg, ou menos que cerca de 50 UI/kg, ou menos que cerca de 40 UI/kg, ou menos que cerca de 30 UI/kg, ou menos que cerca de 20 UI/kg, ou menos que cerca de 10 UI/kg. Em uma modalidade, a quantidade terapeuticamente eficaz do Fator VIII administrada ao indivíduo é de cerca de uma vez e meia a cerca de cinco vezes menor do que a quantidade eficaz recomendada do Fator VIII, por exemplo, uma dose de cerca de 5 UI/kg a cerca de 20 UI/kg, ou cerca de 10 UI/kg a cerca de 20 UI/kg, por exemplo, cerca de 5, 10, 15, ou 20 UI/kg. Em uma modalidade, o caso de hemorragia é um caso de hemorragia moderada. Em outra modalidade, o caso de hemorragia é um caso importante de hemorragia.

[0043] Em outra modalidade, o fator de substituição é o Fator IX. A quantidade terapeuticamente eficaz do Fator IX pode ser menos que 200 UI/kg, ou menos que cerca de 190 UI/kg, ou menos que cerca de 180 UI/kg, ou menos que cerca de 170 UI/kg, ou menos que cerca de 160 UI/kg, ou menos que cerca de 150 UI/kg, ou menos que cerca de 140 UI/kg, ou menos que cerca de 130 UI/kg, ou menos que cerca de 120 UI/kg, ou menos que cerca de 110 UI/kg, ou menos que cerca de 100 UI/kg, ou menos que cerca de 90 UI/kg, ou menos que cerca de 80 UI/kg, ou menos que cerca de 70 UI/kg, ou menos que cerca de 60 UI/kg, ou menos que cerca de 50 UI/kg, ou menos que cerca de 40 UI/kg, ou menos que cerca de 30 UI/kg, ou menos que cerca de 20 UI/kg, ou menos que cerca de 10 UI/kg. Em uma modalidade, a quantidade

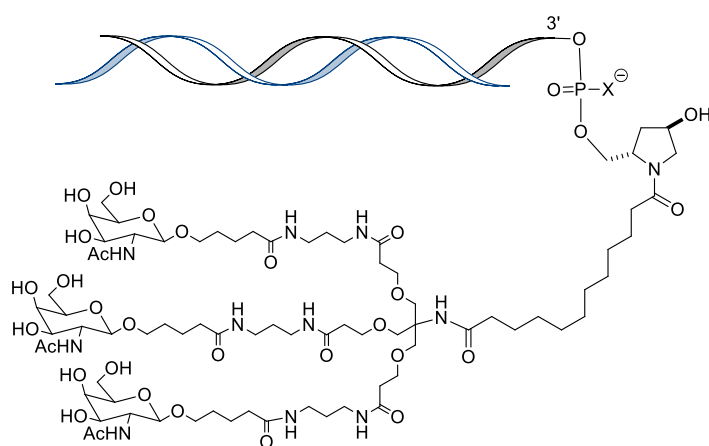
terapeuticamente eficaz do Fator IX administrada ao indivíduo é de cerca de duas vezes a cerca de seis vezes menor do que a quantidade eficaz recomendada do Fator IX, por exemplo, uma dose de cerca de 10 UI/kg a cerca de 30 UI/kg, ou cerca de 20 UI/kg a cerca de 30 UI/kg, por exemplo, cerca de 10, 15, 20, 25, ou cerca de 30 UI/kg. Em uma modalidade, o caso de hemorragia é um caso de hemorragia moderada. Em outra modalidade, o caso de hemorragia é um caso importante de hemorragia.

[0044] Em uma modalidade, o agente de desvio é concentrado de complexo de protrombina ativado (aPCC). A quantidade terapêuticamente eficaz do aPCC pode ser menos que cerca de 100 U/kg, ou menos que cerca de 90 U/kg, ou menos que cerca de 80 U/kg, ou menos que cerca de 70 U/kg, ou menos que cerca de 60 U/kg, ou menos que cerca de 50 U/kg, ou menos que cerca de 40 U/kg, ou menos que cerca de 30 U/kg, ou menos que cerca de 20 U/kg ou menos que cerca de 10 U/kg. Em uma modalidade, a quantidade terapêuticamente eficaz do aPCC administrada ao indivíduo é de cerca de duas vezes a cerca de três vezes menor do que a quantidade eficaz recomendada do aPCC, por exemplo, uma dose de cerca de 30 a cerca de 50 U/kg. Em uma modalidade, o caso de hemorragia é um caso de hemorragia moderada. Em outra modalidade, o caso de hemorragia é um caso importante de hemorragia.

[0045] Em outra modalidade, o agente de desvio é fator VIIa recombinante (rFVIIa). A quantidade terapêuticamente eficaz do agente de desvio pode ser menos que cerca de 120 µg/kg, ou menos que cerca de 110 µg/kg, ou menos que cerca de 100 µg/kg, ou menos que cerca de 90 µg/kg, ou menos que cerca de 80 µg/kg, ou menos que cerca de 70 µg/kg, ou menos que cerca de 60 µg/kg, ou menos que cerca de 50 µg/kg, ou menos que cerca de 40 µg/kg, ou menos que cerca de 30 µg/kg ou menos que cerca de 20 µg/kg. Em uma

modalidade, a quantidade terapêuticamente eficaz do rFVIIa administrada ao indivíduo é de cerca de duas vezes menor do que a quantidade eficaz recomendada do rFVIIa, por exemplo, uma dose de cerca de 45 µg/kg. Em uma modalidade, o caso de hemorragia é um caso de hemorragia moderada. Em outra modalidade, o caso de hemorragia é um caso importante de hemorragia.

[0046] Em um aspecto, a presente invenção fornece um método de tratamento de um caso de hemorragia em um indivíduo com hemofilia A, hemofilia B ou hemofilia C, sem inibidores. Os métodos incluem a administração, por exemplo, por via subcutânea, ao indivíduo uma dose fixa de cerca de 80 mg de um agente de ácido ribonucléico (RNAi) de fita dupla que inibe a expressão de Serpinc1, onde o agente de RNAi de fita dupla compreende uma fita senso e uma fita antissenso, em que a fita senso compreende 5'-GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf – 3' (SEQ ID NO:13) e a fita antissenso compreende 5'- usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg – 3' (SEQ ID NO:14), sendo a, c, g e u são 2'-O-metil (2'-OMe) A, C, G, ou U; Af, Cf, Gf ou Uf são 2'-fluoro A, C, G ou U; e s é um acoplamento fosforotioato; e em que a extremidade 3' da fita senso está conjugada com o ligante, como mostra o seguinte esquema

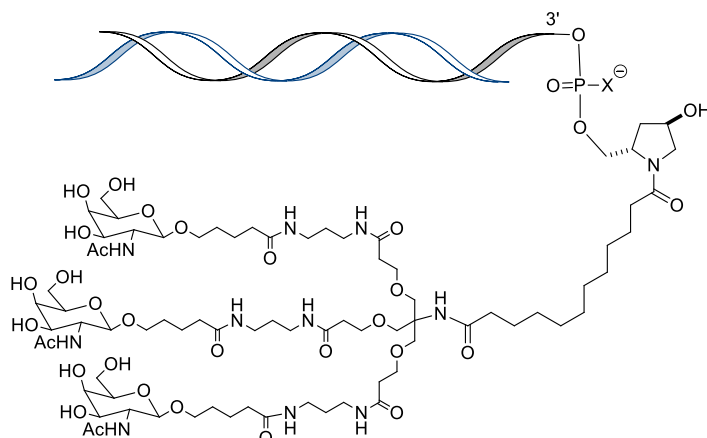


, em que X é O ou S; e a

administração ao indivíduo de uma quantidade terapêuticamente eficaz de um fator de substituição, onde a quantidade eficaz do fator de substituição é reduzida em comparação com a quantidade eficaz

recomendada do fator de substituição, de modo a tratar um caso de hemorragia no indivíduo tendo uma hemofilia sem inibidores.

[0047] Em outro aspecto, a presente invenção fornece um método de tratamento de um caso de hemorragia em um indivíduo com hemofilia A, hemofilia B ou hemofilia C, com inibidores. Os métodos incluem a administração, por exemplo, por via subcutânea, ao indivíduo uma dose fixa de cerca de 80 mg de um agente de ácido ribonucléico (RNAi) de fita dupla que inibe a expressão de Serpinc1, onde o agente de RNAi de fita dupla compreende uma fita senso e uma fita antissenso, em que a fita senso compreende 5'-GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf – 3' (SEQ ID NO:13) e a fita antissenso compreende 5'- usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg – 3' (SEQ ID NO:14), sendo a, c, g e u são 2'-O-metil (2'-OMe) A, C, G, ou U; Af, Cf, Gf ou Uf são 2'-fluoro A, C, G ou U; e s é um acoplamento fosforotioato; e em que a extremidade 3' da fita senso está conjugada com o ligante, como mostra o seguinte esquema



[0048] , em que X é O ou S; e a administração ao indivíduo de uma quantidade terapêuticamente eficaz de um agente de desvio, onde a quantidade eficaz do agente de desvio é reduzida em comparação com a quantidade eficaz recomendada do agente de desvio, de modo a tratar um caso de hemorragia no indivíduo tendo uma hemofilia com inibidores.

[0049] Em uma modalidade, uma dose fixa do agente de RNAi é

administrada ao indivíduo subcutaneamente.

[0050] Em uma modalidade, a dose fixa do agente de RNAi é administrada ao indivíduo uma vez por mês.

[0051] A hemofilia pode ser hemofilia A, hemofilia B ou hemofilia C.

### **Breve Descrição dos Desenhos**

[0052] A Figura 1A é um gráfico representando os efeitos de uma dose única subcutânea de 0,03 mg/kg de AT3SC-001 sobre os níveis de geração de trombina plasmática em um indivíduo humano saudável.

[0053] A Figura 1B é um gráfico representando os efeitos de uma dose única subcutânea de 0,03 mg/kg de AT3SC-001 sobre os níveis de geração de trombina plasmática em um indivíduo humano saudável.

[0054] A Figura 1C é um gráfico representando os efeitos de uma dose única subcutânea de 0,03 mg/kg de AT3SC-001 sobre os níveis de geração de trombina plasmática em um indivíduo humano saudável.

[0055] A Figura 1D é um gráfico representando os efeitos de uma dose única subcutânea de 0,03 mg/kg de AT3SC-001 sobre os níveis de geração de trombina plasmática em um indivíduo humano saudável.

[0056] A Figura 2A é um gráfico representando os efeitos de uma dose única subcutânea de 0,03 mg/kg de AT3SC-001 sobre os níveis de proteína AT (Serpinc1) plasmática em um indivíduo humano saudável.

[0057] A Figura 2B é um gráfico representando os efeitos de uma dose única subcutânea de 0,03 mg/kg de AT3SC-001 sobre os níveis de proteína AT (Serpinc1) plasmática em um indivíduo humano saudável.

[0058] A Figura 3 é um gráfico representando a associação entre a porcentagem inativação de AT (Serpinc1) e o aumento de porcentagem no pico de geração de trombina em indivíduos saudáveis administrados por uma única dose subcutânea de 0,03 mg/kg de AT3SC-001.

[0059] A Figura 4 é um gráfico representando os efeitos de várias doses de 0,015 mg/kg, 0,045 mg/kg ou 0,075 mg/kg de AT3SC-001 sobre os níveis de proteína AT (Serpinc1) plasmática em indivíduos humanos com hemofilia A ou B.

[0060] A Figura 5A é um gráfico representando os efeitos de várias doses de 0,225 mg/kg, 0,450 mg/kg, 0,900 mg/kg, 1,800 mg/kg, ou 80 mg de AT3SC-001 sobre os níveis de proteína AT (Serpinc1) plasmática em um indivíduos humano tendo hemofilia A ou B.

[0061] A Figura 5B é um gráfico representando o efeito dependente da dose de AT3SC-001 sobre os níveis de proteína AT (Serpinc1) plasmática em indivíduos humanos.

[0062] A Figura 6A é um gráfico representando o efeito de várias doses de 0,015 mg/kg ou 0,045 mg/kg de AT3SC-001 sobre os níveis de pico da trombina em indivíduos humanos com hemofilia A ou B.

[0063] A Figura 6B é um gráfico representando o efeito de várias doses de 0,015 mg/kg ou 0,045 mg/kg de AT3SC-001 sobre a geração de trombina como uma porcentagem de mudança em relação à avaliação inicial em indivíduos humanos com hemofilia A ou B.

[0064] A Figura 7 é um gráfico mostrando o efeito de várias doses de 0,045 mg/kg de AT3SC-001 no tempo de formação do coágulo, e no tempo de coagulação em um indivíduo com hemofilia A (indivíduo 101-009).

[0065] A Figura 8 é um gráfico mostrando a redução média máxima de AT pela dose equivalente mensal.

[0066] A Figura 9 é um gráfico mostrando o efeito de várias doses

de AT3SC-001 sobre a geração da trombina pela redução de AT em quartis.

[0067] Figura 10A é um gráfico representando a atividade de AT relativa em relação à percentagem do pico de geração de trombina alcançada com o Fator VIII conforme determinado em um indivíduo administrado com 225 mcg/kg qM de AT3SC-001.

[0068] A Figura 10B é um gráfico representando a atividade de AT relativa em relação à percentagem do pico de geração de trombina alcançada com Fator VIII conforme determinado em um indivíduo administrado com 1800 mcg/kg qM de AT3SC-001.

[0069] A Figura 10C é um gráfico representando a atividade de AT relativa em relação à percentagem do pico de geração de trombina alcançada com Fator VIII conforme determinado em um indivíduo administrado com 80 mg qM de AT3SC-001.

[0070] A Figura 11 é um gráfico mostrando o efeito de várias doses de AT3SC-001 sobre os casos hemorrágicos pela redução de AT em quartis.

[0071] A Figura 12 é uma tabela que mostra os dados de casos hemorrágicos para os indivíduos inscritos na Parte C do estudo clínico de Fase I de AT3SC-001.

[0072] Figura 13A é um gráfico que mostra a taxa de hemorragia anual média (ABR) antes do início do estudo, na parte inicial do estudo, e durante a parte de observação do estudo para todas as coortes de dosagem na Parte C do estudo clínico de Fase I de AT3SC-001.

[0073] A Figura 13B é um gráfico que mostra a taxa de hemorragia anual média (ABR) antes do início do estudo, na parte inicial do estudo, e durante a parte de observação do estudo para a coorte mensal de 80 mg (80 mg qM x3) na Parte C do estudo clínico de Fase I de AT3SC-001.

[0074] A Figura 14A é um gráfico representando a atividade de AT relativa em relação à percentagem do pico de geração de trombina alcançada com Fator VIII conforme determinado em um indivíduo inibidor administrado com uma dose fixa mensal de 50 mg de AT3SC-001.

[0075] A Figura 14B é um gráfico representando a atividade de AT relativa em relação à percentagem do pico de geração de trombina alcançada com Fator VIII conforme determinado em um indivíduo inibidor administrado com uma dose fixa mensal de 50 mg de AT3SC-001.

[0076] A Figura 14C é um gráfico representando a atividade de AT relativa em relação à percentagem do pico de geração de trombina alcançada com Fator VIII conforme determinado em um indivíduo inibidor administrado com uma dose fixa mensal de 50 mg de AT3SC-001.

[0077] A Figura 14D é um gráfico representando a atividade de AT relativa em relação à percentagem do pico de geração de trombina alcançada com Fator VIII conforme determinado em um indivíduo inibidor administrado com uma dose fixa mensal de 50 mg de AT3SC-001.

[0078] A Figura 14E é um gráfico representando a atividade de AT relativa em relação à percentagem do pico de geração de trombina alcançada com Fator VIII conforme determinado em um indivíduo inibidor administrado com uma dose fixa mensal de 50 mg de AT3SC-001.

[0079] A Figura 14F é um gráfico representando a atividade de AT relativa em relação à percentagem do pico de geração de trombina alcançada com Fator VIII conforme determinado em um indivíduo inibidor administrado com uma dose fixa mensal de 50 mg de AT3SC-001.

[0080] A Figura 15 é um gráfico representando o efeito de várias doses de 50 mg ou 80 mg de AT3SC-001 sobre a atividade média de AT (Serpinc1) em relação à avaliação inicial em indivíduos humanos com hemofilia A ou B com inibidores.

[0081] A Figura 16 é um gráfico mostrando que a redução do efeito de AT de várias doses de 50 mg de AT3SC-001 se correlaciona com aumento da geração de trombina em um indivíduo com hemofilia A.

[0082] A Figura 17A é uma tabela que mostra os dados de casos hemorrágicos para os indivíduos inscritos na Parte D do estudo clínico de Fase I de AT3SC-001.

[0083] Figura 17B é um gráfico que mostra a taxa de hemorragia anual média (ABR) antes do início do estudo, na parte inicial do estudo, e durante a parte de observação do estudo para todos os indivíduos na Parte D do estudo clínico de Fase I de AT3SC-001.

[0084] A Figura 18 é um gráfico representando o efeito de várias doses de 80 mg de AT3SC-001 sobre a atividade média de AT (Serpinc1) em relação à avaliação inicial em um indivíduo humano com hemofilia sem inibidores no estudo de extensão aberto (OLE) de Fase II de AT3SC-001.

[0085] A Figura 19A é um gráfico representando o efeito de várias doses de 50 mg ou 80 mg de AT3SC-001 sobre a atividade média de AT (Serpinc1) em relação à avaliação inicial em indivíduos humanos com hemofilia A ou B com ou sem inibidores no estudo de extensão aberto (OLE) de Fase II de AT3SC-001.

[0086] A Figura 19B é um gráfico representando o efeito de várias doses de 50 mg ou 80 mg de AT3SC-001 sobre o pico de geração de trombina em indivíduos humanos com hemofilia A ou B com ou sem inibidores no no estudo de extensão aberto (OLE) de Fase II de AT3SC-001. A parte sombreada do gráfico representa o alcance dos

níveis do pico de trombina observados em voluntários humanos sadios (HV) administrado com AT3SC-001 e com menos de 25% de inativação de AT no ensaio de Fase I de AT3SC-001 descrito no Exemplo 1. A linha tracejada através do intervalo de HV representa o nível médio do pico de trombina observado em voluntários humanos sadios (HV) e com menos de 25% de inativação de AT administrados com AT3SC-001 no ensaio de Fase I de AT3SC-001 descrito no Exemplo 1.

[0087] Figura 20A é um gráfico que mostra a taxa de hemorragia anual média (ABR) antes do início do estudo, na parte inicial do estudo, e durante a parte de observação do estudo para indivíduos com hemofilia A ou B sem inibidores dos indivíduos do estudo clínico OLE de Fase II de AT3SC-001.

[0088] Figura 20B é um gráfico que mostra a taxa de hemorragia anual média (ABR) antes do início do estudo, na parte inicial do estudo e durante a parte de observação do estudo para os indivíduos com hemofilia A ou B com inibidores dos indivíduos no estudo clínico OLE de Fase II de AT3SC-001.

[0089] A Figura 21 é uma tabela que mostra as características dos casos de hemorragia experimentados nos pacientes com hemofilia A ou B com ou sem inibidores no estudo clínico OLE de Fase II de AT3SC-001.

[0090] A Figura 22 é uma tabela que mostra a gestão de casos de hemorragia experimentados em pacientes com hemofilia A ou B sem inibidores no estudo clínico OLE de Fase II de AT3SC-001.

[0091] A Figura 23 é uma tabela que mostra as características dos casos de hemorragia experimentados em pacientes com hemofilia A ou B com inibidores no estudo clínico OLE de Fase II de AT3SC-001.

[0092] A Figura 24A é um gráfico que mostra o efeito de uma dose fixa mensal de 50 mg ou 80 mg de AT3SC-001 na quantidade de Fator

VIII necessária para gerenciar hemorragias em indivíduos com hemofilia A, sem inibidores.

[0093] A Figura 24B é um gráfico que mostra o efeito de uma dose fixa mensal de 50 mg ou 80 mg de AT3SC-001 na quantidade de Fator IX necessária para gerenciar hemorragias em indivíduos com hemofilia B, sem inibidores.

[0094] A Figura 24C é um gráfico que mostra o efeito de uma dose fixa mensal de 50 mg ou 80 mg de AT3SC-001 na quantidade de rFVIIa necessária para gerenciar hemorragias em indivíduos com hemofilia A ou B, com inibidores.

[0095] A Figura 24D é um gráfico que mostra o efeito de uma dose fixa mensal de 50 mg ou 80 mg de AT3SC-001 na quantidade de aPCC necessária para gerenciar hemorragias em indivíduos com hemofilia A ou B, com inibidores.

[0096] A Figura 25A é um gráfico representando o efeito da adição de aPCC sobre a geração da trombina em amostras de plasma de um indivíduo com hemofilia A com inibidores antes (linha inferior) e depois (linha superior) que o indivíduo foi administrado com AT3SC-001.

[0097] A Figura 25B é um gráfico representando o efeito da adição de rFVIIa sobre a geração da trombina em amostras de plasma de um indivíduo com hemofilia A com inibidores antes (linha inferior) e depois (linha superior) que o indivíduo foi administrado com AT3SC-001.

[0098] A Figura 26A é um gráfico representando o efeito da adição da aPCC sobre a geração da trombina em amostras de plasma de um indivíduo com hemofilia A sem inibidores antes (linha inferior) e depois (linha superior) que o indivíduo unto foi administrado de AT3SC-001.

[0099] A Figura 26B é um gráfico representando o efeito da adição de rFVIIa sobre a geração da trombina em amostras de plasma de um indivíduo com hemofilia A sem inibidores antes (linha inferior) e depois (linha superior) que o indivíduo foi administrado com AT3SC-001.

[00100] A Figura 26C é um gráfico representando o efeito da adição de aPCC sobre a geração da trombina em amostras de plasma de um indivíduo com hemofilia A sem inibidores antes (linha inferior) e depois (linha superior) que o indivíduo foi administrado com AT3SC-001.

[00101] A Figura 26D é um gráfico representando o efeito da adição de rFVIIa sobre a geração da trombina em amostras de plasma de um indivíduo com hemofilia A sem inibidores antes (linha inferior) e depois (linha superior) que o indivíduo unto foi administrado de AT3SC-001.

[00102] A Figura 26E é um gráfico representando o efeito da adição da aPCC sobre a geração da trombina em amostras de plasma de um indivíduo com hemofilia A sem inibidores antes (linha inferior) e depois (linha superior) que o indivíduo unto foi administrado de AT3SC-001.

[00103] A Figura 26F é um gráfico representando o efeito da adição de rFVIIa sobre a geração da trombina em amostras de plasma de um indivíduo com hemofilia A sem inibidores antes (linha inferior) e depois (linha superior) que o indivíduo unto foi administrado de AT3SC-001.

[00104] A Figura 26G é um gráfico representando o efeito da adição da aPCC sobre a geração da trombina em amostras de plasma de um indivíduo com hemofilia A sem inibidores antes (linha inferior) e depois (linha superior) que o indivíduo unto foi administrado de AT3SC-001.

[00105] A Figura 26H é um gráfico representando o efeito da adição de rFVIIa sobre a geração da trombina em amostras de plasma de um indivíduo com hemofilia A sem inibidores antes (linha inferior) e depois (linha superior) que o indivíduo unto foi administrado de AT3SC-001.

[00106] A Figura 26I é um gráfico representando o efeito da adição da aPCC sobre a geração da trombina em amostras de plasma de um indivíduo com hemofilia A sem inibidores antes (linha inferior) e depois (linha superior) que o indivíduo unto foi administrado de AT3SC-001.

[00107] A Figura 26J é um gráfico representando o efeito da adição de rFVIIa sobre a geração da trombina em amostras de plasma de um

indivíduo com hemofilia A sem inibidores antes (linha inferior) e depois (linha superior) que o indivíduo foi administrado com AT3SC-001.

[00108] A Figura 26K é um gráfico representando o efeito da adição da aPCC sobre a geração da trombina em amostras de plasma de um indivíduo com hemofilia A sem inibidores antes (linha inferior) e depois (linha superior) que o indivíduo unto foi administrado de AT3SC-001.

[00109] A Figura 26L é um gráfico representando o efeito da adição de rFVIIa sobre a geração da trombina em amostras de plasma de um indivíduo com hemofilia A sem inibidores antes (linha inferior) e depois (linha superior) que o indivíduo unto foi administrado de AT3SC-001.

[00110] A Figura 26M é um gráfico representando o efeito da adição da aPCC sobre a geração da trombina em amostras de plasma de um indivíduo com hemofilia A sem inibidores antes (linha inferior) e depois (linha superior) que o indivíduo unto foi administrado de AT3SC-001.

[00111] A Figura 26N é um gráfico representando o efeito da adição de rFVIIa sobre a geração da trombina em amostras de plasma de um indivíduo com hemofilia A sem inibidores antes (linha inferior) e depois (linha superior) que o indivíduo foi administrado com AT3SC-001.

[00112] A Figura 27A é um gráfico representando o efeito de várias doses de AT3SC-001 sobre a geração da trombina pela redução de AT em quartis no estudo de extensão aberto (OLE) de Fase I/II.

[00113] A Figura 27B é um gráfico representando o efeito simulado de várias doses de AT3SC-001 sobre a geração da trombina pela redução de AT em quartis.

[00114] A Figura 27C é um gráfico de dispersão representando a forte correlação entre o TG simulado (Figura 27B) e TG medido (Figura 27A).

[00115] A Figura 28A representa simulado em curvas de geração da trombina silício para vários níveis AT e 0,1% do Fator FVIII (simulando uma hemofilia grave).

[00116] A Figura 28B é uma representação do mapa de calor do pico de trombina em várias doses de Fator VIII (dose única) e nível de AT para hemofilia A grave.

[00117] A Figura 28C é uma representação do mapa de calor do pico de trombina em diversas doses FIX (dose única) e no nível de AT para hemofilia B grave.

[00118] A Figura 29A é um gráfico representando o potencial do pico simulado da trombina (nM) em função do tempo de 5, 10, 20 e 50 UI/kg do Fator FVIII com AT em 100%.

[00119] A Figura 29B é um gráfico representando o potencial de pico simulado da trombina (nM) em função do tempo de 5, 10, 20 UI/kg do Fator FVIII com AT em 20% da avaliação inicial.

### **Descrição Detalhada da Invenção**

[00120] A presente invenção é baseada, pelo menos em parte, na surpreendente descoberta de que, em indivíduos com hemofilia (por exemplo, hemofilia A, hemofilia B ou hemofilia C), sem inibidores, e administrados com uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma composição de iRNA que afeta a clivagem mediada pelo complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) de transcrições de RNA de um gene *Serpinc1*, um caso de hemorragia pode ser tratado com uma quantidade terapeuticamente eficaz de um fator de substituição, como Fator VIII ou Fator XI, que é menos que a quantidade eficaz que o recomendado do fator de substituição, por exemplo, recomendado pela Federação Mundial de Hemofilia (ver, por exemplo, Srivastava, et al. "Guidelines for the Management of Hemophilia", Hemophilia Epub 6 Julho 2012; DOI:10.1111/j.1365-2516.2012.02909.x; estando a totalidade de seu conteúdo aqui incorporada, a título de referência) e/ou a Food and Drug Administration (ver, por exemplo, a bula do produto ADVATE (fator anti-hemofílico (recombinante)); 11/2016; a bula do produto BeneFIX (Fator IX de coagulação (Recombinante));

11/2011; estando a totalidade de seu conteúdo aqui incorporada, a título de referência. Assim, a presente invenção fornece um método de tratamento de um caso de hemorragia em um indivíduo com hemofilia sem inibidores. O método inclui a administração ao indivíduo uma dose fixa de cerca de 30 mg a cerca de 90 mg de um agente de ácido ribonucléico (RNAi) de fita dupla que inibe a expressão de um *Serpinc1*, onde o agente de RNAi de fita dupla compreende uma fita senso e uma fita antissenso, a fita antissenso compreendendo uma região de complementaridade para um mRNA codificando um *Serpinc1* que compreende pelo menos 15 nucleotídeos contíguos que diferem em não mais de 3 nucleotídeos da sequência de nucleotídeos de 5' - UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG – 3' (SEQ ID NO: 15), onde praticamente todos os nucleotídeos da fita senso e substancialmente todos os nucleotídeos da fita antissenso são nucleotídeos modificados, e onde a fita senso está conjugada com um ligante anexado no 3'-terminal; e a administração ao indivíduo de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um fator de substituição, onde a quantidade eficaz do fator de substituição é reduzida em comparação com a quantidade eficaz recomendada do fator de substituição, de modo a tratar um caso de hemorragia no indivíduo tendo uma hemofilia sem inibidores.

[00121] Em outro aspecto, a presente invenção fornece um método de tratamento de um caso de hemorragia em um indivíduo com hemofilia sem inibidores. O método inclui a administração ao indivíduo uma dose fixa de cerca de 40 mg a cerca de 90 mg de um agente de ácido ribonucléico (RNAi) de fita dupla que inibe a expressão de um *Serpinc1*, onde o agente de RNAi de fita dupla compreende uma fita senso e uma fita antissenso, a fita antissenso compreendendo uma região de complementaridade para um mRNA codificando um *Serpinc1* que compreende pelo menos 15 nucleotídeos contíguos que

diferem em não mais de 3 nucleotídeos da sequência de nucleotídeos de 5' - UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG – 3' (SEQ ID NO: 15), onde praticamente todos os nucleotídeos da fita senso e substancialmente todos os nucleotídeos da fita antissenso são nucleotídeos modificados, e onde a fita senso está conjugada com um ligante anexado no 3'-terminal; e a administração ao indivíduo de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um fator de substituição, onde a quantidade eficaz do fator de substituição é reduzida em comparação com a quantidade eficaz recomendada do fator de substituição, de modo a tratar um caso de hemorragia no indivíduo tendo uma hemofilia sem inibidores.

[00122] A presente invenção também é baseada, pelo menos em parte, na descoberta de que, em indivíduos com hemofilia (por exemplo, hemofilia A, hemofilia B ou hemofilia C), com inibidores, e administrados com uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma composição de iRNA que afeta a clivagem mediada pelo complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) de transcrições de RNA de um gene *Serpinc1*, um caso de hemorragia pode ser tratado com uma quantidade terapeuticamente eficaz de um agente de desvio, como um complexo de protrombina ativado (aPCC) ou Fator VIIIa (rFVIIa) recombinante, que é menos que a quantidade eficaz que o recomendado do agente de desvio, por exemplo, recomendado pela Federação Mundial de Hemofilia (ver, por exemplo, Srivastava, et al. "Guidelines for the Management of Hemophilia", Hemophilia Epub 6 Julho 2012; DOI:10.1111/j.1365-2516.2012.02909.x) e/ou a Food and Drug Administration (ver, por exemplo, a bula do produto NovoSeven RT, Fator VIIA de coagulação (Recombinante); 07/2014; bula do produto FEIBA, complexo de coagulação anti-inibidor; 11/2013; estando a totalidade de seu conteúdo aqui incorporada, a título de referência).

[00123] Consequentemente, em outro aspecto, a presente invenção fornece um método de tratamento de um caso de hemorragia em um indivíduo com hemofilia com inibidores. Os métodos incluem a administração ao indivíduo uma dose fixa de cerca de 30 mg a cerca de 90 mg de um agente de ácido ribonucléico (RNAi) de fita dupla que inibe a expressão de Serpinc1, onde o agente de RNAi de fita dupla compreende uma fita senso e uma fita antissenso, a fita antissenso compreendendo uma região de complementaridade para um mRNA codificando a Serpinc1 que compreende pelo menos 15 nucleotídeos contíguos que diferem em não mais de 3 nucleotídeos da sequência de nucleotídeos de 5' - UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG – 3' (SEQ ID NO: 15), onde praticamente todos os nucleotídeos da fita senso e substancialmente todos os nucleotídeos da fita antissenso são nucleotídeos modificados, e onde a fita senso está conjugada com um ligante anexado no 3'-terminal; e a administração ao indivíduo de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um agente de desvio, onde a quantidade eficaz do agente de desvio é reduzida em comparação com a quantidade eficaz recomendada, por exemplo, aprovada pelo Food and Drug Administration, do agente de desvio, de modo a tratar um caso de hemorragia no indivíduo tendo uma hemofilia sem inibidores.

[00124] Em outro aspecto, a presente invenção fornece um método de tratamento de um caso de hemorragia em um indivíduo com hemofilia com inibidores. Os métodos incluem a administração ao indivíduo uma dose fixa de cerca de 40 mg a cerca de 90 mg de um agente de ácido ribonucléico (RNAi) de fita dupla que inibe a expressão de Serpinc1, onde o agente de RNAi de fita dupla compreende uma fita senso e uma fita antissenso, a fita antissenso compreendendo uma região de complementaridade para um mRNA codificando a Serpinc1 que compreende pelo menos 15 nucleotídeos

contíguos que diferem em não mais de 3 nucleotídeos da sequência de nucleotídeos de 5' - UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG – 3' (SEQ ID NO: 15), onde praticamente todos os nucleotídeos da fita senso e substancialmente todos os nucleotídeos da fita antissenso são nucleotídeos modificados, e onde a fita senso está conjugada com um ligante anexado no 3'-terminal; e a administração ao indivíduo de uma quantidade terapêuticamente eficaz de um agente de desvio, onde a quantidade eficaz do agente de desvio é reduzida em comparação com a quantidade eficaz recomendada, por exemplo, aprovada pelo Food and Drug Administration, do agente de desvio, de modo a tratar um caso de hemorragia no indivíduo tendo uma hemofilia sem inibidores.

[00125] Os agentes de iRNA para uso nos métodos da invenção, em geral, incluem uma fita de RNA (a fita antissenso), com uma região que é de cerca de 30 nucleotídeos ou menos de comprimento, por exemplo, 15-30, 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 ou 21-22 nucleotídeos de comprimento, cuja região é substancialmente complementar a pelo menos parte de uma transcrição do mRNA de um gene *Serpinc1*.

[00126] Em outras modalidades, uma ou ambas as fitas dos agentes de RNAi de fita dupla da invenção é de até 66 nucleotídeos de comprimento, por exemplo, 36-66, 26-36, 25-36, 31-60, 22-43, 27-53 nucleotídeos de comprimento, com uma região de pelo menos 19 nucleotídeos contíguos que é substancialmente complementar de, pelo menos, uma parte de uma transcrição do mRNA de um gene *Serpinc1*. Em algumas modalidades, as fitas senso e antissenso formam um

duplex de 18-30 nucleotídeos contíguos.

[00127] Em algumas modalidades, os agentes de iRNA para uso nos métodos da invenção incluem uma fita de RNA (a fita antissenso), que pode ser de até 66 nucleotídeos de comprimento, por exemplo, 36-66, 26-36, 25-36, 31-60, 22-43, 27-53 nucleotídeos de comprimento, com uma região de pelo menos 19 nucleotídeos contíguos que é substancialmente complementar de, pelo menos, uma parte de uma transcrição do mRNA de um gene *Serpinc1*. Em algumas modalidades, tais agentes de iRNA tendo maiores fitas antissenso de comprimento podem incluir uma segunda fita de RNA (a fita senso) de 20 a 60 nucleotídeos de comprimento em que as fitas senso e antissenso formam um duplex de 18-30 nucleotídeos contíguos.

[00128] A descrição detalhada a seguir revela como fazer e usar composições contendo iRNAs para inibir a expressão de um gene de *Serpinc1*, bem como composições, usos, e métodos para o tratamento de indivíduos com doenças e distúrbios que se beneficiariam de inibição e/ou a redução da expressão desse gene.

### **I. Definições**

[00129] Para que a presente invenção possa ser mais prontamente compreendida, certos termos são primeiro definidos. Além disso, deve notar-se que, sempre que um valor ou faixa de valores de um parâmetro são enumerados, pretende-se que os valores e faixas intermediários para os valores enumerados também destinam-se a ser parte desta invenção.

[00130] Os artigos "o/a" e "um/uma" são usados aqui para se referir a um ou a mais de um (ou seja, a pelo menos um) do objeto gramatical do artigo. A título de exemplo, "um elemento" significa um elemento ou mais de um elemento, por exemplo, uma pluralidade de elementos.

[00131] O termo "incluindo" é usado aqui para significar, e é usado

de forma intercambiável com, a frase "incluindo, mas não se limitando a".

[00132] O termo "ou" é usado aqui para significar, e é usado de forma intercambiável com o termo "e/ou", a menos que o contexto indique claramente o contrário.

[00133] Como usado aqui, "Serpinc1" refere-se a um polipeptídeo específico expressado em uma célula. Serpinc1 também é conhecido como inibidor de serpina peptidase, subtipo C; (antitrombina; AT), membro 1; antitrombina III; AT3; antitrombina; e heparina cofator 1. A sequência de uma transcrição do mRNA de Serpinc1 humano pode ser encontrada em, por exemplo, Genbank, nº de acesso GI:254588059 (NM\_000488; SEQ ID NO:1). A sequência de mRNA de Serpinc1 rhesus pode ser encontrada em, por exemplo, Genbank, nº de acesso GI:157167169 (NM\_001104583; SEQ ID NO:2). A sequência de mRNA de Serpinc1 de camundongo pode ser encontrada em, por exemplo, Genbank, nº de acesso GI:237874216 (NM\_080844; SEQ ID NO:3). A sequência de um mRNA de Serpinc1 de rato pode ser encontrada em, por exemplo, Genbank, nº de acesso GI:58865629 (NM\_001012027; SEQ ID NO:4).

[00134] O termo "Serpinc1" como usado aqui também se refere a um polipeptídeo específico expressado em uma célula por variações de sequência de DNA que ocorrem naturalmente do gene Serpinc1, como um polimorfismo de nucleotídeo único no gene Serpinc1. Numerosos SNPs dentro do gene Serpinc1 foram identificados e podem ser encontrados em, por exemplo, dbSNP NCBI (ver, por exemplo, [www.ncbi.nlm.nih.gov/snp](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp)). Exemplos não limitantes de SNPs dentro do gene Serpinc1 podem ser encontrados em dbSNP NCBI, N<sup>o</sup>s. De acesso rs677; rs5877; rs5878; rs5879; rs941988; rs941989; rs1799876; rs19637711; rs2008946; e rs2227586.

[00135] Como usado aqui, um "indivíduo" é um animal, como um

mamífero, incluindo um primata (como um humano, um primata não humano, como, por exemplo, um macaco e um chimpanzé), um não primata (como uma vaca, um porco, um camelo, uma lhama, um cavalo, uma cabra, um coelho, uma ovelha, um hamster, uma cobaia, um gato, um cachorro, um rato, um camundongo, um cavalo e uma baleia), ou um pássaro (por exemplo, um pato ou um ganso). Em uma modalidade, o indivíduo é um ser humano, como um ser humano sendo tratado ou avaliado para uma doença, um distúrbio ou uma condição que possa beneficiar de redução na expressão de Serpinc1; um ser humano em risco para uma doença, um distúrbio ou uma condição que possa se beneficiar de redução na expressão de Serpinc1; um ser humano com uma doença, um distúrbio ou uma condição que possa se beneficiar da redução na expressão de Serpinc1; e/ou ser humano sendo tratado para uma doença, um distúrbio ou uma condição que possa se beneficiar da redução na expressão de Serpinc1 conforme descrito neste documento.

[00136] Como usado aqui, os termos "tratar" ou "tratamento" se referem a um resultado benéfico ou desejado, incluindo, mas se não limitando a, alívio ou melhoria de um ou mais sintomas, diminuindo o grau de hemorragia, estado estabilizado (ou seja, não piora) de hemorragia, melhoria ou palição de hemorragia, se detectável ou indetectável, ou resolvendo a hemorragia. "Tratamento" pode significar também prolongar a sobrevivida em relação à sobrevivida esperada na ausência de tratamento. Nos métodos da invenção, o tratamento inclui a procura de tratamento e controle de episódios de hemorragia, manejo perioperatório de hemorragia e profilaxia de rotina para reduzir a frequência de episódios de hemorragia.

[00137] O termo "menor" no contexto do nível de um Serpinc1 em um indivíduo ou um marcador ou sintoma de doença refere-se a uma diminuição estatisticamente significativa em tal nível. A diminuição

pode ser, por exemplo, de pelo menos 10%, pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 35%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou mais, e é preferencialmente para um nível aceito como dentro da faixa de normal para um indivíduo sem tal distúrbio.

[00138] Como usado aqui, "prevenir" ou "prevenção", quando usado em referência a uma doença, um distúrbio ou uma condição da mesma, que se beneficiaria de uma redução da expressão de um gene *Sertpinc1*, refere-se a uma redução na probabilidade de que um indivíduo vai desenvolver um sintoma associado a tal doença, distúrbio ou condição, por exemplo, um sintoma como uma hemorragia. A probabilidade de desenvolver uma hemorragia é reduzida, por exemplo, quando um indivíduo com um ou mais fatores de risco para uma hemorragia ou falha em desenvolver uma hemorragia ou desenvolve uma hemorragia com menor gravidade em relação a uma população com fatores de risco e não recebendo tratamento conforme descrito neste documento. A incapacidade de desenvolver uma doença, um distúrbio ou uma condição, ou a redução no desenvolvimento de um sintoma associado como uma doença, um distúrbio ou uma condição (por exemplo, por, pelo menos, cerca de 10% em uma escala clinicamente aceitável para essa doença ou distúrbio), ou a exposição de atraso dos sintomas (por exemplo, por dias, semanas, meses ou anos) é considerado uma prevenção eficaz.

[00139] Como usado aqui, o termo "distúrbio hemorrágico" é uma doença ou um distúrbio que resulta em má coagulação do sangue e/ou sangramento excessivo. Um distúrbio hemorrágico pode ser uma desordem hereditária, como uma hemofilia e doença de von Willebrand, ou um distúrbio adquirido, associado com, por exemplo,

coagulação intravascular disseminada, eclâmpsia associada à gravidez, deficiência de vitamina K, um distúrbio auto-imune, doença inflamatória intestinal, colite ulcerativa, uma desordem dermatológica (por exemplo, a psoríase, pênfigo), uma doença respiratória (por exemplo, asma, doença pulmonar obstrutiva crônica), uma reação alérgica medicamentosa, por exemplo, o resultado de medicamentos, como aspirina, heparina e warfarina, diabetes, infecção por hepatite B aguda, infecção por hepatite C aguda, uma malignidade ou tumor sólido (por exemplo, próstata, pulmão, cólon, pâncreas, estômago, ducto biliar, cabeça e pescoço, colo uterino, mama, melanoma, rim, e/ou de uma malignidade hematológica). Em uma modalidade, um distúrbio hemorrágico hereditário é uma hemofilia, por exemplo, hemofilia A, B ou C. Em uma modalidade, um indivíduo com um distúrbio hemorrágico hereditário, como, por exemplo, uma hemofilia, desenvolveu inibidores, por exemplo, inibidores aloanticorpo para substituir terapias da coagulação e é aqui referido como um "indivíduo inibidor". Em uma modalidade, o indivíduo inibidor tem hemofilia A. Em outra modalidade, o indivíduo inibidor tem hemofilia B. Em ainda outra modalidade, o indivíduo inibidor tem hemofilia C.

[00140] Em uma modalidade, um distúrbio hemorrágico é um distúrbio hemorrágico raro (RBD). Um RBD pode ser um RBD adquirido ou um RBD hereditário. RBDs hereditários incluem distúrbios associados a deficiências dos fatores de coagulação fibrinogênio, FII, FV, FV combinado e FVIII, FVII, FX, FXI, FXIII, e deficiência congênita de fatores dependentes de vitamina K (VKCFDs). Eles são geralmente transmitidos como condições autossômicas recessivas, embora, em alguns casos, como, por exemplo, FXI e disfibrinogenemia, pode ser dominante autossômico. RBDs são relatados na maioria das populações, com uma incidência homozigota ou heterozigota dupla variando de 1 em 500.000 para deficiência de

FVII a 1 em 2 a 3 milhões para deficiências de FXIII e protrombina. Frequência relativa varia entre as populações, sendo maior onde uniões consanguíneas ou endogâmicas são comuns, com aumento da frequência de genes mutantes específicos.

[00141] RBDs exemplificadores incluem afibrinogenemia (fibrinogênio, deficiência do Fator I); hipofibrinogenemia (fibrinogênio, deficiência do Fator I); disfibrinogenemia (fibrinogênio; deficiência do Fator I); hipodisfibrinogenemia (fibrinogênio; deficiência do Fator I); hipoprotrombinemia (protrombina; deficiência do Fator II); deficiência de protrombina (protrombina; deficiência do Fator II); trombofilia (protrombina; deficiência do Fator II); deficiência congênita de antitrombina III (tromboplastina; Fator III; fator tecidual); parahemofilia (proaccelerina; Fator V; fator lábil); Doença de Owren (proaccelerina; Fator V; fator lábil); resistência à proteína C ativada (proaccelerina; Fator V; fator lábil); Doença de Alexander (fator estável proconvertina; fator VII); deficiência congênita de proconvertina/Fator VII (fator estável proconvertina; Fator VII); deficiência de Stuart-Prower (fator Stuart-Prower; Fator X); deficiência congênita do Fator XIIIa/b (é fator estabilizador de fibrina; Fator XIII); deficiência herdada do Fator XIII (fator estabilizador de fibrina; Fator XIII); e deficiência do Fator estabilizador de fibrina (fator estabilizador de fibrina; Fator XIII).

[00142] "Quantidade terapeuticamente eficaz", conforme usado neste documento, destina-se a incluir a quantidade de um agente de RNAi que, quando administrada a um indivíduo com um distúrbio hemorrágico e hemorragia, é suficiente para afetar o tratamento da doença (por exemplo, diminuindo, melhorando ou mantendo a doença existente ou um ou mais sintomas da doença). A "quantidade terapeuticamente eficaz" pode variar dependendo do agente de RNAi, como o agente é administrado, a doença e sua gravidade e a história, idade, peso, histórico familiar, composição genética, os tipos de

tratamentos concomitante ou anteriores, se houver, e outras características individuais do indivíduo a ser tratado.

[00143] “Quantidade profilaticamente eficaz”, conforme usado aqui, destina-se a incluir a quantidade de um iRNA que, quando administrado a um indivíduo com um distúrbio hemorrágico, mas não com sangramento, por exemplo, um indivíduo com um distúrbio hemorrágico e programado para cirurgia (por exemplo, tratamento perioperatório), é suficiente para prevenir ou atenuar a doença ou a um ou mais sintomas da doença. Atenuar a doença inclui retardar o curso da doença ou redução da severidade da doença com desenvolvimento posterior. A “quantidade profilaticamente eficaz” pode variar dependendo do RNAi, como o agente é administrado, o grau do risco da doença e a história, idade, peso, histórico familiar, composição genética, os tipos de tratamentos concomitante ou anteriores, se houver, e outras características individuais do paciente a ser tratado.

[00144] “Uma quantidade terapeuticamente eficaz” ou “quantidade profilaticamente eficaz” também inclui uma quantidade de agente de RNAi que produz algum efeito local ou sistêmico desejado em uma razoável razão de benefício/risco aplicável a qualquer tratamento. O iRNA empregado nos métodos da presente invenção pode ser administrado em uma quantidade suficiente para produzir uma razão razoável de benefício/risco aplicável a esse tipo de tratamento.

[00145] A “quantidade terapeuticamente eficaz de um fator de substituição” e a “quantidade terapeuticamente eficaz recomendada de um agente de desvio” são as doses de fator de substituição ou agente de desvio, respectivamente, suficiente para gerar trombina e resolver uma hemorragia e/ou suficiente para alcançar um nível de pico de fator plasmático em um indivíduo com uma hemorragia como fornecido pela Federação Mundial de Hemofilia (ver, por exemplo, Srivastava, et al.

“Guidelines for the Management of Hemophilia”, Hemophilia Epub 6 Julho 2012; DOI:10.1111/j.1365-2516.2012.02909.x; a bula do produto ADVATE (fator anti-hemofílico (Recombinante)); 11/2016; e a bula do produto BeneFIX (Fator IX de coagulação (Recombinante)); 11/2011. Todo o conteúdo de cada um dos anteriores estão aqui incorporados, a título de referência.

[00146] Por exemplo, a dose recomendada do fator de substituição ou agente de desvio para um indivíduo com uma pequena hemorragia é a dose suficiente para alcançar o nível do pico plasmático do fator VIII de cerca de 10 a 40 UI/dL; a dose recomendada de fator de substituição ou agente de desvio para um indivíduo com uma hemorragia moderada é a dose suficiente para alcançar um nível do pico plasmático do Fator VIII de cerca de 30 a 60 UI/dL, a dose recomendada de fator de substituição ou agente de desvio para um indivíduo com uma grande hemorragia é a dose suficiente para alcançar o nível do pico plasmático do Fator VIII de cerca de 60 a 100 UI/dL, a dose recomendada de fator de substituição ou agente de desvio de um indivíduo é a dose perioperatoriamente suficiente para alcançar um nível do pico plasmático do Fator VIII de cerca de 30 a 60 UI/dL (ver, por exemplo, Tabelas 1 e 2 e a bula do produto ADVATE (fator anti-hemofílico (recombinante)); 11/2016).

[00147] A dose recomendada de fator de substituição ou agente de desvio para um indivíduo com uma pequena hemorragia é a dose suficiente para alcançar o nível do pico plasmático do Fator IX de cerca de 10 a 30 UI/dL, a dose recomendada de fator de substituição ou agente de desvio para um indivíduo com uma hemorragia moderada é a dose suficiente para alcançar o nível do pico plasmático do Fator IX de cerca de 25 a 50 UI/dL, a dose recomendada de fator de substituição ou agente de desvio para um indivíduo com uma grande hemorragia é a dose suficiente para alcançar o nível do pico

plasmático do Fator IX de cerca de 50 a 100 UI/dL.

[00148] A frase "farmaceuticamente aceitável" é utilizada aqui para se referir a esses compostos, materiais, composições, e/ou que formas de dosagem que são, no escopo do julgamento médico, adequados para o uso em contato com os tecidos de indivíduos humanos e animais sem excesso de toxicidade, irritação, reação alérgica, ou outro problema ou complicação, compatível com uma relação risco/benefício razoável.

[00149] A frase "carreador farmaceuticamente aceitável", como usado aqui, significa um material farmaceuticamente aceitável, composição ou veículo, como o enchimento líquido ou sólido, diluente, excipiente, auxiliar de fabricação (por exemplo, lubrificante, talco magnésio, cálcio e estearato de zinco, ácido estérico), ou material encapsulando o solvente, envolvido no carregamento ou transporte do composto do indivíduo de um órgão, ou parte do corpo, para outro órgão ou parte do corpo. Cada carreador tem que ser "aceitável" no senso de ser compatível com os outros ingredientes da composição e não deletério para o indivíduo sendo tratado. Alguns exemplos de materiais que podem servir como veículos farmaceuticamente aceitáveis incluem: (1) açúcares, como lactose, glicose e sacarose; (2) amidos, como o amido de milho e amido de batata; (3) celulose, e seus derivados, como a carboximetilcelulose de sódio, etil celulose e acetato de celulose; (4) tragacanto em pó; (5) malte; (6) gelatina; (7) agentes lubrificantes, como estado de magnésio, lauril sulfato de sódio e talco; (8) excipientes, como manteiga de cacau e ceras supositórias; (9) óleos, como óleo de amendoim, óleo de algodão, óleo de cártamo, óleo de gergelim, azeite, óleo de milho e óleo de soja; (10) glicóis, como propileno glicol; (11) poliois, como glicerina, sorbitol, manitol e polietilenoglicol; (12) ésteres, como oleato de etila e laurato de etila; (13) ágar; (14) agentes de tamponamento, como, por exemplo,

hidróxido de magnésio e hidróxido de alumínio; (15) ácido algínico; (16) água livre de pirogênios; (17) solução salina isotônica; (18) solução de Ringer; (19) álcool etílico; (20) soluções tampão de pH; (21) poliésteres, policarbonatos e/ou polianidridos; (22) agentes de volume, como polipeptídeos e aminoácidos (23), componente de soro, como albumina sérica, HDL e LDL; e (22) outras substâncias compatíveis não tóxicas empregadas em formulações farmacêuticas.

[00150] Neste documento, "sequência-alvo" refere-se a uma porção contígua da sequência de nucleotídeos de uma molécula de mRNA formada durante a transcrição de um gene *Serpinc1*, incluindo mRNA que é um produto de processamento de RNA de um produto de transcrição primária. Em uma modalidade, a parte alvo da sequência será, pelo menos, suficientemente longa para servir como substrato para a clivagem iRNA-dirigida em ou perto da parte da sequência de nucleotídeos de uma molécula de mRNA formada durante a transcrição de um gene *Serpinc1*.

[00151] A sequência-alvo pode ser de cerca de 9 a 36 nucleotídeos de comprimento, por exemplo, cerca de 15 a 30 nucleotídeos de comprimento. Por exemplo, a sequência-alvo pode ser de cerca de 15 a 30 nucleótidos, 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 ou 21-22 nucleotídeos em comprimento. Faixas e comprimentos intermediários para as faixas e comprimentos enumerados acima também estão previstos para ser parte da invenção.

[00152] Como usado aqui, o termo "fita compreendendo uma sequência" refere-se a um oligonucleotídeo compreendendo uma

cadeia de nucleotídeos que é descrita pela referida sequência usando o padrão de nomenclatura de nucleotídeos.

[00153] "G", "C", "A", "T" e "U", cada um geralmente representa um nucleotídeo contendo guanina, citosina, adenina, timidina e uracila como base, respectivamente. No entanto, será entendido que o termo "ribonucleotídeo" ou "nucleotídeo" também pode se referir a um nucleotídeo modificado, conforme detalhado abaixo, ou uma porção de substituição (ver, por exemplo, Tabela 1). O versado na técnica está bem ciente de que a guanina, citosina, adenina e uracila podem ser substituídas por outras porções sem alterar substancialmente as propriedades de emparelhamento de bases de um oligonucleotídeo compreendendo um nucleotídeo carregando tal porção de substituição. Por exemplo, sem limitação, um nucleotídeo compreendendo inosina como sua base pode emparelhar a base com nucleotídeos contendo adenina, citosina ou uracila. Assim, nucleotídeos contendo uracila, guanina ou adenina podem ser substituídos nas sequências de nucleotídeos de dsRNA com destaque na invenção por um nucleotídeo contendo, por exemplo, inosina. Em outro exemplo, a adenina e a citosina em qualquer lugar do oligonucleotídeo pode ser substituída com guanina e uracila, respectivamente, para formar o emparelhamento de bases G-U Wobble com o mRNA alvo. Sequências contendo tais porções de substituição são adequadas para as composições e métodos destacados na invenção.

[00154] Os termos "iRNA", "agente de RNAi," "agente de iRNA", "agente de interferência de RNA", usados como sinônimos neste documento, se referem a um agente que contém RNA como o termo é definido aqui, e que media a clivagem alvo de uma transcrição de RNA através de uma via do complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC). O iRNA direciona a degradação específica de sequência do mRNA através de um processo conhecido como interferência de RNA

(RNAi). O iRNA modula, por exemplo, inibe a expressão de *Serpinc1* em uma célula, por exemplo, uma célula dentro de um indivíduo, como um indivíduo mamífero.

[00155] Em uma modalidade, o agente de RNAi da invenção inclui um RNA de fita simples que interage com uma sequência de RNA alvo, como, por exemplo, uma sequência de mRNA alvo de *Serpinc1*, para direcionar a clivagem do RNA alvo. Sem o desejo de se vincular à teoria, acredita-se que RNA de fita dupla longa introduzido em células é decomposto por um tipo de siRNA por uma endonuclease tipo III, conhecida como Dicer (Sharp et al. (2001) *Genes Dev.* 15:485). Dicer, uma enzima tipo ribonuclease-III, processa o dsRNA em RNAs interferentes de 19 a 23 par de bases com duas saliências características de base 3' (Bernstein et al., (2001) *Nature* 409:363). Os siRNAs são então incorporados em um complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) onde uma ou mais helicases desenrola o duplex siRNA, permitindo que a fita antissenso complementar guie o reconhecimento alvo (Nykanen, et al., (2001) *Cell* 107:309). Na ligação ao mRNA alvo apropriado, uma ou mais endonucleases dentro do RISC cliva o alvo para induzir o silenciamento (Elbashir, et al., (2001) *Genes Dev.* 15:188). Assim, em um aspecto, a invenção refere-se a um RNA de fita simples (siRNA) gerado dentro de uma célula e que promove a formação de um complexo RISC para efetivar o silenciamento do gene alvo, ou seja, um gene *Serpinc1*. Por conseguinte, o termo "siRNA" também é usado aqui para se referir a uma RNAi como descrito acima.

[00156] Em outra modalidade, o agente RNAi pode ser um siRNA de fita simples que é introduzido em uma célula ou um organismo para inibir um mRNA alvo. Agentes RNAi de fita simples se ligam a endonuclease RISC, Argonaute 2, que cliva o mRNA alvo. Os siRNAs de fita simples são geralmente de 15 a 30 nucleotídeos e são

quimicamente modificados. O design e teste de siRNAs de fita simples são descritos na Patente US Nº 8.101.348 e em Lima et al., (2012) Cell 150: 883-894, cada uma das quais está aqui incorporada, a título de referência. Qualquer uma das sequências de nucleotídeos antissenso descritas aqui podem ser usadas como um siRNA de fita simples como descrito aqui ou como quimicamente modificado pelos métodos descritos em Lima et al., (2012) Cell 150:883-894.

[00157] Em outra modalidade, um "iRNA" para uso em composições, usos, e métodos da invenção é um RNA de fita dupla e é aqui referido como um "agente RNAi de fita dupla", "molécula de RNA de fita dupla (dsRNA)", "agente dsRNA" ou "dsRNA". O termo "dsRNA", refere-se a um complexo de moléculas de ácido ribonucléico, tendo uma estrutura duplex compreendendo duas fitas anti-paralelas e substancialmente complementares de ácido nucleico, referido como tendo orientações "senso" e "antissenso" com relação a um RNA alvo, ou seja, um gene *Serpinc1*. Em algumas modalidades da invenção, um RNA de fita dupla (dsRNA) provoca a degradação de uma RNA alvo como, por exemplo, um mRNA, através de um mecanismo pós-transcricional de silenciamento de genes referido aqui como RNA de interferência ou RNAi.

[00158] Em geral, a maioria dos nucleotídeos de cada fita de uma molécula de dsRNA são ribonucleotídeos, mas, como descrito em detalhes aqui, cada uma ou ambos as fitas também pode incluir um ou mais não ribonucleotídeos, como, por exemplo, um desoxirribonucleotídeo e/ou um nucleotídeo modificado. Além disso, como usado neste pedido, um "agente RNAi" pode incluir ribonucleotídeos com modificações químicas; um agente de RNAi pode incluir modificações substanciais em vários nucleotídeos.

[00159] Como usado aqui, o termo "nucleotídeo modificado" refere-se a um nucleotídeo tendo, de forma independente, uma porção de

açúcar modificada, um acoplamento de internucleotídeo modificado, e/ou uma nucleobase modificada. Assim, o termo nucleotídeos modificados englobam substituições, adições ou remoção de, por exemplo, um grupo funcional ou átomo, para acoplamentos internucleosídeos, porções de açúcar ou nucleobases. As modificações adequadas para uso dos agentes da invenção incluem todos os tipos de modificações descritas aqui ou conhecidas na técnica. Tais alterações, como usado em uma molécula do tipo siRNA, são abrangidas pelo "agente RNAi" para os efeitos do presente relatório e reivindicações.

[00160] A região duplex pode ser de qualquer comprimento que permite a degradação específica de uma RNA alvo desejado através de uma via de RISC, e podem variar de cerca de 9 a 36 pares de base em comprimento, por exemplo, cerca de 15 a 30 pares de base em comprimento, por exemplo, cerca de 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, ou 36 pares de base em comprimento, como cerca de 15-30, 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 ou 21-22 pares de base em comprimento. Faixas e comprimentos intermediários para as faixas e comprimentos enumerados acima também estão previstos para ser parte da invenção.

[00161] As duas fitas que formam a estrutura duplex podem ser diferentes porções de uma molécula de RNA maior, ou elas podem ser moléculas de RNA separadas. Onde as duas fitas são parte de uma molécula maior, e, portanto, estão ligadas por uma cadeia ininterrupta

de nucleotídeos entre a extremidade 3' de uma fita e a extremidade 5' da outra fita formando a estrutura duplex, a cadeia de RNA de conexão é referida como um "laço em forma de grampo (hairpin)". Um laço em forma de grampo pode compreender, pelo menos, um nucleotídeo não pareado. Em algumas modalidades, o laço em forma de grampo compreende pelo menos 2, pelo menos 3, pelo menos 4, pelo menos 5, pelo menos 6, pelo menos 7, pelo menos 8, pelo menos 9, pelo menos 10, pelo menos 20, ou pelo menos 23 nucleotídeos geneticamente modificados.

[00162] Onde as duas fitas substancialmente complementares de dsRNA são compreendidas por diferentes moléculas de RNA, essas moléculas não precisam, mas podem ser ligadas covalentemente. Onde as duas fitas estão ligadas covalentemente por outros meios que não uma cadeia ininterrupta de nucleotídeos entre a extremidade 3' de uma fita e a extremidade 5' da outra fita formando a estrutura duplex, a estrutura de conexão é referida como um "ligante". As fitas de RNA podem ter o mesmo ou um número diferente de nucleotídeos. O número máximo de pares de base é o número de nucleotídeos na menor fita do dsRNA menos quaisquer saliências que estão presentes no duplex. Além da estrutura duplex, o RNAi pode incluir uma ou mais saliências de nucleotídeos.

[00163] Em uma modalidade, um agente de RNAi da invenção inclui um dsRNA de 24 a 30 nucleotídeos que interage com uma sequência de RNA alvo, como, por exemplo, uma sequência de mRNA alvo de *Serpinc1*, para direcionar a clivagem do RNA alvo. Sem o desejo de se vincular à teoria, o RNA de fita dupla longa introduzido em células é decomposto por um tipo de siRNA por uma endonuclease tipo III, conhecida como Dicer (Sharp et al. (2001) *Genes Dev.* 15:485). Dicer, uma enzima tipo ribonuclease-III, processa o dsRNA em RNAs interferentes de 19 a 23 par de bases com duas saliências

características de base 3' (Bernstein et al., (2001) Nature 409:363). Os siRNAs são então incorporados em um complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) onde uma ou mais helicases desenrola o duplex siRNA, permitindo que a fita antissenso complementar guie o reconhecimento alvo (Nykanen, et al., (2001) Cell 107:309). Na ligação ao mRNA alvo apropriado, uma ou mais endonucleases dentro do RISC cliva o alvo para induzir o silenciamento (Elbashir, et al., (2001) Genes Dev. 15:188).

[00164] Como usado aqui, o termo "saliência de nucleotídeo" refere-se a pelo menos um nucleotídeo sem par que se projeta a partir da estrutura duplex de um iRNA, por exemplo, um dsRNA. Por exemplo, quando uma extremidade 3' de uma fita de dsRNA se estende além da extremidade 5' da outra fita, ou vice-versa, há uma saliência de nucleotídeos. Um dsRNA pode compreender uma saliência de pelo menos um nucleotídeo; em alternativa, a saliência pode compreender pelo menos dois nucleotídeos, pelo menos três nucleotídeos, pelo menos quatro nucleotídeos, pelo menos cinco nucleotídeos ou mais. Uma saliência de nucleotídeos pode compreender ou consistir em um análogo de nucleotídeo/nucleosídeo, incluindo um desoxirribonucleotídeo/nucleosídeo. A saliência(s) pode(m) ser na fita senso, na fita antissenso ou qualquer combinação destas. Além disso, o(s) nucleotídeo(s) de uma saliência pode estar presente na extremidade 5', 3' ou ambas as extremidades de uma fita antissenso ou senso de um dsRNA.

[00165] Em uma modalidade, a fita antissenso de um dsRNA tem um nucleotídeo 1-10, por exemplo, um 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 nucleotídeo, saliência na extremidade 3' e/ou 5'. Em uma modalidade, a fita senso de um dsRNA tem um nucleotídeo 1-10, por exemplo, um 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 nucleotídeo, saliência na extremidade 3' e/ou 5'. Em outra modalidade, um ou mais dos nucleotídeos na

saliência é substituído por um tiofosfato de nucleosídeo.

[00166] Em certas modalidades, a saliência na fita senso ou fita antissenso, ou ambos, pode incluir comprimentos estendidos mais longos que 10 nucleotídeos, por exemplo, 10-30 nucleotídeos, 10-25 nucleotídeos, 10-20 nucleotídeos ou 10-15 nucleotídeos de comprimento. Em certas modalidades, uma saliência estendida é na fita senso do duplex. Em certas modalidades, uma saliência estendida está presente na extremidade 3' da fita senso do duplex. Em certas modalidades, uma saliência estendida está presente na extremidade 5' da fita senso do duplex. Em certas modalidades, uma saliência estendida é na fita antissenso do duplex. Em certas modalidades, uma saliência estendida está presente na extremidade 3' da fita antissenso do duplex. Em certas modalidades, uma saliência estendida está presente na extremidade 5' da fita antissenso do duplex. Em certas modalidades, um ou mais dos nucleotídeos na saliência estendida é substituído por um tiofosfato de nucleosídeo.

[00167] "Cega" ou "extremidade cega" significa que existem nucleotídeos não pareados na extremidade do agente RNAi de fita dupla, ou seja, nenhuma saliência de nucleotídeos. Um RNAi com "extremidade cega" é um dsRNA que tem fita dupla encajado ao longo de todo o seu comprimento, ou seja, nenhuma saliência de nucleotídeo em qualquer extremidade da molécula. Os agentes RNAi da invenção incluem agentes RNAi com saliências de nucleotídeos em uma extremidade (ou seja, agentes com uma saliência e uma extremidade cega) ou com saliências de nucleotídeos em ambas as extremidades.

[00168] O termo "fita antissenso" ou "fita guia" refere-se à fita de um iRNA, como, por exemplo, um dsRNA, que inclui uma região que é substancialmente complementar a uma sequência-alvo, por exemplo, um mRNA de *Serpinc1*. Como usado aqui, o termo "região de

complementaridade" refere-se à região na fita antissenso que é substancialmente complementar a uma sequência, por exemplo, uma sequência-alvo, por exemplo, uma sequência de nucleotídeo de *Serpinc1*, conforme definido aqui. Quando a região de complementaridade não é totalmente complementar à sequência-alvo, os não pareamentos podem ser nas regiões internas ou terminais da molécula. Geralmente, os não pareamentos mais tolerados estão nas regiões terminais, por exemplo, dentro de 5, 4, 3, ou 2 nucleotídeos do terminal 5' e/ou 3' do iRNA.

[00169] O termo "fita senso," ou "fita passageira" como usado aqui, refere-se à fita de um iRNA que inclui uma região que é substancialmente complementar a uma região da fita antissenso, como é esse termo definido aqui.

[00170] Como usado aqui, o termo "região de clivagem" refere-se a uma região que está localizada imediatamente adjacente ao sítio de clivagem. O sítio de clivagem, é o sítio sobre o alvo em que ocorre a clivagem. Em algumas modalidades, a região de clivagem compreende três bases em cada extremidade do, e imediatamente adjacente ao, sítio de clivagem. Em algumas modalidades, a região de clivagem compreende duas bases em cada extremidade de, e imediatamente adjacente ao, sítio de clivagem. Em algumas modalidades, ao sítio de clivagem ocorre especificamente no sítio ligado por nucleotídeos 10 e 11 da fita antissenso, e a região de clivagem compreende nucleotídeos 11, 12 e 13.

[00171] Como usado aqui, e salvo indicação em contrário, o termo "complementar", quando usado para descrever uma primeira sequência de nucleotídeos em relação a uma segunda sequência de nucleotídeos, refere-se à capacidade de um oligonucleotídeo ou polinucleotídeo compreendendo a primeira sequência de nucleotídeos hibridizar e formar uma estrutura duplex sob determinadas condições

com um oligonucleotídeo ou polinucleotídeo compreendendo a segunda sequência de nucleotídeos, como será compreendido pelo versado na técnica. Tais condições podem ser, por exemplo, condições rigorosas, onde as condições rigorosas podem incluir: 400 mM NaCl, 40 mM PIPES pH 6,4, 1 mM EDTA, 50°C ou 70°C por 12-16 horas seguido por lavagem (ver, por exemplo, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook, et al. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press). Outras condições, como condições fisiologicamente relevantes que podem ser encontradas dentro de um organismo, podem se aplicar. O versado na técnica será capaz de determinar o conjunto de condições mais adequadas para um teste de complementaridade de duas sequências de acordo com a melhor aplicação dos nucleotídeos hibridizados.

[00172] Sequências complementares dentro de um iRNA, por exemplo, dentro de um dsRNA, conforme descrito aqui incluem emparelhamento de base do oligonucleotídeo ou polinucleotídeo compreendendo uma primeira sequência de nucleotídeo a um oligonucleotídeo ou polinucleotídeo compreendendo uma segunda sequência de nucleotídeo ao longo de todo o comprimento de uma ou de ambas as sequências de nucleotídeo. Essas sequências podem ser referidas como "totalmente complementar" em relação umas as outras aqui. No entanto, quando uma primeira sequência é referida como "substancialmente complementar" em relação a uma segunda sequência aqui, as duas sequências podem ser totalmente complementares, ou podem formar um ou mais, mas geralmente não mais de 5, 4, 3 ou 2 pares de base não pareados mediante a hibridação para um duplex de até 30 pares de base, enquanto mantém a capacidade de hibridizar sob as condições mais relevantes para sua melhor aplicação, por exemplo, inibição da expressão do gene através de uma via de RISC. No entanto, onde dois oligonucleotídeos são

concebidos para formar, mediante hibridação, um ou mais saliências de fita simples, tais saliências não devem ser consideradas como não pareamento no que diz respeito à determinação de complementaridade. Por exemplo, um dsRNA compreendendo um oligonucleotídeo de 21 nucleotídeos de comprimento e outro oligonucleotídeo de 23 nucleotídeos de comprimento, onde o oligonucleotídeo mais longo compreende uma sequência de 21 nucleotídeos que é totalmente complementar ao oligonucleotídeo mais curto, pode ainda ser referido como "totalmente complementar" para os propósitos descritos aqui.

[00173] Sequências "complementares", conforme usado aqui, pode também incluir ou ser formada inteiramente de pares de bases não Watson-Crick e/ou pares de base formados a partir de nucleotídeos modificados e não natural, na medida em que os requisitos acima com respeito à sua capacidade de hibridizar estão cumpridos. Tais pares de base não Watson-Crick incluem, mas não estão limitados a, pareamento de bases Wobble ou Hoogstein G:U.

[00174] Os termos "complementar", "totalmente complementar" e "substancialmente complementar" aqui pode ser usado em relação ao pareamento de base entre a fita senso e a fita antissenso de um dsRNA, ou entre a fita antissenso de um agente de iRNA e uma sequência-alvo, como será entendido a partir do contexto do seu uso.

[00175] Como usado aqui, um polinucleotídeo que é "substancialmente complementar a pelo menos parte de" um RNA mensageiro (mRNA) refere-se a um polinucleotídeo que é substancialmente complementar a uma porção contígua do mRNA de interesse (por exemplo, um mRNA que codifica Serpinc1). Por exemplo, um polinucleotídeo é complementar a, pelo menos, uma parte de um mRNA de Serpinc1 se a sequência for substancialmente complementar a uma porção não interrompida de um mRNA1

codificando Serpinc1.

[00176] Assim, em algumas modalidades, os polinucleotídeos de fita antissenso descritos aqui são totalmente complementar à sequência alvo de Serpinc1. Em outras modalidades, os polinucleotídeos de fita antissenso descritos aqui são substancialmente complementar à sequência alvo de Serpinc1 e compreendem uma sequência de nucleotídeos contíguos que é, pelo menos, cerca de 80% complementar ao longo de todo o comprimento à região equivalente da sequência de nucleotídeos da SEQ ID NO:1 ou um fragmento da SEQ ID NO:1, como cerca de 85%, cerca de 86%, cerca de 87%, cerca de 88%, cerca de 89%, cerca de 90%, cerca de 91%, cerca de 92%, cerca de 93%, cerca de 94%, cerca de 95%, cerca de 96%, cerca de 97%, cerca de 98% ou cerca de 99% complementares.

[00177] Em uma modalidade, o agente RNAi da invenção inclui uma fita senso que é substancialmente complementar a um polinucleotídeo antissenso que, por sua vez, é complementar à sequência alvo de Serpinc1, e onde o polinucleotídeo de fita senso compreende uma sequência de nucleotídeos contíguos que é, pelo menos, cerca de 80% complementar ao longo de todo o comprimento à região equivalente da sequência de nucleotídeos da SEQ ID NO:5 ou um fragmento de qualquer uma das SEQ ID NO:5, como, por exemplo, cerca de 85%, cerca de 86%, cerca de 87%, cerca de 88%, cerca de 89%, cerca de 90%, cerca de 91%, cerca de 92%, cerca de 93%, cerca de 94%, cerca de 95%, cerca de 96%, cerca de 97%, cerca de 98% ou cerca de 99% complementares.

[00178] Em um aspecto da invenção, um agente para uso nos métodos e nas composições da invenção é uma molécula de RNA de fita simples antissenso que inibe um mRNA alvo através de um mecanismo de inibição antissenso. A molécula de RNA de fita simples

antissenso é complementar a uma sequência com o mRNA alvo. Os oligonucleotídeos de fita simples antissenso podem inibir a translação em uma forma estequiométrica por emparelhamento de bases ao mRNA e obstruindo fisicamente a máquina de translação, ver Dias, N. et al., (2002) Mol Cancer Ther. 1:347-355. A molécula de RNA de fita simples antis-senso pode ser de cerca de 15 a cerca de 30 nucleotídeos de comprimento e têm uma sequência que é complementar a uma sequência-alvo. Por exemplo, a molécula de RNA de fita simples antisense pode compreender uma sequência que é, pelo menos, de cerca de 15, 16, 17, 18, 19, 20, ou mais nucleotídeos contíguos a partir de qualquer uma das sequências antissenso descritas aqui.

[00179] O termo "inibição", conforme usado aqui, é usado de forma intercambiável com "redução", "silenciamento", "regulação negativa", "supressão" e outros termos similares, e inclui qualquer nível de inibição.

[00180] A frase "inibição da expressão de um Serpinc1", conforme usado aqui, inclui a inibição da expressão de qualquer gene Serpinc1 (como, por exemplo, um gene Serpinc1 de camundongo, um gene Serpinc1 de rato, um gene Serpinc1 de macaco, ou de um gene Serpinc1 humano), bem como variantes ou mutantes de um gene Serpinc1 que codifica uma proteína Serpinc1.

[00181] "Inibição da expressão de um gene Serpinc1" inclui qualquer nível de inibição de um gene Serpinc1, por exemplo, pelo menos supressão parcial da expressão de um gene Serpinc1, como uma inibição por, pelo menos, cerca de 5%, pelo menos cerca de 10%, pelo menos cerca de 15%, pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 25%, pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 35%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 45%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 55%, pelo menos cerca de 60%,

pelo menos cerca de 65%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 75%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 85%, pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 91%, pelo menos cerca de 92%, pelo menos cerca de 93%, pelo menos cerca de 94%, pelo menos cerca de 95%, pelo menos cerca de 96%, pelo menos cerca de 97%, pelo menos cerca de 98%, ou, pelo menos, cerca de 99%.

[00182] A expressão de um gene *Serpinc1* pode ser avaliada com base no nível de qualquer variável associada com a expressão do gene *Serpinc1*, por exemplo, nível de mRNA de *Serpinc1*, nível de proteína de *Serpinc1*, ou, por exemplo, níveis do complexo trombina:antitrombina como uma medida de potencial de geração de trombina, tempo de sangramento, tempo de protrombina (TP), contagem de plaquetas, e/ou tempo de tromboplastina parcial ativada (aPTT). A inibição pode ser avaliada por uma diminuição de um nível absoluto ou relativo de uma ou mais dessas variáveis em comparação com um nível de controle. O nível de controle pode ser qualquer tipo de controle, que é usado na técnica, por exemplo, um nível de base de pré-dose, ou um determinado nível de um indivíduo similar, célula, ou amostra que é não tratada ou tratada com um controle (como, por exemplo, controle só com tampão ou controle de agente inativo).

[00183] Em uma modalidade, pelo menos supressão parcial da expressão de um gene *Serpinc1* é avaliada por uma redução da quantidade de mRNA de *Serpinc1*, que pode ser isolado ou detectado em uma primeira célula ou grupo de células em que um gene *Serpinc1* é transcrito e que tenha ou tenham sido tratados de tal forma que a expressão de um gene *Serpinc1* é inibida, em comparação a uma segunda célula ou grupo de células, substancialmente idêntico a primeira célula ou grupo de células, mas que tem ou não foram tratados (células controle). O grau de inibição pode ser expressado

em termos de

(mRNA em células controle) – (mRNA em células tratadas) X 100%  
(mRNA em células controles)

[00184] A frase "colocar a célula em contato com um agente RNAi," como um dsRNA, como usado aqui, inclui contactar uma célula por quaisquer meios possíveis. Colocar uma célula em contato com um agente RNAi inclui colocar uma célula in vitro em contato com o iRNA ou colocar uma célula in vivo em contato com o iRNA. O contato pode ser feito direta ou indiretamente. Assim, por exemplo, o agente RNAi pode ser colocado em contato físico com a célula pelo indivíduo que executa o método, ou, em alternativa, o agente RNAi pode ser colocado em uma situação que permita ou faça com que subsequentemente entre em contato com a célula.

[00185] Contactando uma célula in vitro pode ser feito, por exemplo, incubando a célula com o agente RNAi. Contactando uma célula in vivo pode ser feito, por exemplo, injetando o agente RNAi em ou perto do tecido quando a célula está localizada, ou pela injeção do agente RNAi em outra área, por exemplo, na corrente sanguínea ou no espaço subcutâneo, de tal forma que o agente irá subsequente alcançar o tecido onde a célula a ser contactada está localizada. Por exemplo, o agente RNAi pode conter e/ou ser acoplado a um ligante, por exemplo, GalNAc3, que direciona o agente RNAi para um sítio de interesse, por exemplo, o fígado. Combinações de métodos in vitro e in vivo para contatar também são possíveis. Por exemplo, uma célula pode também ser colocada em contato in vitro com um agente RNAi e, subsequente, transplantada para um indivíduo.

[00186] Em uma modalidade, colocar uma célula em contato com um iRNA inclui "introduzir" ou "entregar o iRNA na célula", facilitando ou afetando a ingestão ou absorção dentro da célula. Absorção ou

ingestão de um iRNA pode ocorrer através de seus processos celulares ativos ou difusivos, ou por agentes auxiliares ou dispositivos. A introdução de um iRNA em uma célula pode ser *in vitro* e/ou *in vivo*. Por exemplo, para introdução *in vivo*, o iRNA pode ser injetado em um tecido local ou administrado sistemicamente. A aplicação *in vivo* pode ser feita também por um sistema de aplicação de beta-glucano, como aquelas descritas nas patentes US nºs 5.032.401 e 5.607.677 e patente dos EUA Nº 2005/0281781, estando a totalidade de seu conteúdo aqui incorporada, a título de referência, Introdução *in vitro* em uma célula inclui métodos conhecidos na técnica, como a eletroporação e lipofecção. Outras abordagens são descritas aqui abaixo e/ou são conhecidas na técnica.

## **II. Métodos da Invenção**

[00187] A presente invenção fornece métodos terapêuticos para tratar um caso de hemorragia em indivíduos com uma hemofilia (por exemplo, hemofilia A, hemofilia B ou hemofilia C), que inclui administrar ao indivíduo um agente de iRNA ou uma composição farmacêutica compreendendo um agente de iRNA da invenção, por exemplo, em uma quantidade que reduz a atividade de Serpinc1 no indivíduo por cerca de 75% ou mais, e um fator de substituição ou um agente de desvio em uma quantidade terapêuticamente eficaz que é reduzida, em comparação à quantidade terapêuticamente eficaz recomendada do fator de substituição ou do agente de desvio, por exemplo, recomendado pela Federação Mundial de Hemofilia (ver, por exemplo, Srivastava, et al. "Guidelines for the Management of Hemophilia", Hemophilia Epub 6 Julho 2012; DOI:10.1111/j.1365-2516.2012.02909.x) e/ou a Food and Drug Administration (ver, por exemplo, a bula do produto ADVATE (fator anti-hemofílico (recombinante)); 11/2016; a bula do produto BeneFIX (Fator IX de coagulação (Recombinante); 11/2011) (por exemplo, uma quantidade

suficiente para gerar trombina e resolver uma hemorragia (formar um coágulo). Todo o conteúdo de cada um dos anteriores estão aqui incorporados, a título de referência.

[00188] Como descrito nos exemplos abaixo, foi surpreendentemente descoberto que, em indivíduos com uma hemofilia, por exemplo, hemofilia A, hemofilia B ou hemofilia C, com ou sem inibidores, a administração de um agente RNAi que inibe a expressão de Serpinc1 em uma quantidade que reduz a atividade de Serpinc1 no indivíduo por cerca de 75% ou mais, reduz a taxa de hemorragia anual média e a taxa de hemorragia anual espontânea e que a hemorragia pode ser gerenciada (trombina é gerada e a hemorragia é resolvida) com um fator de substituição ou agente de desvio em uma quantidade terapêuticamente eficaz que é reduzida em comparação com a quantidade terapêuticamente eficaz recomendada do fator de substituição ou agente de desvio.

[00189] Fatores de substituição adequados para uso nos métodos da invenção incluem Fator VIII, por exemplo, Advate, Eloctate, Haemate, Helixate, Immunate, Octanate, Recombinate e Refacto ou Fator IX, por exemplo, Aimafix, Benefix, Immunine e Refacto. Agentes de desvio adequados para uso nos métodos da invenção incluem concentrados de complexo protrombínico ativado (aPCC), por exemplo, FEIBA e Prothromplex, e fator VII recombinante (rFVIIa), por exemplo, NovoSeven.

[00190] O fator de substituição pode ser o Fator VIII e a quantidade terapêuticamente eficaz do fator de substituição administrado ao indivíduo nos métodos da invenção é uma dose suficiente para alcançar o nível do pico plasmático do Fator VIII de cerca de 10-100 UI/dL, por exemplo, cerca de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 ou cerca de 100 UI/dL.

[00191] Por exemplo, a quantidade terapêuticamente eficaz do fator

de substituição do Fator VIII administrada ao indivíduo pode ser menos que 200 UI/kg, ou menos que cerca de 190 UI/kg, ou menos que cerca de 180 UI/kg, ou menos que cerca de 170 UI/kg, ou menos que cerca de 160 UI/kg, ou menos que cerca de 150 UI/kg, ou menos que cerca de 140 UI/kg, ou menos que cerca de 130 UI/kg, ou menos que cerca de 120 UI/kg, ou menos que cerca de 110 UI/kg, ou menos que cerca de 100 UI/kg, ou menos que cerca de 90 UI/kg, ou menos que cerca de 80 UI/kg, ou menos que cerca de 70 UI/kg, ou menos que cerca de 60 UI/kg, ou menos que cerca de 50 UI/kg, ou menos que cerca de 40 UI/kg, ou menos que 30 UI/kg, ou menos que cerca de 20 UI/kg, ou menos que cerca de 10 UI/kg. Em uma modalidade, a quantidade terapêuticamente eficaz do Fator VIII administrada ao indivíduo é de cerca de uma vez e meia a cerca de cinco vezes menor do que a quantidade eficaz recomendada do fator de substituição, por exemplo, como uma dose de cerca de 5 UI/kg a cerca de 20 UI/kg, ou cerca de 10 UI/kg a cerca de 20 UI/kg, por exemplo, 5, 10, 15, ou 20 UI/kg. Em uma modalidade, o caso de hemorragia é um caso de hemorragia moderada. Em outra modalidade, o caso de hemorragia é um caso importante de hemorragia.

[00192] O fator de substituição pode ser o Fator IX e a quantidade terapêuticamente eficaz do fator de substituição administrado ao indivíduo nos métodos da invenção é uma dose suficiente para alcançar o nível do pico plasmático do Fator IX de cerca de 10-100 UI/dL, por exemplo, cerca de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 ou cerca de 100 UI/dL.

[00193] Por exemplo, a quantidade terapêuticamente eficaz do fator de substituição do Fator IX pode ser menos que 200 UI/kg, ou menos que cerca de 190 UI/kg, ou menos que cerca de 180 UI/kg, ou menos que cerca de 170 UI/kg, ou menos que cerca de 160 UI/kg, ou menos que cerca de 150 UI/kg, ou menos que cerca de 140 UI/kg, ou menos

que cerca de 130 UI/kg, ou menos que cerca de 120 UI/kg, ou menos que cerca de 110 UI/kg, ou menos que cerca de 100 UI/kg, ou menos que cerca de 90 UI/kg, ou menos que cerca de 80 UI/kg, ou menos que cerca de 70 UI/kg, ou menos que cerca de 60 UI/kg, ou menos que cerca de 50 UI/kg, ou menos que cerca de 40 UI/kg, ou menos que 30 UI/kg, ou menos que cerca de 20 UI/kg, ou menos que cerca de 10 UI/kg. Em uma modalidade, a quantidade terapêuticamente eficaz do Fator IX administrada ao indivíduo é de cerca de duas vezes a cerca de seis vezes menor do que a quantidade eficaz recomendada do fator de substituição, por exemplo, uma dose de cerca de 10 UI/kg a cerca de 30 UI/kg, ou cerca de 20 UI/kg a cerca de 30 UI/kg, como cerca de 10, 15, 20, 25, ou cerca de 30 UI/kg. Em uma modalidade, o caso de hemorragia é um caso de hemorragia moderada. Em outra modalidade, o caso de hemorragia é um caso importante de hemorragia.

[00194] O agente de desvio pode ser aPCC e a quantidade terapêuticamente eficaz do agente de desvio administrada ao indivíduo nos métodos da invenção é uma dose suficiente para gerar trombina e resolver uma hemorragia.

[00195] Por exemplo, a quantidade terapêuticamente eficaz do agente de desvio aPCC pode ser menos que cerca de 100 U/kg, ou menos que cerca de 90 U/kg, ou menos que cerca de 80 U/kg, ou menos que cerca de 70 U/kg, ou menos que cerca de 60 U/kg, ou menos que cerca de 50 U/kg, ou menos que cerca de 40 U/kg, ou menos que cerca de 30 U/kg, ou menos que cerca de 20 U/kg ou menos que cerca de 10 U/kg. Em uma modalidade, a quantidade terapêuticamente eficaz de aPCC administrada ao indivíduo é de cerca de duas vezes a cerca de três vezes menor do que a quantidade eficaz recomendada do fator de substituição, por exemplo, uma dose de cerca de 30 UI/kg a cerca de 50 UI/kg, como cerca de 30, 35, 40, 45

ou 50 UI/kg. Em uma modalidade, o caso de hemorragia é um caso de hemorragia moderada. Em outra modalidade, o caso de hemorragia é um caso importante de hemorragia.

[00196] O agente de desvio pode ser rFVIIa e a quantidade terapêuticamente eficaz do agente de desvio administrada ao indivíduo nos métodos da invenção é uma dose suficiente para gerar trombina e resolver uma hemorragia.

[00197] Por exemplo, a quantidade terapêuticamente eficaz do agente de desvio rFVIIa é menos que cerca de 120 µg/kg, ou menos que cerca de 110 µg/kg, ou menos que cerca de 100 µg/kg, ou menos que cerca de 90 µg/kg, ou menos que cerca de 80 µg/kg, ou menos que cerca de 70 µg/kg, ou menos que cerca de 60 µg/kg, ou menos que cerca de 50 µg/kg, ou menos que cerca de 40 µg/kg, ou menos que cerca de 30 µg/kg ou menos que cerca de 20 µg/kg. Em uma modalidade, a quantidade terapêuticamente eficaz do rFVIIa administrada ao indivíduo é de cerca de duas vezes menor do que a quantidade eficaz recomendada do fator de substituição, por exemplo, uma dose de cerca de 45 µg/kg. Em uma modalidade, o caso de hemorragia é um caso de hemorragia moderada. Em outra modalidade, o caso de hemorragia é um caso importante de hemorragia.

[00198] Em algumas modalidades, o agente de RNAi é administrado a uma dose fixa de entre cerca de 25 mg a cerca de 100 mg, por exemplo, entre cerca de 25 mg a cerca de 95 mg, entre cerca de 25 mg a cerca de 90 mg, entre cerca de 25 mg a cerca de 85 mg, entre cerca de 25 mg a cerca de 80 mg, entre cerca de 25 mg a cerca de 75 mg, entre cerca de 25 mg a cerca de 70 mg, entre cerca de 25 mg a cerca de 65 mg, entre cerca de 25 mg a cerca de 60 mg, entre cerca de 25 mg a cerca de 50 mg, entre cerca de 50 a cerca de 100 mg, entre cerca de 50 mg a cerca de 95 mg, entre cerca de 50 mg a

cerca de 90 mg, entre cerca de 50 mg a cerca de 85 mg, entre cerca de 50 mg a cerca de 80 mg, entre cerca de 30 a cerca de 100 mg, entre cerca de 30 mg a cerca de 90 mg, entre cerca de 30 mg a cerca de 80 mg, entre cerca de 40 a cerca de 100 mg, entre cerca de 40 mg a cerca de 90 mg, entre cerca de 40 mg a cerca de 80 mg, entre cerca de 60 a cerca de 100 mg, entre cerca de 60 mg a cerca de 90 mg, entre cerca de 25 mg a cerca de 55 mg, entre cerca de 25 mg a cerca de 65 mg, entre cerca de 30 mg a cerca de 95 mg, entre cerca de 30 mg a cerca de 85 mg, entre cerca de 30 mg a cerca de 75 mg, entre cerca de 30 mg a cerca de 65 mg, entre cerca de 30 mg a cerca de 55 mg, entre cerca de 40 mg a cerca de 95 mg, entre cerca de 40 mg a cerca de 85 mg, entre cerca de 40 mg a cerca de 75 mg, entre cerca de 40 mg a cerca de 65 mg, entre cerca de 40 mg a cerca de 55 mg, ou entre cerca de 45 mg a cerca de 95 mg.

[00199] Em algumas modalidades, o agente de RNAi é administrado em uma dose fixa de cerca de 25 mg, cerca de 30 mg, cerca de 35 mg, cerca de 40 mg, cerca de 45 mg, cerca de 50 mg, cerca de 55 mg, cerca de 60 mg, cerca de 65 mg, cerca de 70 mg, cerca de 75 mg, cerca de 80 mg, cerca de 85 mg, cerca de 90 mg, cerca de 95 mg ou cerca de 100 mg.

[00200] Em uma modalidade, o agente de RNAi é administrado ao indivíduo a uma dose que diminui a atividade de Serpinc1 por cerca de 75% ou mais.

[00201] Consequentemente, em um aspecto, a presente invenção fornece um método de tratamento de um caso de hemorragia em um indivíduo com hemofilia sem inibidores. O método inclui a administração ao indivíduo uma dose fixa de cerca de 30 mg a cerca de 90 mg de um agente de ácido ribonucléico (RNAi) de fita dupla que inibe a expressão de um Serpinc1 (por exemplo, uma quantidade que reduz a atividade de Serpinc1 no indivíduo em cerca de 75% ou mais),

onde o agente de RNAi de fita dupla compreende uma fita senso e uma fita antissenso, a fita antissenso compreendendo uma região de complementaridade para um mRNA codificando um Serpinc1 que compreende pelo menos 15 nucleotídeos contíguos que diferem em mais de 3 nucleotídeos da sequência de nucleotídeos de 5' - UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG - 3' (SEQ ID NO: 15), onde praticamente todos os nucleotídeos da fita senso e substancialmente todos os nucleotídeos da fita antissenso são nucleotídeos modificados, e onde a fita senso está conjugada com um ligante anexado no 3'-terminal; e a administração ao indivíduo de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um fator de substituição, onde a quantidade eficaz do fator de substituição é reduzida em comparação com a quantidade eficaz recomendada do fator de substituição (por exemplo, uma quantidade suficiente para alcançar o nível do pico plasmático do Fator VIII de cerca de 10-100 IU/dL (por exemplo, uma dose de menos de cerca de 200 UI/kg do Fator VIII, por exemplo, uma dose de cerca de 5 a cerca de 20 UI/kg do Fator VIII); ou uma quantidade suficiente para alcançar o nível do pico plasmático do Fator IX de cerca de 10-100 UI/dl (por exemplo, uma dose de menos de cerca de 200 UI/kg do Fator IX, por exemplo, uma dose de cerca de 10 a cerca de 30 UI/kg do Fator IX)), de modo a tratar um caso de hemorragia no indivíduo tendo uma hemofilia sem inibidores.

[00202] Em outro aspecto, a presente invenção fornece um método de tratamento de um caso de hemorragia em um indivíduo com hemofilia com inibidores. O método inclui a administração ao indivíduo uma dose fixa de cerca de 30 mg a cerca de 90 mg de um agente de ácido ribonucléico (RNAi) de fita dupla que inibe a expressão de Serpinc1 (por exemplo, uma quantidade que reduz a atividade de Serpinc1 no indivíduo em cerca de 75% ou mais), onde o agente de RNAi de fita dupla compreende uma fita senso e uma fita antissenso, a

fita antissenso compreendendo uma região de complementaridade para um mRNA codificando um Serpinc1 que compreende pelo menos 15 nucleotídeos contíguos que diferem em mais de 3 nucleotídeos da sequência de nucleotídeos de 5' - UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG - 3' (SEQ ID NO: 15), onde praticamente todos os nucleotídeos da fita senso e substancialmente todos os nucleotídeos da fita antissenso são nucleotídeos modificados, e onde a fita senso está conjugada com um ligante anexado no 3'-terminal; e a administração ao indivíduo de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um agente de desvio, onde a quantidade eficaz do agente de desvio é reduzida em comparação com a quantidade eficaz recomendada do agente de desvio (por exemplo, uma quantidade suficiente para gerar trombina e resolver uma hemorragia, por exemplo, uma dose de menos de cerca de 100 U/kg de aPCC (por exemplo, uma dose de cerca de 30 a 50 U/kg de aPCC); uma dose de menos de cerca de 120 µg/kg de rFVIIa (por exemplo, uma dose de cerca de 45 µg/kg de rFVIIa)), de modo a tratar um caso de hemorragia no indivíduo tendo uma hemofilia com inibidores.

[00203] Em outro aspecto, a presente invenção fornece um método de tratamento de um caso de hemorragia em um indivíduo com hemofilia sem inibidores. O método inclui a administração ao indivíduo uma dose fixa de cerca de 40 mg a cerca de 90 mg de um agente de ácido ribonucléico (RNAi) de fita dupla que inibe a expressão de um Serpinc1 (por exemplo, uma quantidade que reduz a atividade de Serpinc1 no indivíduo em cerca de 75% ou mais), onde o agente de RNAi de fita dupla compreende uma fita senso e uma fita antissenso, a fita antissenso compreendendo uma região de complementaridade para um mRNA codificando um Serpinc1 que compreende pelo menos 15 nucleotídeos contíguos que diferem em mais de 3 nucleotídeos da sequência de nucleotídeos de 5' -

UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG – 3' (SEQ ID NO: 15), onde praticamente todos os nucleotídeos da fita senso e substancialmente todos os nucleotídeos da fita antissenso são nucleotídeos modificados, e onde a fita senso está conjugada com um ligante anexado no 3'-terminal; e a administração ao indivíduo de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um fator de substituição, onde a quantidade eficaz do fator de substituição é reduzida em comparação com a quantidade eficaz recomendada do fator de substituição (por exemplo, uma quantidade suficiente para alcançar o nível do pico plasmático do Fator VIII de cerca de 10-100 IU/dL (por exemplo, uma dose de menos de cerca de 200 UI/kg do Fator VIII, por exemplo, uma dose de cerca de 5 a cerca de 20 UI/kg do Fator VIII); ou uma quantidade suficiente para alcançar o nível do pico plasmático do Fator IX de cerca de 10-100 UI/dl (por exemplo, uma dose de menos de cerca de 200 UI/kg do Fator IX, por exemplo, uma dose de cerca de 10 a cerca de 30 UI/kg do Fator IX)), de modo a tratar um caso de hemorragia no indivíduo tendo uma hemofilia sem inibidores.

[00204] Em outro aspecto, a presente invenção fornece um método de tratamento de um caso de hemorragia em um indivíduo com hemofilia com inibidores. O método inclui a administração ao indivíduo uma dose fixa de cerca de 40 mg a cerca de 90 mg de um agente de ácido ribonucléico (RNAi) de fita dupla que inibe a expressão de Serpinc1 (por exemplo, uma quantidade que reduz a atividade de Serpinc1 no indivíduo em cerca de 75% ou mais), onde o agente de RNAi de fita dupla compreende uma fita senso e uma fita antissenso, a fita antissenso compreendendo uma região de complementaridade para um mRNA codificando um Serpinc1 que compreende pelo menos 15 nucleotídeos contíguos que diferem em mais de 3 nucleotídeos da sequência de nucleotídeos de 5' - UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG – 3' (SEQ ID NO: 15), onde

praticamente todos os nucleotídeos da fita senso e substancialmente todos os nucleotídeos da fita antissenso são nucleotídeos modificados, e onde a fita senso está conjugada com um ligante anexado no 3'-terminal; e a administração ao indivíduo de uma quantidade terapêuticamente eficaz de um agente de desvio, onde a quantidade eficaz do agente de desvio é reduzida em comparação com a quantidade eficaz recomendada do agente de desvio (por exemplo, uma quantidade suficiente para gerar trombina e resolver uma hemorragia, por exemplo, uma dose de menos de cerca de 100 U/kg de aPCC (por exemplo, uma dose de cerca de 30 a 50 U/kg de aPCC); uma dose de menos de cerca de 120 µg/kg de rFVIIa (por exemplo, uma dose de cerca de 45 µg/kg de rFVIIa)), de modo a tratar um caso de hemorragia no indivíduo tendo uma hemofilia com inibidores.

[00205] Em um aspecto a presente invenção fornece um agente de ácido ribonucléico (RNAi) de fita dupla que inibe a expressão de um *Serpinc1* adequado para administração a um indivíduo uma dose fixa de cerca de 30 mg a 90 mg (por exemplo, uma quantidade que reduz a atividade de *Serpinc1* no indivíduo por cerca de 75% ou mais); e um fator de substituição adequado para a administração de um indivíduo em uma dose que é reduzida em comparação com a quantidade terapêuticamente eficaz recomendada do fator de substituição (por exemplo, uma quantidade suficiente para alcançar um nível de pico plasmático do Fator VIII de cerca de 10-100 UI/dL (por exemplo, uma dose de menos de cerca de 200 UI/kg de Fator VIII, por exemplo, uma dose de cerca de 5 a cerca de 20 UI/kg do Fator VIII); ou uma quantidade suficiente para alcançar o nível do pico plasmático do Fator IX de cerca de 10-100 UI/dl (por exemplo, uma dose de menos de cerca de 200 UI/kg do fator IX, por exemplo, uma dose de cerca de 10 a cerca de 30 UI/kg do Fator IX)) para uso em um método ou tratamento de um caso de hemorragia em um indivíduo com uma

hemofilia, por exemplo, hemofilia A, hemofilia B ou hemofilia C, sem inibidores. O agente RNAi compreende uma fita senso e uma fita antissenso, a fita antissenso compreendendo uma região de complementaridade para um *Serpinc1* que codifica um mRNA1 que compreende pelo menos 15 nucleotídeos contíguos diferente em não mais de 3 nucleotídeos da sequência de nucleotídeos 5' - UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG - 3' (SEQ ID NO: 15), onde praticamente todos os nucleotídeos da fita senso e substancialmente todos os nucleotídeos da fita antissenso são nucleotídeos modificados, e onde a fita senso está conjugada com um ligante fixado no 3'-terminal.

[00206] Em outro aspecto a presente invenção fornece um agente de ácido ribonucléico (RNAi) de fita dupla que inibe a expressão de um *Serpinc1* adequado para administração a um indivíduo uma dose fixa de cerca de 30 mg a 90 mg (por exemplo, uma quantidade que reduz a atividade de *Serpinc1* no indivíduo por cerca de 75% ou mais); e um agente de desvio adequado para a administração de um indivíduo em uma dose que é reduzida em comparação com a quantidade terapêuticamente eficaz recomendada do fator de substituição (por exemplo, uma quantidade suficiente para gerar trombina e resolver uma hemorragia, por exemplo, uma dose de menos de cerca de 100 U/kg de aPCC (por exemplo, uma dose de cerca de 30 a 50 U/kg de um aPCC); uma dose de menos de cerca de 120  $\mu$ g/kg de rFVIIa (por exemplo, uma dose de cerca de 45  $\mu$ g/kg de rFVIIa)), para uso em um método ou tratamento de um caso de hemorragia em um indivíduo com uma hemofilia, por exemplo, hemofilia A, hemofilia B ou hemofilia C, com inibidores. O agente RNAi compreende uma fita senso e uma fita antissenso, a fita antissenso compreendendo uma região de complementaridade para um *Serpinc1* que codifica um mRNA1 que compreende pelo menos 15 nucleotídeos contíguos diferente em não

mais de 3 nucleotídeos da sequência de nucleotídeos 5' - UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG - 3' (SEQ ID NO: 15), onde praticamente todos os nucleotídeos da fita senso e substancialmente todos os nucleotídeos da fita antissenso são nucleotídeos modificados, e onde a fita senso está conjugada com um ligante fixado no 3'-terminal.

[00207] Em um aspecto a presente invenção fornece um agente de ácido ribonucléico (RNAi) de fita dupla que inibe a expressão de um *Serpinc1* adequado para administração a um indivíduo uma dose fixa de cerca de 40 mg a 90 mg (por exemplo, uma quantidade que reduz a atividade de *Serpinc1* no indivíduo por cerca de 75% ou mais); e um fator de substituição adequado para a administração de um indivíduo em uma dose que é reduzida em comparação com a quantidade terapêuticamente eficaz recomendada do fator de substituição (por exemplo, uma quantidade suficiente para alcançar um nível de pico plasmático do Fator VIII de cerca de 10-100 UI/dL (por exemplo, uma dose de menos de cerca de 200 UI/kg de Fator VIII, por exemplo, uma dose de cerca de 5 a cerca de 20 UI/kg do Fator VIII); ou uma quantidade suficiente para alcançar o nível do pico plasmático do Fator IX de cerca de 10-100 UI/dl (por exemplo, uma dose de menos de cerca de 200 UI/kg do fator IX, por exemplo, uma dose de cerca de 10 a cerca de 30 UI/kg do Fator IX)) para uso em um método ou tratamento de um caso de hemorragia em um indivíduo com uma hemofilia, por exemplo, hemofilia A, hemofilia B ou hemofilia C, sem inibidores. O agente RNAi compreende uma fita senso e uma fita antissenso, a fita antissenso compreendendo uma região de complementaridade para um *Serpinc1* que codifica um mRNA1 que compreende pelo menos 15 nucleotídeos contíguos diferente em não mais de 3 nucleotídeos da sequência de nucleotídeos 5' - UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG - 3' (SEQ ID NO: 15), onde

praticamente todos os nucleotídeos da fita senso e substancialmente todos os nucleotídeos da fita antissenso são nucleotídeos modificados, e onde a fita senso está conjugada com um ligante fixado no 3'-terminal.

[00208] Em outro aspecto a presente invenção fornece um agente de ácido ribonucléico (RNAi) de fita dupla que inibe a expressão de um *Serpinc1* adequado para administração a um indivíduo uma dose fixa de cerca de 40 mg a 90 mg (por exemplo, uma quantidade que reduz a atividade de *Serpinc1* no indivíduo por cerca de 75% ou mais); e um agente de desvio adequado para a administração de um indivíduo em uma dose que é reduzida em comparação com a quantidade terapêuticamente eficaz recomendada do fator de substituição (por exemplo, uma quantidade suficiente para gerar trombina e resolver uma hemorragia, por exemplo, uma dose de menos de cerca de 100 U/kg de aPCC (por exemplo, uma dose de cerca de 30 a 50 U/kg de um aPCC); uma dose de menos de cerca de 120 µg/kg de rFVIIa (por exemplo, uma dose de cerca de 45 µg/kg de rFVIIa)), para uso em um método ou tratamento de um caso de hemorragia em um indivíduo com uma hemofilia, por exemplo, hemofilia A, hemofilia B ou hemofilia C, com inibidores. O agente RNAi compreende uma fita senso e uma fita antissenso, a fita antissenso compreendendo uma região de complementaridade para um *Serpinc1* que codifica um mRNA1 que compreende pelo menos 15 nucleotídeos contíguos diferente em não mais de 3 nucleotídeos da sequência de nucleotídeos 5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG – 3' (SEQ ID NO: 15), onde praticamente todos os nucleotídeos da fita senso e substancialmente todos os nucleotídeos da fita antissenso são nucleotídeos modificados, e onde a fita senso está conjugada com um ligante fixado no 3'-terminal.

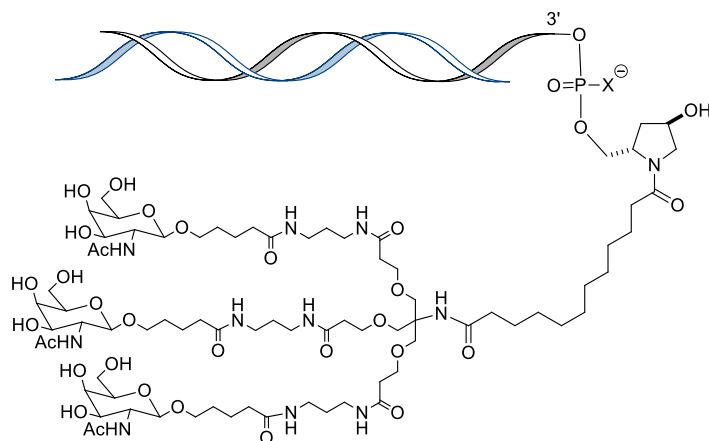
[00209] Nos métodos e usos anteriores, em uma modalidade, a

região de complementaridade consiste na sequência de nucleotídeos de 5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3'(SEQ ID NO: 15).

[00210] Em uma modalidade, o agente de RNAi de fita dupla compreende uma fita senso compreendendo a sequência de nucleotídeos de 5'- GGUUAACACCAUUUACUUCAA -3'(SEQ ID NO: 16), e uma fita antissenso compreendendo a sequência de nucleotídeos de 5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3'(SEQ ID NO: 15).

[00211] Em uma modalidade, a fita senso compreende 5'- GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf – 3' (SEQ ID NO:13) e a fita antis-senso compreende 5'- usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg – 3' (SEQ ID NO:14), em que a, c, g e u são 2'-O-metila (2'-OMe) A, C, G, ou U; Af, Cf, Gf ou Uf são 2'-fluoro A, C, G ou U; e s é um acoplamento fosforotioato.

[00212] Em uma modalidade, a fita senso compreende 5'- GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf – 3' (SEQ ID NO:13) e a fita antissenso compreende 5'- usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg – 3' (SEQ ID NO:14), em que a, c, g e u são 2'-O-metila (2'-OMe) A, C, G, ou U; Af, Cf, Gf ou Uf são 2'-fluoro A, C, G ou U; e s é um acoplamento fosforotioato; e em que a fita senso está conjugada com o ligante, como mostra o seguinte esquema



, em que X é O ou S.

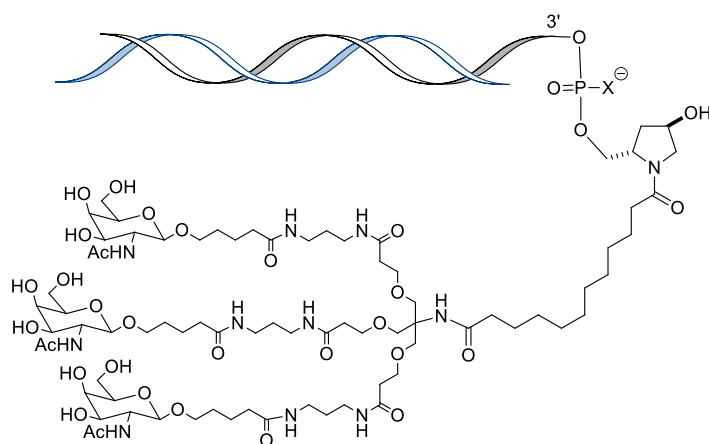
[00213] Em uma modalidade, o agente é administrado como uma composição farmacêutica. Em uma modalidade, o agente de RNAi é

administrado em uma solução sem tampão, como solução salina ou água.

[00214] Em outra modalidade, o agente RNAi é administrado com uma solução tampão, como uma solução tampão compreendendo acetato, citrato, prolamina, carbonato ou fosfato ou qualquer combinação destes. Em uma modalidade, a solução tampão é solução salina tamponada com fosfato (PBS).

[00215] Em um aspecto a presente invenção fornece um agente de ácido ribonucléico (RNAi) de fita dupla que inibe a expressão de um Serpinc1 adequado para administração a um indivíduo uma dose fixa de cerca de 80 mg (por exemplo, uma quantidade que reduz a atividade de Serpinc1 no indivíduo por cerca de 75% ou mais); e um fator de substituição adequado para a administração de um indivíduo em uma dose que é reduzida em comparação com a quantidade terapeuticamente eficaz recomendada do fator de substituição (por exemplo, uma quantidade suficiente para alcançar um nível de pico plasmático do Fator VIII de cerca de 10-100 UI/dL (por exemplo, uma dose de menos de cerca de 200 UI/kg de Fator VIII, por exemplo, uma dose de cerca de 5 a cerca de 20 UI/kg do Fator VIII); ou uma quantidade suficiente para alcançar o nível do pico plasmático do Fator IX de cerca de 10-100 UI/dl (por exemplo, uma dose de menos de cerca de 200 UI/kg do fator IX, por exemplo, uma dose de cerca de 10 a cerca de 30 UI/kg do Fator IX)) para uso em um método ou tratamento de um caso de hemorragia em um indivíduo com uma hemofilia, por exemplo, hemofilia A, hemofilia B ou hemofilia C, sem inibidores. O agente RNAi compreende uma fita senso e uma fita antissenso, em que a fita senso compreende 5'-GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf – 3' (SEQ ID NO:13) e a fita antissenso compreende 5'- usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg – 3' (SEQ ID NO:14), em que a, c, g e u são 2'-O-metila (2'-OMe) A, C,

G, ou U; Af, Cf, Gf ou Uf são 2'-fluoro A, C, G ou U; e s é um acoplamento fosforotioato; e em que a extremidade 3' da fita senso está conjugada com o ligante, como mostra o seguinte esquema



, em que X é O ou S.

[00216] Em outro aspecto a presente invenção fornece um agente de ácido ribonucléico (RNAi) de fita dupla que inibe a expressão de um Serpinc1 adequado para administração a um indivíduo uma dose fixa de cerca de 80 mg (por exemplo, uma quantidade que reduz a atividade de Serpinc1 no indivíduo por cerca de 75% ou mais); e um agente de desvio adequado para a administração de um indivíduo em uma dose que é reduzida em comparação com a quantidade terapêuticamente eficaz recomendada do fator de substituição (por exemplo, uma quantidade suficiente para gerar trombina e resolver uma hemorragia, por exemplo, uma dose de menos de cerca de 100 U/kg de aPCC (por exemplo, uma dose de cerca de 30 a 50 U/kg de um aPCC); uma dose de menos de cerca de 120 µg/kg de rFVIIa (por exemplo, uma dose de cerca de 45 µg/kg de rFVIIa)), para uso em um método ou tratamento de um caso de hemorragia em um indivíduo com uma hemofilia, por exemplo, hemofilia A, hemofilia B ou hemofilia C, com inibidores. O agente RNAi compreende uma fita senso e uma fita antissenso, em que a fita senso compreende 5'-GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf – 3' (SEQ ID NO:13) e a fita antissenso compreende 5'- usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg



invenção, (por exemplo, uma composição farmacêutica compreendendo um dsRNA da invenção), prevenindo, portanto, pelo menos um sintoma no indivíduo com uma desordem que se beneficiaria com a redução na expressão de Serpinc1. Em outra modalidade, os métodos incluem a administração ao indivíduo de uma dose efetiva profilática, por exemplo, uma dose fixa de cerca de 80 mg, do agente de iRNA, por exemplo, dsRNA, da invenção, (por exemplo, uma composição farmacêutica compreendendo um dsRNA da invenção), prevenindo, portanto, pelo menos um sintoma no indivíduo tendo um distúrbio que se beneficiaria com a redução na expressão de Serpinc1.

[00220] Em outro aspecto, a presente invenção fornece métodos de tratar um indivíduo com um distúrbio que se beneficiaria com a redução na expressão de Serpinc1, como, por exemplo, um distúrbio hemorrágico, por exemplo, uma hemofilia, que inclui a administração ao indivíduo, por exemplo, um humano, uma dose terapêuticamente efetiva, por exemplo, uma quantidade que reduz a atividade de Serpinc1 no indivíduo por cerca de 75% ou mais, por exemplo, uma dose fixa de cerca de 25 mg a a cerca de 100 mg, de um agente de iRNA alvejando um Serpinc1 gene ou uma composição farmacêutica compreendendo um agente de iRNA alvejando um gene Serpinc1, de modo a tratar o indivíduo com um distúrbio que se beneficiaria com a redução na expressão de Serpinc1. Em uma modalidade, os métodos incluem a administração ao indivíduo de uma dose terapêuticamente eficaz, por exemplo, uma dose fixa de cerca de 50 mg do agente de iRNA, por exemplo, dsRNA, da invenção, (por exemplo, uma composição farmacêutica compreendendo um dsRNA da invenção), tratando, portanto, o indivíduo com uma desordem que se beneficiaria com a redução na expressão de Serpinc1. Em outra modalidade, os métodos incluem a administração ao indivíduo de uma dose

terapeuticamente eficaz, por exemplo, uma dose fixa de cerca de 80 mg, do agente de iRNA, por exemplo, dsRNA, da invenção, (por exemplo, uma composição farmacêutica compreendendo um dsRNA da invenção), tratando, portanto, o indivíduo tendo um distúrbio que se beneficiaria com a redução na expressão de Serpinc1.

[00221] Em outro aspecto, a invenção fornece usos de uma dose profilaticamente eficaz, por exemplo, uma quantidade que reduz a atividade de Serpinc1 no indivíduo por cerca de 75% ou mais, por exemplo, uma dose fixa de cerca de 25 mg a cerca de 100 mg, de um iRNA, como, por exemplo, um dsRNA, da invenção para prevenir pelo menos um sintoma de um indivíduo que sofre de um distúrbio que se beneficiaria de uma redução e/ou inibição da expressão de Serpinc1, como um distúrbio hemorrágico, por exemplo, uma hemofilia. Em uma modalidade, a invenção fornece usos de uma dose profilaticamente eficaz, por exemplo, uma dose fixa de cerca de 50 mg, de um iRNA, como, por exemplo, um dsRNA, da invenção para prevenir pelo menos um sintoma de um indivíduo que sofre de um distúrbio que se beneficiaria de uma redução e/ou inibição da expressão de Serpinc1, como um distúrbio hemorrágico, por exemplo, uma hemofilia. Em outra modalidade, a invenção fornece usos de uma dose profilaticamente eficaz, por exemplo, uma dose fixa de cerca de 80 mg, de um iRNA, como, por exemplo, um dsRNA, da invenção para prevenir pelo menos um sintoma de um indivíduo que sofre de um distúrbio que se beneficiaria de uma redução e/ou inibição da expressão de Serpinc1, como um distúrbio hemorrágico, por exemplo, uma hemofilia.

[00222] Em outro aspecto, a presente invenção fornece usos de uma dose profilaticamente eficaz, por exemplo, uma quantidade que reduz a atividade de Serpinc1 no indivíduo por cerca de 75% ou mais, por exemplo, uma dose fixa de cerca de 25 mg a cerca de 100 mg, de

um agente de iRNA da invenção na fabricação de um medicamento para prevenir pelo menos um sintoma de um indivíduo que sofre de um distúrbio que se beneficiaria de uma redução e/ou inibição da expressão de Serpinc1, como um distúrbio hemorrágico, por exemplo, uma hemofilia. Em uma modalidade, a presente invenção fornece usos de uma dose profilaticamente eficaz, por exemplo, uma dose fixa de cerca de 50 mg, de um agente de iRNA da invenção na fabricação de um medicamento para prevenir pelo menos um sintoma de um indivíduo que sofre de um distúrbio que se beneficiaria de uma redução e/ou inibição da expressão de Serpinc1, como um distúrbio hemorrágico, por exemplo, uma hemofilia. Em outra modalidade, a presente invenção fornece usos de uma dose profilaticamente eficaz, por exemplo, uma dose fixa de cerca de 80 mg, de um agente de iRNA da invenção na fabricação de um medicamento para prevenir pelo menos um sintoma de um indivíduo que sofre de um distúrbio que se beneficiaria de uma redução e/ou inibição da expressão de Serpinc1, como um distúrbio hemorrágico, por exemplo, uma hemofilia.

[00223] Em outro aspecto, a presente invenção fornece usos de uma dose terapêuticamente eficaz, por exemplo, uma quantidade que reduz a atividade de Serpinc1 no indivíduo por cerca de 75% ou mais, por exemplo, uma dose fixa de cerca de 25 mg a cerca de 100 mg, de um agente de iRNA da invenção para tratar um indivíduo, por exemplo, um indivíduo que se beneficiaria de uma redução e/ou inibição da expressão de Serpinc1. Em uma modalidade, a presente invenção fornece usos de uma dose terapêuticamente eficaz, por exemplo, uma dose fixa de cerca de 50 mg, de um agente de iRNA da invenção para tratar um indivíduo, por exemplo, um indivíduo que se beneficiaria de uma redução e/ou inibição da expressão de Serpinc1. Em outra modalidade, a presente invenção fornece usos de uma dose terapêuticamente eficaz, por exemplo, uma dose fixa de cerca de 80

mg, de um agente de iRNA da invenção no tratamento de um indivíduo, por exemplo, um indivíduo que se beneficiaria de uma redução e/ou inibição da expressão de Serpinc1.

[00224] Em ainda outro aspecto, a presente invenção fornece o uso de um agente de iRNA, por exemplo, um dsRNA, da invenção alvejando o gene Serpinc1 ou uma composição farmacêutica compreendendo uma dose terapêuticamente eficaz, por exemplo, uma quantidade que reduz a atividade de Serpinc1 no indivíduo por cerca de 75% ou mais, por exemplo, uma dose fixa de cerca de 25 mg a cerca de 100 mg, de um agente de iRNA alvejando um gene Serpinc1 na fabricação de um medicamento para tratar um indivíduo, por exemplo, um indivíduo que se beneficiaria de uma redução e/ou inibição da expressão de Serpinc1, como um distúrbio hemorrágico, por exemplo, uma hemofilia. Em uma modalidade, a presente invenção fornece uso de um agente de iRNA, por exemplo, um dsRNA, da invenção alvejando um gene Serpinc1 ou uma composição farmacêutica compreendendo uma dose terapêuticamente eficaz, por exemplo, uma dose fixa de cerca de 50 mg, de um agente de iRNA alvejando um gene Serpinc1 na fabricação de um medicamento para o tratamento de um indivíduo, como, por exemplo, um indivíduo que se beneficiaria de uma redução e/ou inibição da expressão de Serpinc1, como um indivíduo com um distúrbio hemorrágico, por exemplo, uma hemofilia. Em outra modalidade, a presente invenção fornece usos de um agente de iRNA, por exemplo, um dsRNA, da invenção alvejando um gene Serpinc1 ou uma composição farmacêutica compreendendo uma dose terapêuticamente eficaz, como, por exemplo, uma dose fixa de cerca de 80 mg, de um agente de iRNA alvejando um gene Serpinc1 na fabricação de um medicamento para o tratamento de um indivíduo, por exemplo, um indivíduo que se beneficiaria de uma redução e/ou inibição da expressão de hemorrágico, por exemplo, uma

hemofilia.

[00225] Em algumas modalidades da invenção, por exemplo, quando uma agente de RNAi compreende uma fita senso e uma fita antissenso, a fita antissenso compreendendo uma região de complementaridade para um *Serpinc1* que codifica um mRNA1 que compreende pelo menos 15 nucleotídeos contíguos diferente em não mais de 3 nucleotídeos da sequência de nucleotídeos 5' - UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG - 3' (SEQ ID NO: 15), onde praticamente todos os nucleotídeos da fita senso e substancialmente todos os nucleotídeos da fita antissenso são nucleotídeos modificados, e onde a fita senso está conjugada com um ligante fixado no 3'-terminal, tal agente é administrado em uma dose fixa de cerca de 25 mg a cerca de 100 mg, por exemplo, em uma dose fixa de 25 mg; ou em uma dose fixa de 50 mg; ou em uma dose fixa de 80 mg; ou a uma dose fixa de cerca de 100 mg. Em uma modalidade, a dose fixa é 50 mg. Em outra modalidade, a dose fixa é 80 mg.

[00226] Consequentemente, em um aspecto, a invenção apresenta métodos de prevenção de pelo menos um sintoma em um indivíduo tendo um distúrbio que se beneficiariam com a redução na expressão de *Serpinc1*, como, por exemplo, um distúrbio hemorrágico, por exemplo, uma hemofilia. Os métodos incluem a administração ao indivíduo uma dose profilaticamente eficaz, por exemplo, uma quantidade que reduz a atividade de *Serpinc1* no indivíduo em cerca de 75% ou mais, por exemplo, uma dose fixa de cerca de 25 mg a cerca de 100 mg de um agente de ácido ribonucléico (RNAi) de fita dupla compreendendo uma fita senso e uma fita antissenso, a fita antissenso compreendendo uma região de complementaridade para um mRNA codificando um *Serpinc1* que compreende pelo menos 15 nucleotídeos contíguos que diferem em mais de 3 nucleotídeos da sequência de nucleotídeos de 5' -

UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG – 3' (SEQ ID NO: 15), onde praticamente todos os nucleotídeos da fita senso e substancialmente todos os nucleotídeos da fita antissenso são nucleotídeos modificados, e onde a fita senso está conjugada com um ligante anexado no 3'-terminal (por exemplo, uma composição farmacêutica compreendendo o agente de RNAi), prevenindo, portanto, pelo menos um sintoma no indivíduo tendo uma desordem que se beneficiaria com a redução na expressão de Serpinc1. Em uma modalidade, a dose fixa é 50 mg. Em outra modalidade, a dose fixa é 80 mg.

[00227] Em outro aspecto, a presente invenção fornece métodos de tratar um indivíduo com um distúrbio que se beneficiaria com a redução na expressão de Serpinc1, como, por exemplo, um distúrbio hemorrágico, por exemplo, uma hemofilia, que inclui a administração ao indivíduo, por exemplo, um humano, uma dose terapêuticamente efetiva, por exemplo, uma quantidade que reduz a atividade de Serpinc1 no indivíduo por cerca de 75% ou mais, por exemplo, uma dose fixa de cerca de 25 mg a cerca de 100 mg de um agente de ácido ribonucléico (RNAi) de fita dupla compreendendo uma fita senso e uma fita antissenso, a fita antissenso compreendendo uma região de complementaridade para um mRNA codificando Serpinc1 que compreende pelo menos 15 nucleotídeos contíguos que diferem em não mais de 3 nucleotídeos da sequência de nucleotídeos de 5' - UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG – 3' (SEQ ID NO: 15), onde praticamente todos os nucleotídeos da fita senso e substancialmente todos os nucleotídeos da fita antissenso são nucleotídeos modificados, e onde a fita senso está conjugada com um ligante anexado no 3'-terminal ou uma composição farmacêutica compreendendo o agente de RNAi alvejando um gene Serpinc1 tratando, portanto, pelo menos um sintoma no indivíduo tendo uma desordem que se beneficiaria com a redução na expressão de Serpinc1. Em uma modalidade, a dose fixa

é 50 mg. Em outra modalidade, a dose fixa é 80 mg.

[00228] Em outro aspecto, a invenção fornece usos de uma dose profilaticamente eficaz, por exemplo, uma quantidade que reduz a atividade de Serpinc1 no indivíduo em cerca de 75% ou mais, por exemplo, uma dose fixa de cerca de 25 mg a cerca de 100 mg de um agente de ácido ribonucléico (RNAi) de fita dupla compreendendo uma fita senso e uma fita antissenso, a fita antissenso compreendendo uma região de complementaridade para um mRNA codificando um Serpinc1 que compreende pelo menos 15 nucleotídeos contíguos que diferem em mais de 3 nucleotídeos da sequência de nucleotídeos de 5' - UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG - 3' (SEQ ID NO: 15), onde praticamente todos os nucleotídeos da fita senso e substancialmente todos os nucleotídeos da fita antissenso são nucleotídeos modificados, e onde a fita senso está conjugada com um ligante anexado no 3'-terminal para prevenir pelo menos um sintoma de um indivíduo que sofre de um distúrbio que se beneficiaria de uma redução e/ou inibição da expressão de Serpinc1, como um distúrbio hemorrágico, por exemplo, uma hemofilia. Em uma modalidade, a dose fixa é 50 mg. Em outra modalidade, a dose fixa é 80 mg.

[00229] Em outro aspecto, a invenção fornece usos de uma dose profilaticamente eficaz, por exemplo, uma quantidade que reduz a atividade de Serpinc1 no indivíduo em cerca de 75% ou mais, por exemplo, uma dose fixa de cerca de 25 mg a cerca de 100 mg de um agente de ácido ribonucléico (RNAi) de fita dupla compreendendo uma fita senso e uma fita antissenso, a fita antissenso compreendendo uma região de complementaridade para um mRNA codificando um Serpinc1 que compreende pelo menos 15 nucleotídeos contíguos que diferem em mais de 3 nucleotídeos da sequência de nucleotídeos de 5' - UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG - 3' (SEQ ID NO: 15), onde praticamente todos os nucleotídeos da fita senso e substancialmente

todos os nucleotídeos da fita antissenso são nucleotídeos modificados, e onde a fita senso está conjugada com um ligante anexado no 3'-terminal na fabricação de um medicamento para prevenir pelo menos um sintoma de um indivíduo que sofre de um distúrbio que se beneficiaria de uma redução e/ou inibição da expressão de Serpinc1, como um distúrbio hemorrágico, por exemplo, uma hemofilia. Em uma modalidade, a dose fixa é 50 mg. Em outra modalidade, a dose fixa é 80 mg.

[00230] Em outro aspecto, a invenção fornece usos de uma dose terapêuticamente eficaz, por exemplo, uma quantidade que reduz a atividade de Serpinc1 no indivíduo em cerca de 75% ou mais, por exemplo, uma dose fixa de cerca de 25 mg a cerca de 100 mg de um agente de ácido ribonucleico (RNAi) de fita dupla compreendendo uma fita senso e uma fita antissenso, a fita antissenso compreendendo uma região de complementaridade para um mRNA codificando um Serpinc1 que compreende pelo menos 15 nucleotídeos contíguos que diferem em mais de 3 nucleotídeos da sequência de nucleotídeos de 5' - UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG – 3' (SEQ ID NO: 15), onde praticamente todos os nucleotídeos da fita senso e substancialmente todos os nucleotídeos da fita antissenso são nucleotídeos modificados, e onde a fita senso está conjugada com um ligante anexado no 3'-terminal para tratar um indivíduo, por exemplo, um indivíduo que se beneficiaria de uma redução e/ou inibição da expressão de Serpinc1. Em uma modalidade, a dose fixa é 50 mg. Em outra modalidade, a dose fixa é 80 mg.

[00231] Em ainda outro aspecto, a invenção fornece uso de um agente de iRNA, por exemplo, um dsRNA, da invenção alvejando um gene Serpinc1 ou uma composição farmacêutica compreendendo uma dose terapêuticamente eficaz, por exemplo, uma quantidade que reduz a atividade de Serpinc1 no indivíduo em cerca de 75% ou mais, por

exemplo, uma dose fixa de cerca de 25 mg a cerca de 100 mg de um agente de ácido ribonucléico (RNAi) de fita dupla compreendendo uma fita senso e uma fita antissenso, a fita antissenso compreendendo uma região de complementaridade para um mRNA codificando um *Serpinc1* que compreende pelo menos 15 nucleotídeos contíguos que diferem em mais de 3 nucleotídeos da sequência de nucleotídeos de 5' - UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG - 3' (SEQ ID NO: 15), onde praticamente todos os nucleotídeos da fita senso e substancialmente todos os nucleotídeos da fita antissenso são nucleotídeos modificados, e onde a fita senso está conjugada com um ligante anexado no 3'-terminal na fabricação de um medicamento para tratar um indivíduo, por exemplo, um indivíduo que se beneficiaria de uma redução e/ou inibição da expressão de *Serpinc1*, como um indivíduo tendo um distúrbio hemorrágico, por exemplo, uma hemofilia. Em uma modalidade, a dose fixa é 50 mg. Em outra modalidade, a dose fixa é 80 mg.

[00232] Os métodos e usos da invenção incluem a administração de uma composição descrita aqui, tal expressão do gene alvo *Serpinc1* está diminuída, como por cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, ou cerca de 80 dias. Em uma modalidade, a expressão do gene alvo *Serpinc1* é diminuída por uma duração prolongada, por exemplo, pelo menos cerca de sete dias ou mais, por exemplo, cerca de uma semana, duas semanas, três semanas, cerca de quatro semanas, cerca de cinco semanas, cerca de seis semanas, cerca de dois meses, cerca de um trimestre, ou mais.

[00233] Redução da expressão gênica pode ser avaliada por

qualquer método conhecido na técnica. Por exemplo, uma redução na expressão de Serpinc1 pode ser determinada através da determinação do nível de expressão de mRNA de Serpinc1 usando os métodos de rotina pelo versado na técnica, por exemplo, Northern blotting, qRT-PCR, determinando o nível de proteína de Serpinc1 usando os métodos de rotina para um versado na técnica, como Western blotting, técnicas imunológicas, e/ou por determinação de uma atividade biológica de Serpinc1, como, por exemplo, afetando uma ou mais moléculas associadas com o mecanismo de coagulação do sangue celular (ou em uma configuração in vivo, a coagulação do sangue em si). Em uma modalidade, tempo de geração de trombina, tempo de formação do coágulo e/ou tempo de coagulação são determinados para avaliar a expressão de Serpinc1 usando, por exemplo, análise Tromboelastometria ROTEM® do sangue total.

[00234] Administração do dsRNA de acordo com os métodos e usos da invenção pode resultar em uma redução da gravidade, dos sinais, sintomas e/ou marcadores de tais doenças ou distúrbios em um paciente com uma doença associada a Serpinc1. "Redução", neste contexto, significa uma diminuição estatisticamente significativa em tal nível. A redução pode ser, por exemplo, de pelo menos cerca de 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% ou cerca de 100%.

[00235] Eficácia do tratamento ou prevenção de doenças pode ser avaliada, por exemplo, medindo a progressão da doença, a remissão da doença, a gravidade dos sintomas, a frequência de hemorragia, a redução da dor, a qualidade de vida, a dose de um medicamento necessário para sustentar um efeito do tratamento, o nível de um marcador de doença ou qualquer outro parâmetro mensurável apropriado para uma determinada doença a ser tratada ou direcionada para a prevenção. É bem dentro da capacidade de um versado na

técnica monitorar a eficácia do tratamento ou prevenção através da medição de qualquer um desses parâmetros, ou qualquer combinação de parâmetros. Por exemplo, a eficácia do tratamento de um distúrbio hemorrágico pode ser avaliada, por exemplo, por monitorização periódica de níveis trombina:anti-trombina. As comparações das últimas leituras com os valores iniciais fornecem uma indicação ao médico se o tratamento é eficaz. É bem dentro da capacidade de um versado na técnica monitorar a eficácia do tratamento ou prevenção através da medição de qualquer um desses parâmetros, ou qualquer combinação de parâmetros. Em conexão com a administração de um iRNA alvejando *Serpinc1* ou sua composição farmacêutica, "eficaz contra" um distúrbio hemorrágico indica que a administração em uma forma clinicamente adequada resulta em um efeito benéfico por, pelo menos, uma fração estatisticamente significativa de pacientes, como a melhora dos sintomas, uma cura, uma redução da doença, prolongamento da vida, melhoria da qualidade de vida, ou outro efeito geralmente reconhecido como positivo pelos médicos familiarizados com o tratamento de distúrbios hemorrágicos e as respectivas causas.

[00236] Um tratamento ou efeito preventivo é evidente quando há uma melhora estatisticamente significativa em um ou mais parâmetros do status da doença, ou por uma falha de agravamento ou para desenvolver sintomas que de outra forma seriam antecipados. Como um exemplo, uma mudança favorável de, pelo menos, 10% em um parâmetro mensurável da doença, e, de preferência, pelo menos, 20%, 30%, 40%, 50% ou mais, pode ser indicativa de tratamento eficaz. A eficácia de um determinado medicamento de iRNA ou formulação desse medicamento pode também ser analisada usando um modelo animal experimental para determinada doença, conhecido na técnica. Ao usar um modelo animal experimental, a eficácia do tratamento é evidenciada quando uma redução estatisticamente significativa em um

marcador ou sintoma é observado.

[00237] Alternativamente, a eficácia pode ser medida por uma redução na severidade da doença como determinado por um versado na técnica de diagnóstico baseado na gravidade da doença clinicamente aceitável de uma escala de classificação. Qualquer mudança positiva, por exemplo, resultando em diminuição da gravidade da doença medida usando a escala adequada, representa um tratamento adequado, usando uma formulação de iRNA ou iRNA conforme descrito aqui.

[00238] O iRNA (ou composições farmacêuticas compreendendo o iRNA) pode ser administrado ao indivíduo cerca de uma vez por semana, duas vezes por mês, cerca de uma vez a cada seis semanas, cerca de uma vez a cada 2 meses ou uma vez a cada trimestre.

[00239] O agente de iRNA de fita dupla pode ser administrado ao indivíduo como uma ou mais doses. Por exemplo, um agente de iRNA de fita dupla pode ser administrado a um indivíduo como uma dose mensal de cerca de 0,200 mg/kg a cerca de 1,825 mg/kg. Alternativamente, um agente de iRNA de fita dupla pode ser administrado a um indivíduo em uma dose fixa de cerca de 25 mg a cerca de 100 mg.

[00240] Em uma modalidade, um agente de RNAi de fita dupla compreendendo uma fita senso e uma fita antissenso, a fita antissenso compreendendo uma região de complementaridade para um Serpinc1 que codifica um mRNA1 que compreende pelo menos 15 nucleotídeos contíguos diferente em não mais de 3 nucleotídeos da sequência de nucleotídeos 5' - UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG – 3' (SEQ ID NO: 15), onde praticamente todos os nucleotídeos da fita senso e substancialmente todos os nucleotídeos da fita antissenso são nucleotídeos modificados, e onde a fita senso está conjugada com um ligante fixado no 3'-terminal é administrado ao indivíduo a uma dose

fixa de cerca de 25 mg a cerca de 100 mg, por exemplo, cerca de 25 mg; cerca de 50 mg, 80 mg ou 100 mg. Em uma modalidade, a dose fixa é 50 mg. Em outra modalidade, a dose fixa é 80 mg.

[00241] A administração pode ser repetida, por exemplo, em uma base regular, como, por exemplo, mensalmente, durante um mês, dois meses, três meses, quatro meses ou mais. Após um regime inicial de tratamento, o tratamento pode ser administrado em uma base menos frequente. Por exemplo, após a administração mensal por três meses, a administração pode ser repetida uma vez por trimestre, por um ano ou mais.

[00242] Assim, em algumas modalidades, o agente de RNAi é administrado em um regime de dosagem que inclui uma "fase de carga" de administrações espaçadas que podem ser seguidas por uma "fase de manutenção", em que o agente de RNAi é administrado em intervalos mais espaçados.

[00243] Um cronograma posológico de carregamento e/ou um cronograma posológico de manutenção pode, opcionalmente, ser repetido para uma ou mais iterações. O número de iterações pode depender da realização de um efeito desejado, por exemplo, a supressão de um gene *Serpinc1* e/ou a realização de um efeito profilático ou terapêutico, por exemplo, aumentar a coagulação do sangue, reduzir o tempo de formação do coágulo, e/ou reduzir o tempo de coagulação.

[00244] A administração do iRNA pode reduzir os níveis de *Serpinc1*, por exemplo, em uma célula, um tecido, sangue, urina ou outro compartimento do paciente por, pelo menos, cerca de 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%,

56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou, pelo menos, cerca de 99% ou mais.

[00245] O iRNA pode ser administrado por infusão intravenosa durante um período de tempo, como durante um período de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, ou cerca de 25 minutos.

[00246] Antes da administração de uma dose completa do iRNA, os pacientes podem ser administrados com uma dose menor, como uma infusão de 5%, e monitorados por efeitos adversos, como uma reação alérgica. Em outro exemplo, o paciente pode ser monitorado para efeitos imunoestimuladores indesejáveis, como aumento de níveis da citocina (por exemplo, o TNF-alfa ou INF-alfa).

[00247] Devido aos efeitos inibitórios sobre a expressão de Serpinc1, uma composição de acordo com a invenção ou uma composição farmacêutica preparada resultante desta pode melhorar a qualidade de vida.

[00248] Um iRNA da invenção pode ser administrado na forma "inativada", ou como um "iRNA livre". Um iRNA inativado é administrado na ausência de uma composição farmacêutica. O iRNA inativado pode estar em uma solução tampão adequada. A solução tampão pode compreender acetato, citrato, prolamina, carbonato ou fosfato, ou qualquer combinação destes. Em uma modalidade, a solução tampão é solução salina tamponada com fosfato (PBS). O pH e a osmolaridade da solução tampão contendo o iRNA podem ser ajustados de forma que é adequado para administração a um indivíduo.

[00249] Alternativamente, um iRNA da invenção pode ser

administrado como uma composição farmacêutica, como uma formulação lipossomal de dsRNA.

[00250] Indivíduos que se beneficiariam de uma redução e/ou inibição da expressão do gene *Serpinc1* são aqueles com um distúrbio hemorrágico, por exemplo, um distúrbio hemorrágico hereditário ou adquirido, conforme descrito aqui. Em uma modalidade, um indivíduo com um distúrbio hemorrágico hereditário, tem uma hemofilia, por exemplo, hemofilia tipo A, B, ou C. Em uma modalidade, um indivíduo com um distúrbio hemorrágico hereditário, por exemplo, uma hemofilia, é um indivíduo inibidor (um indivíduo que se tornou refratário à substituição de fatores de coagulação). Em uma modalidade, o indivíduo inibidor tem hemofilia A. Em outra modalidade, o indivíduo inibidor tem hemofilia B. Em ainda outra modalidade, o indivíduo inibidor tem hemofilia C. O tratamento de um indivíduo que se beneficiaria de uma redução e/ou inibição da expressão do gene *Serpinc1* inclui tratamento terapêutico (por exemplo, em demanda, por exemplo, o sujeito está com hemorragia (sangramento espontâneo ou sangramento como resultado de trauma), e falhando em coagular) e profilático (por exemplo, o indivíduo não está com hemorragia e/ou está sendo submetido à cirurgia).

[00251] A invenção ainda fornece métodos e usos para o uso de um iRNA ou uma composição farmacêutica deste, por exemplo, para tratar um indivíduo que se beneficiaria com a redução e/ou inibição da expressão de *Serpinc1*, como, por exemplo, um indivíduo com um distúrbio hemorrágico, em combinação com outros métodos farmacêuticos e/ou outros terapêuticos, por exemplo, com os métodos farmacêuticos e/ou terapêuticos conhecidos, por exemplo, aqueles atualmente empregados para tratar esses distúrbios.

[00252] Por exemplo, em certas modalidades, um iRNA direcionando o *Serpinc1* é administrado em combinação com, por

exemplo, um agente útil no tratamento de um distúrbio hemorrágico como descrito aqui. Por exemplo, métodos terapêuticos e terapêutica adicional adequados para tratar um indivíduo que se beneficiaria da redução da expressão de *Serpinc1*, por exemplo, um indivíduo com um distúrbio hemorrágico, inclui plasma fresco congelado (FFP); FVIIa recombinante; FIX recombinante; concentrados de FIX; inativados de vírus, concentrados de FVIII contendo vWF; terapia de dessensibilização que pode incluir grandes doses de FVIII ou FIX, junto com esteroides ou imunoglobulina intravenosa (IVIG) e ciclofosfamida; plasmaférese em conjunto com imunossupressão e infusão de FVIII ou FIX, com ou sem terapia antifibrinolítica; indução de tolerância imune (ITI), com ou sem terapia imunossupressora (por exemplo, ciclofosfamida, prednisona e/ou anti-CD20); acetato de desmopressina [DDAVP]; antifibrinolíticos, como ácido aminocapróico e ácido tranexâmico; concentrado de complexo de protrombina ativado (PCC); agentes anti-hemofílicos; corticosteróides; agentes imunossupressores; e estrogênios.

[00253] O iRNA e um agente terapêutico e/ou tratamento adicional pode ser administrado ao mesmo tempo e/ou na mesma combinação, por exemplo, por via parenteral, ou o agente terapêutico adicional pode ser administrado como parte de uma composição separada ou em tempos separados por outro método conhecido na técnica ou descrito aqui.

[00254] Em uma modalidade, a presente invenção fornece métodos para tratar um indivíduo que sofre de um distúrbio hemorrágico, por exemplo, uma hemofilia, para administração por via subcutânea do composto da presente invenção AT3SC-001 (AD-57213 - fita senso: 5'- GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf – 3' (SEQ ID NO:13) e fita antissenso: 5'- usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg – 3' (SEQ ID NO:14), em que a, c, g e u são 2'-O-metil (2'-OMe) A, C, G ou U; Af,

Cf, Gf ou Uf são 2'-fluoro A, C, G ou U; e s é um acoplamento de fosforotioato) em uma dose fixa de cerca de 25 mg a cerca de 100 mg, por exemplo, uma dose fixa de cerca de 25 mg, cerca de 50 mg, cerca de 80 mg ou cerca de 100 mg (por exemplo, uma quantidade que reduz a atividade de Serpinc1 no indivíduo por cerca de 75% ou mais). Em uma modalidade, a dose fixa é 50 mg. Em outra modalidade, a dose fixa é 80 mg.

### **III. iRNAs para Uso nos Métodos da Invenção**

[00255] Os métodos descritos aqui são para o uso do agente de RNAi de fita dupla melhorados que inibem a expressão de um gene Serpinc1 em uma célula, como uma célula dentro de um indivíduo, por exemplo, um mamífero, como um ser humano com um distúrbio associado a Serpinc1, por exemplo, um distúrbio hemorrágico, por exemplo, hemofilia.

[00256] Assim, a invenção fornece agentes de RNAi de fita dupla com modificações químicas capazes de inibir a expressão de um gene-alvo (ou seja, um gene Serpinc1) in vivo. Em certos aspectos da invenção, substancialmente todos os nucleotídeos de um iRNA da invenção são modificados. Em outras modalidades da invenção, todos os nucleotídeos de um iRNA da invenção são modificados. Os iRNAs da invenção, em que "substancialmente todos os nucleotídeos são modificados" são, em grande medida, mas não totalmente modificados e podem incluir não mais de 5, 4, 3, 2, ou 1 nucleotídeos não modificados.

[00257] O agente de RNAi compreende uma fita senso e uma fita antissenso. Cada fita do agente de RNAi pode variar de 12-30 nucleotídeos de comprimento. Por exemplo, cada fita pode ter entre 14-30 nucleotídeos de comprimento, 17-30 nucleotídeos de comprimento, 19-30 nucleotídeos de comprimento, 25-30 nucleotídeos de comprimento, 27-30 nucleotídeos de comprimento, 17-23

nucleotídeos de comprimento, 17-21 nucleotídeos de comprimento, 17-19 nucleotídeos de comprimento, 19-25 nucleotídeos de comprimento, 19-23 nucleotídeos de comprimento, 19-21 nucleotídeos de comprimento, 21-25 nucleotídeos de comprimento ou 21-23 nucleotídeos de comprimento.

[00258] A fita senso e fita antissenso normalmente formam um RNA de fita dupla duplex ("dsRNA"), também referido aqui como um "agente de RNAi." A região duplex de um agente de RNAi pode ter 12-30 pares de nucleotídeos de comprimento. Por exemplo, a região duplex pode ter entre 14-30 pares de nucleotídeos de comprimento, 17-30 pares de nucleotídeos de comprimento, 27-30 pares de nucleotídeos de comprimento, 17-23 pares de nucleotídeos de comprimento, 17-21 pares de nucleotídeos de comprimento, 17-19 pares de nucleotídeos de comprimento, 19-25 pares de nucleotídeos de comprimento, 19-23 pares de nucleotídeos de comprimento, 19- 21 pares de nucleotídeos de comprimento, 21-25 pares de nucleotídeos de comprimento ou 21-23 pares de nucleotídeos de comprimento. Em outro exemplo, a região duplex é selecionada a partir de 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 e 27 nucleotídeos de comprimento.

[00259] Em uma modalidade, o agente de RNAi pode conter uma ou mais regiões de saliência e/ou grupos capping nas extremidades 3', 5', ou ambas as extremidades de uma ou de ambas as fitas. A saliência pode ter de 1 a 6 nucleotídeos de comprimento, por exemplo 2 a 6 nucleotídeos de comprimento, 1 a 5 nucleotídeos de comprimento, 2 a 5 nucleotídeos de comprimento, 1 a 4 nucleotídeos de comprimento, 2 a 4 nucleotídeos de comprimento, 1 a 3 nucleotídeos de comprimento, 2 a 3 nucleotídeos de comprimento ou 1 a 2 nucleotídeos de comprimento. As saliências podem ser o resultado de uma fita sendo mais longa do que a outra, ou o resultado de duas fitas do mesmo comprimento a ser escalonada. A saliência pode

formar um não pareamento com o mRNA alvo ou pode ser complementar às sequências genéticas sendo alvo ou pode ser uma outra sequência. A primeira e a segunda fita também podem ser unidas, por exemplo, por bases adicionais para formar uma forma de grampo, ou por outros ligantes não base.

[00260] Em uma modalidade, os nucleotídeos na região de saliência do agente de RNAi podem ser cada um independentemente um nucleotídeo modificado ou não modificado, incluindo, mas não limitado a 2'-açúcar modificado, como, 2-F, 2'-O-metilaila, timidina (T), 2'-O-metoxietil-5-metiluridina (Teo), 2'-O-metoxetiladenosina (Aeo), 2'-O-metoxietil-5-metilcitidina (m5Ceo), e as suas combinações. Por exemplo, TT pode ser uma sequência de saliência para qualquer extremidade em cada fita. A saliência pode formar um não pareamento com o mRNA alvo ou pode ser complementar às sequências genéticas sendo alvo ou pode ser uma outra sequência.

[00261] As saliências 5' ou 3' na fita senso, fita antissenso ou ambas as fitas do agente de RNAi podem ser fosforiladas. Em algumas modalidades, a(s) região(ões) de saliência contém dois nucleotídeos tendo um fosforotioato entre os dois nucleotídeos, onde os dois nucleotídeos podem ser iguais ou diferentes. Em uma modalidade, a saliência está presente na extremidade 3' da fita senso, da fita antissenso, ou ambas as fitas. Em uma modalidade, essa saliência 3' está presente na fita antissenso. Em uma modalidade, essa saliência 3' está presente na fita senso.

[00262] O agente de RNAi pode conter apenas uma saliência única, que pode reforçar a atividade de interferência do RNAi, sem afetar sua estabilidade global. Por exemplo, a saliência de fita simples pode estar localizada na extremidade 3'-terminal da fita senso ou, alternativamente, na extremidade 3'-terminal da fita antissenso. O RNAi pode também ter uma extremidade cega localizada na

extremidade 5' da fita antissenso (ou a extremidade 3' da fita senso) ou vice-versa. Geralmente, a fita antissenso do RNAi tem uma saliência de nucleotídeo na extremidade 3', e a extremidade 5' é cega. Sem ater-se à teoria, a extremidade cega assimétrica na extremidade 5' da fita antissenso e saliência da extremidade 3' da fita antissenso favorecem o carregamento da fita guia em processo de RISC.

[00263] Qualquer um dos ácidos nucleicos em destaque na invenção pode ser sintetizado e/ou modificado por métodos bem estabelecidos na técnica, como os descritos em “Current protocols in nucleic acid chemistry,” Beaucage, S.L. et al. (Edrs.), John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, EUA, aqui incorporado por referência. Modificações incluem, por exemplo, modificações da extremidade, por exemplo, modificações da extremidade 5' (fosforilação, conjugação, acoplamentos invertidos) ou modificações da extremidade 3' (conjugação, nucleotídeos do DNA, acoplamentos invertidos, etc); modificações de base, por exemplo, substituição de com bases de estabilização, bases de desestabilização, ou bases que formam pares de bases com um repertório ampliado de parceiros, remoção de bases (nucleotídeos abásicos) ou bases conjugadas; modificações de açúcar (por exemplo, na posição 2' ou posição 4') ou substituição do açúcar; e/ou modificações de cadeia principal, incluindo modificação ou substituição de acoplamentos de fosfodiéster. Exemplos específicos de compostos de iRNA útil nas modalidades descritas aqui incluem, mas não estão limitados a RNAs contendo cadeias principais modificadas ou não acoplamentos de internucleosídeo natural. RNAs com cadeias principais modificadas incluem, entre outros, aqueles que não têm um átomo de fósforo na cadeia principal. Para efeitos da presente especificação, e como às vezes referenciado na técnica, os RNAs modificados que não têm um átomo de fósforo em sua cadeia principal de internucleosídeo também pode ser considerado

oligonucleosídeos. Em algumas modalidades, um iRNA modificado terá um átomo de fósforo em sua cadeia principal de internucleosídeo.

[00264] Cadeias principais de RNA modificado incluem, por exemplo, fosforotioatos, fosforotioatos quirais, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, metil e outros alquil fosfonatos incluindo 3'-alquilenos fosfonatos e fosfonatos quirais, fosfinatos, fosforamidatos incluindo 3'-amino-fosforamidato e aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionalquilfosfonatos, tionalquilfosfotriésteres e boranofosfatos, e tendo acoplamentos normais 3'-5', análogos 2'-5'-ligados destes, e aqueles com polaridade invertida, em que os pares adjacentes de unidades de nucleosídeo estão ligados 3'-5' a 5'-3' ou 2'-5' a 5'-2'. Vários sais, misturas de sais e formas de ácido livre também estão incluídos.

[00265] Patentes US representativas que ensinam a preparação do acoplamento contendo fósforo acima, incluem, mas não estão limitados a, patentes US nºs 3.687.808; 4.469.863; 4.476.301; 5.023.243; 5.177.195; 5.188.897; 5.264.423; 5.276.019; 5.278.302; 5.286.717; 5,321,131; 5.399.676; 5.405.939; 5.453.496; 5.455.233; 5.466.677; 5.476.925; 5.519.126; 5.536.821; 5.541.316; 5.550.111; 5.563.253; 5.571.799; 5.587.361; 5.625.050; 6.028.188; 6.124.445; 6.160.109; 6.169.170; 6.172.209; 6.239.265; 6.277.603; 6.326.199; 6.346.614; 6.444.423; 6.531.590; 6.534.639; 6.608.035; 6.683.167; 6.858.715; 6.867.294; 6.878.805; 7.015.315; 7.041.816; 7.273.933; 7.321.029; e patentes US RE39464, cada uma das quais está aqui incorporada, a título de referência.

[00266] Cadeias principais de RNA modificados que não incluem um átomo de fósforo nelas têm cadeias principais que são formadas por acoplamentos internucleosídeos de alquila ou cicloalquila de cadeia curta ou acoplamentos internucleosídeos mistos de alquila ou cicloalquila, ou um ou mais acoplamentos internucleosídeos

heteroatômicos ou heterocíclicos de cadeia curta. Estes incluem os que têm acoplamentos morfolino (formado, em parte, da porção do açúcar de um nucleosídeo); cadeias principais de siloxano; cadeias principais de sulfeto, sulfóxido e sulfona; cadeias principais de formacetil e tioformacetil; cadeias principais de formacetil e tioformacetil de metileno; alceno contendo cadeias principais; cadeias principais de sulfamato, cadeias principais de metileneimino e metilenehidrazino; cadeias principais de sulfonato e sulfonamida; cadeias principais de amida; e outros tendo partes componentes misturados N, O, S e CH<sub>2</sub>.

[00267] Patentes US representativas que ensinam a preparação do oligonucleosídeos, incluem, mas não estão limitados a, patentes US nºs 5.034.506; 5.166.315; 5.185.444; 5.214.134; 5.216.141; 5.235.033; 5.64.562; 5.264.564; 5.405.938; 5.434.257; 5.466.677; 5.470.967; 5.489.677; 5.541.307; 5.561.225; 5.596.086; 5.602.240; 5.608.046; 5.610.289; 5.618.704; 5.623.070; 5.663.312; 5.633.360; 5.677.437; e 5.677.439, cada uma das quais está aqui incorporada, a título de referência.

[00268] Em outras modalidades, miméticos de RNA adequados são contemplados para uso em iRNAs, em que tanto o açúcar e o acoplamento internucleosídeo, ou seja, a cadeia principal, das unidades de nucleotídeo são substituídos por novos grupos. As unidades de base são mantidas para a hibridização com um composto alvo de ácidos nucleicos apropriados. Um desses compostos oligoméricos, um mimético de RNA que foi mostrado como tendo excelentes propriedades de hibridização, é referido como um ácido nucleico peptídico (PNA). Em compostos PNA, a cadeia principal do açúcar de um RNA é substituída com uma amida contendo cadeia principal, em particular uma cadeia principal de aminoetilglicina. As nucleobases são mantidas e ligadas direta ou indiretamente aos

átomos de nitrogênio aza da porção amida da cadeia principal. Patentes US representativas que ensinam a preparação de compostos de PNA incluem, mas não estão limitadas a, patentes US nºs 5.539.082; 5.714.331 e 5.719.262, cada uma das quais está aqui incorporada, a título de referência. Compostos de PNA adicionais adequados para uso em iRNAs da invenção são descritos em, por exemplo, Nielsen et al., Science, 1991, 254, 1497-1500.

[00269] Algumas modalidades em destaque na invenção incluem RNAs com cadeias principais de fosforotioato e oligonucleosídeos com cadeias principais de heteroátomo e, em particular, --CH<sub>2</sub>--NH--CH<sub>2</sub>--, --CH<sub>2</sub>--N(CH<sub>3</sub>)--O--CH<sub>2</sub>-- [conhecido como cadeia principal de metileno (metilimino) ou de MMI], --CH<sub>2</sub>--O--N(CH<sub>3</sub>)--CH<sub>2</sub>--, --CH<sub>2</sub>--N(CH<sub>3</sub>)--N(CH<sub>3</sub>)--CH<sub>2</sub>-- and --N(CH<sub>3</sub>)--CH<sub>2</sub>--CH<sub>2</sub>-- [onde a cadeia principal nativa de fosfodiéster é representada como --O--P--O--CH<sub>2</sub>--] da patente US nº 5.489.677 referida acima e as cadeias principais de amida da patente US nº 5.602.240 referida acima. Em algumas modalidades, os RNAs em destaques aqui têm estruturas de cadeia principal de morfolino da patente US nº 5.034.506 acima referida.

[00270] Os RNAs modificados também podem conter uma ou mais porções de açúcar substituído. O iRNAs, por exemplo, dsRNAs destacados aqui podem incluir um dos seguintes na 2'-posição: OH; F; O-, S- ou N-alquil; O-, S-, ou N-alquenil; O-, S- ou N-alquinil; oi O-alquil-O-alquila, onde o alquila, alquenil e alquinil podem ser substituídos ou não substituídos alquila C<sub>1</sub> a C<sub>10</sub> ou alquenila e alquinila C<sub>2</sub> a C<sub>10</sub>. Modificações adequadas exemplares incluem O[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>O]<sub>m</sub>CH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OCH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH<sub>2</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ONH<sub>2</sub>, e O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ON[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>]<sub>2</sub>, onde n e m são de 1 a cerca de 10. Em outras modalidades, os dsRNAs incluem um dos seguintes na posição 2': alquila inferior C<sub>1</sub> a C<sub>10</sub>, alquila, alcarila, aralquila, O-alcarila ou O-aralquila inferior substituída, SH, SCH<sub>3</sub>,

OCN, Cl, Br, CN<sub>3</sub>, CF<sub>3</sub>, OCF<sub>3</sub>, SOCH<sub>3</sub>, SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, ONO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub>, heterocicloalquila, heterocicloalcarila, aminoalquilamino, polialquilamino, silil substituído, um grupo de clivagem de RNA, um grupo repórter, um intercalador, um grupo para melhorar as propriedades farmacocinéticas de um iRNA, ou um grupo para melhorar as propriedades farmacodinâmicas de um iRNA, e outros substituintes tendo propriedades semelhantes. Em algumas modalidades, a modificação inclui um 2' metóxi (2'-O--CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, também conhecido como 2'-O-(2-metoxietil) ou 2'-MOE) (Martin et al., Helv. Chim. Acta, 1995, 78:486-504), isto é, um grupo alcóxi-alcóxi. Outra modificação exemplar é o 2'-dimetilaminoxietoxi, ou seja, um grupo O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>ON(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, também conhecido como 2'-DMAOE, conforme descrito em exemplos neste documento abaixo, e 2'-dimetilaminoetoxietóxi (também conhecido na técnica como 2'-O-dimetilaminoetoxietil ou 2'-DMAEOE), ou seja, 2'-O--CH<sub>2</sub>--O--CH<sub>2</sub>--N(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>.

[00271] Outras modificações incluem 2'-metóxi (2'-OCH<sub>3</sub>), 2'-aminopropoxi (2'-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>) e 2'-fluoro (2'-F). Modificações semelhantes também podem ser feitas em outras posições sobre o RNA de um iRNA, particularmente a posição 3' do açúcar no nucleotídeo 3' terminal ou em dsRNAs 2'-5' ligados e a posição 5' do terminal 5'. Os iRNAs também podem ter miméticos de açúcar como porções ciclobutil no lugar do açúcar pentofuranosila. Patentes US representativas que ensinam a preparação de tais estruturas de açúcar modificadas, incluem, mas não estão limitados a, patentes US nºs 4.981.957; 5.118.800; 5.319.080; 5.359.044; 5.393.878; 5.446.137; 5.466.786; 5.514.785; 5.519.134; 5.567.811; 5.576.427; 5.591.722; 5.597.909; 5.610.300; 5.627.053; 5.639.873; 5.646.265; 5.658.873; 5.670.633; e 5.700.920, algumas das quais são de propriedade comum desse pedido. Todo o conteúdo de cada um dos anteriores

estão aqui incorporados, a título de referência.

[00272] Um iRNA também pode incluir modificações ou substituições de nucleobase (frequentemente referida na técnica apenas como "base"). Como usado aqui, nucleobases "não modificadas" ou "natural", incluem as bases purinas adenina (A) e guanina (G), e as bases pirimidina timina (T), citosina (C) e uracila (U). Nucleobases modificadas incluem outras nucleobases naturais e sintéticas, como deóxi-timina (dT), 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetil citosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metil e outros derivados alquila de adenina e guanina, 2-propil e outros derivados alquila de adenina e guanina, 2-tiouracila, 2-tiotimina, 2-tiocitosina, 5-halouracil e citosina, 5-propinil uracil e citosina, 6-azo uracila, citosina e timina, 5-uracil (pseudouracil), 4-tiouracila, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquila, 8-hidroxil anal e outras adeninas e guaninas 8-substituídas, 5-halo, especialmente 5-bromo, 5-trifluorometil e outras uracilas 5-substituídas e citosinas, 7-metilguanina, e 7-metiladenina, 8-azaguanina e 8-azaadenina, 7-deazaguanina e 7-daazaadenina e 3-deazaguanina e 3-deazaadenina. Outras nucleobases incluem aquelas descritas na patente US N° 3.687.808, aquelas descritas em Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine, Herdewijn, P. ed. Wiley-VCH, 2008; aquelas descritas na The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, pages 858-859, Kroschwitz, J. L, ed. John Wiley & Sons, 1990, aquelas descritas por Englisch et al., Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613, e aquelas descritas por Sanghvi, Y S., Chapter 15, dsRNA Research and Applications, pages 289-302, Crooke, S. T. and Lebleu, B., Ed., CRC Press, 1993. Algumas destas nucleobases são particularmente úteis para aumentar a afinidade de ligação dos compostos oligoméricos destacadas na invenção. Estes incluem pirimidinas 5-substituídas, 6-azapirimidinas e N-2, N-6 e 0-6 purinas

substituídas, incluindo 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracila, e 5-propinilcitosina. Substituições 5-metilcitosina mostraram aumentar a estabilidade duplex de ácidos nucleicos por 0,6-1,2°C (Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. and Lebleu, B., Eds., dsRNA Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278) e são substituições de base exemplares, mais particularmente quando combinadas com modificações de açúcar 2'-O-metoxietila.

[00273] Patentes US representativas que ensinam a preparação de certas das nucleobases modificadas observadas acima, incluem, mas não estão limitados a, patentes US nºs 3.687.808, 4.845.205; 5.130.30; 5.134.066; 5.175.273; 5.367.066; 5,432,272; 5.457.187; 5.459.255; 5.484.908; 5,502,177; 5.525.711; 5.552.540; 5.587.469; 5.594.121, 5.596.091; 5.614.617; 5.681.941; 5.750.692; 6.015.886; 6.147.200; 6.166.197; 6.222.025; 6.235.887; 6.380.368; 6.528.640; 6.639.062; 6.617.438; 7.045.610; 7.427.672; e 7.495.088, cada uma das quais está aqui incorporada, a título de referência.

[00274] O RNA de um iRNA também pode ser modificado para incluir um ou mais porções de açúcar bicíclico. Um "açúcar bicíclico" é um anel furanosil modificado pela ponte de dois átomos. Um "nucleosídeo bicíclico" ("BNA") é um nucleosídeo tendo um agrupamento de açúcar compreendendo uma ponte que liga dois átomos de carbono do anel de açúcar, formando um sistema de anel bicíclico. Em certas modalidades, a ponte liga o carbono 4' e o carbono 2' do anel de açúcar. Assim, em algumas modalidades um agente da invenção pode incluir o RNA de um iRNA também pode ser modificado para incluir um ou mais ácidos nucleicos bloqueados (LNA). Um ácido nucleico bloqueado e um nucleotídeo tendo agrupamento ribose modificado em que o agrupamento de ribose compreende uma ponte que liga os carbonos 2' e 4'. Em outras palavras, um LNA é um nucleotídeo compreendendo um agrupamento de açúcar bicíclico

compreendendo uma ponte 4'-CH<sub>2</sub>-O-2'. Esta estrutura efetivamente "bloqueia" a ribose na conformação estrutural 3'-endo. A adição de ácidos nucleicos bloqueados para os siRNAs foi mostrada aumentar a estabilidade de siRNA no soro, e para reduzir os efeitos fora do alvo (Elmen, J. et al., (2005) *Nucleic Acids Research* 33(1):439-447; Mook, OR. et al., (2007) *Mol Canc Ther* 6(3):833-843; Grunweller, A. et al., (2003) *Nucleic Acids Research* 31(12):3185-3193).

[00275] Exemplos de nucleosídeos bicíclicos para uso nos polinucleotídeos da invenção incluem, sem limitação, nucleosídeos compreendendo uma ponte entre os átomos de anel ribosil 4' e 2'. Em certas modalidades, os agentes polinucleotídicos antissenso da invenção incluem um ou mais nucleosídeos bicíclicos compreendendo uma ponte 4' a 2'. Exemplos de tais nucleosídeos bicíclicos com pontes 4' a 2', incluem, mas não estão limitados a, 4'-(CH<sub>2</sub>)—O-2' (LNA); 4'-(CH<sub>2</sub>)—S-2'; 4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>—O-2' (ENA); 4'-CH(CH<sub>3</sub>)—O-2' (também conhecido como "etil limitado" ou "cEt") e 4'-CH(CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>)—O-2' (e análogos destes; ver, por exemplo, patente US N° 7.399.845); 4'-C(CH<sub>3</sub>)(CH<sub>3</sub>)—O-2' (e análogos destes; ver, por exemplo, a patente US n° 8.278.283); 4'-CH<sub>2</sub>—N(OCH<sub>3</sub>)-2' (e análogos deste; ver patente US n° 8.278.425); 4'-CH<sub>2</sub>—O—N(CH<sub>3</sub>)-2' (ver, por exemplo, patente US n° 2004/0171570); 4'-CH<sub>2</sub>—N(R)—O-2', onde R é H, alquila C1-C12, ou um grupo de proteção (ver, por exemplo, patente US N° 7.427.672); 4'-CH<sub>2</sub>—C(H)(CH<sub>3</sub>)-2' (ver, por exemplo, Chattopadhyaya et al., *J. Org. Chem.*, 2009, 74, 118-134); e 4'-CH<sub>2</sub>—C(=CH<sub>2</sub>)-2' (e análogos destes; ver, por exemplo, patente US n° 8.278.426). Todo o conteúdo de cada um dos anteriores estão aqui incorporados, a título de referência.

[00276] Patentes US e publicações de patentes adicionais representativas que ensinam a preparação de nucleotídeos de ácido nucleico bloqueados incluem, mas não estão limitados a, os seguintes:

patentes US nºs 6.268.490; 6.525.191; 6.670.461; 6.770.748; 6.794.499; 6,998,484; 7.053.207; 7.034.133; 7.084.125; 7.399.845; 7.427.672; 7.569.686; 7.741.457; 8.022.193; 8.030.467; 8.278.425; 8.278.426; 8.278.283; US 2008/0039618; e US 2009/0012281, cada uma das quais está aqui incorporada, a título de referência.

[00277] Qualquer um dos nucleosídeos bicíclicos anteriores podem ser preparados com uma ou mais configurações de açúcar estereoquímica, incluindo, por exemplo,  $\alpha$ -L-ribofuranose e  $\beta$ -D-ribofuranose (ver WO 99/14226).

[00278] O RNA de um iRNA também pode ser modificado para incluir um ou mais nucleotídeos etílicos restritos. Como usado aqui, um "nucleotídeo etílico restrito" ou "cEt" é um ácido nucleico bloqueado compreendendo um agrupamento de açúcar bicíclico compreendendo uma ponte 4'-CH(CH<sub>3</sub>)-O-2'. Em uma modalidade, um nucleotídeo etílico restrito está na conformação S referida aqui como "S-cEt".

[00279] Um iRNA da invenção também pode incluir um ou mais "nucleotídeos conformacionalmente restrito" ("CRN"). CRN são análogos de nucleotídeos com um li7 conectando os carbonos C2' e C4' de ribose ou os carbonos C3 e C5' de ribose. CRN bloqueia o anel de ribose em uma conformação estável e aumenta a afinidade de hibridação para mRNA. O ligante é de comprimento suficiente para colocar o oxigênio em uma posição ideal para estabilidade e afinidade, resultando em menor enrugamento do anel de ribose.

[00280] Publicações representativas que ensinam a preparação de certos CRN observados acima incluem, mas não estão limitadas a, publicação de patente US nº 2013/0190383 e publicação PCT WO 2013/036868, cada uma das quais está aqui incorporada, a título de referência.

[00281] Um ou mais dos nucleotídeos de um iRNA da invenção podem incluir também um nucleotídeo substituído hidroxila.metila Um

"nucleotídeo substituído hidroximetil" é um 2'-3'-seco-nucleotídeo acíclico, também referido como uma modificação "ácido nucleico desbloqueado" ("UNA").

[00282] As publicações US representativas que ensinam a preparação de UNA incluem, mas não estão limitadas a, patentes US nº 8.314.227, e publicações de patente US Nos. 2013/0096289; 2013/0011922; e 2011/0313020, cada uma das quais está aqui incorporada, a título de referência.

[00283] Modificações potencialmente estabilizantes para as extremidades das moléculas de RNA podem incluir N-(acetilaminocaproil)-4-hidroxiprolinol (Hyp-C6-NHAc), N-(caproil-4-hidroxiprolinol (Hyp-C6), N-(acetil-4-hidroxiprolinol (Hyp-NHAc), timidina-2'-0-deoxitimidina (éter), N-(aminocaproil)-4-hidroxiprolinol (Hyp-C6-amino), 2-docosanoil-uridina-3"-fosfato, base invertida dT(idT) e outros. Revelação desta modificação pode ser encontrada na publicação do PCT nº WO 2011/005861.

*A. iRNAs modificados compreendendo motivos da invenção*

[00284] Em certos aspectos da invenção, os agentes de RNAi de fita dupla da invenção incluem agentes com modificações químicas como, por exemplo, revelado na Aplicação Provisória US nº 61/561,710, depositado em 18 de novembro de 2011, ou, na PCT/US2012/065691, depositada em 16 de novembro de 2012, cada um das quais está aqui incorporado, a título de referência.

[00285] Como mostrado aqui, na aplicação provisória nº 61/561,710, e no PCT/US2012/065691, um resultado superior pode ser obtido através da introdução de um ou mais motivos de três modificações idênticas em três nucleotídeos consecutivos em uma fita senso e/ou fita antissenso do agente de RNAi, especialmente em ou perto do sítio de clivagem. Em algumas modalidades, a fita senso e fita antissenso do agente de RNAi pode não ser completamente

modificado. A introdução destes motivos interrompe o padrão de modificação, se presente, da fita senso e/ou fita antissenso. O agente de RNAi pode opcionalmente ser conjugado com um ligante GalNAc derivado, por exemplo, na fita senso. Os agentes de RNAi resultantes apresentam atividade de silenciamento gênico superior.

[00286] Mais especificamente, foi surpreendentemente descoberto que quando a fita senso e fita antissenso do agente de RNAi de fita dupla são modificadas para ter um ou mais motivos de três modificações idênticas em três nucleotídeos consecutivos em ou perto do sítio de clivagem de pelo menos uma fita de um agente de RNAi, a atividade de silenciamento gênico do agente de RNAi foi superiormente potenciada.

[00287] Em uma modalidade, o agente de RNAi é um bluntmer de extremidade dupla de 19 nucleotídeos de comprimento, onde o a fita senso contém pelo menos um motivo de três modificações 2'-F em três nucleotídeos consecutivos nas posições 7, 8, 9 da extremidade 5'. A fita antissenso contém pelo menos um motivo de três modificações 2'-O-metila em três nucleotídeos consecutivos nas posições 11, 12, 13 da extremidade 5'.

[00288] Em outra modalidade, o agente de RNAi é um bluntmer de extremidade dupla de 20 nucleotídeos de comprimento, onde a fita senso contém pelo menos um motivo de três modificações 2'-F em três nucleotídeos consecutivos nas posições 8, 9, 10 da extremidade 5'. A fita antissenso contém pelo menos um motivo de três modificações 2'-O-metila em três nucleotídeos consecutivos nas posições 11, 12, 13 da extremidade 5'.

[00289] Em ainda outra modalidade, o agente de RNAi é um bluntmer de extremidade dupla de 21 nucleotídeos de comprimento, onde o a fita senso contém pelo menos um motivo de três modificações 2'-F em três nucleotídeos consecutivos nas posições 9,

10, 11 da extremidade 5'. A fita antissenso contém pelo menos um motivo de três modificações 2'-O-metila em três nucleotídeos consecutivos nas posições 11, 12, 13 da extremidade 5'.

[00290] Em uma modalidade, o agente de RNAi compreende uma fita senso de 21 nucleotídeos e uma fita antissenso de 23 nucleotídeos, onde a fita senso contém pelo menos um motivo de três modificações 2'-F em três nucleotídeos consecutivos nas posições 9, 10, 11 da extremidade 5'; a fita antissenso contém pelo menos um motivo de três modificações 2'-O-metila em três nucleotídeos consecutivos nas posições 11, 12, 13 da extremidade 5', onde uma extremidade do agente de RNAi é cega, enquanto a outra extremidade compreende uma saliência de 2 nucleotídeos. Preferencialmente, a saliência de 2 nucleotídeos é a extremidade 3' da fita antissenso. Quando a saliência de 2 nucleotídeos é a extremidade 3' da fita antissenso, pode haver duas ligações internucleotídeo fosforotioato entre o terminal de três nucleotídeos, onde dois dos três nucleotídeos são os nucleotídeos da saliência, e o terceiro nucleotídeo é um nucleotídeo emparelhado ao lado do nucleotídeo de saliência. Em uma modalidade, o agente de RNAi além disso tem dois acoplamentos internucleotídeo de fosforotioato entre o terminal de três nucleotídeos tanto a extremidade 5' da fita senso como na extremidade 5' da fita antissenso. Em uma modalidade, cada nucleotídeo na fita senso e a fita antissenso do agente de RNAi, incluindo os nucleotídeos que são parte dos motivos são nucleotídeos modificados. Em uma modalidade cada resíduo é modificado de forma independente com um 2'-O-metila ou 3'-fluoro, por exemplo, em um motivo alternado. Opcionalmente, o agente de RNAi ainda inclui um ligante (de preferência GalNAc3).

[00291] Em uma modalidade, o agente de RNAi compreende a fita senso e fita antissenso, onde o agente de RNAi compreende uma primeira fita tendo um comprimento que é de, pelo menos, 25 e, no

máximo, de 29 nucleotídeos e uma segunda fita tendo um comprimento que é no máximo de 30 nucleotídeos com pelo menos um motivo de três modificações 2'-O-metila em três nucleotídeos consecutivos na posição 11, 12, 13 a partir da extremidade 5'; em que a extremidade 3' da primeira fita e da extremidade 5' da segunda fita formam uma extremidade cega e a segunda fita é de 1 a 4 nucleotídeos de comprimento na sua extremidade 3' do que a primeira fita, onde a região duplex que é de pelo menos 25 nucleotídeos de comprimento, e a segunda fita é suficientemente complementar a um análogo de mRNA alvo ao longo de pelo menos 19 nucleotídeos do comprimento da segunda fita para reduzir a expressão do gene alvo quando o agente de RNAi é introduzido em uma célula de mamíferos, e em que a clivagem dicer do agente de RNAi resulta preferencialmente em um siRNA compreendendo a extremidade 3' final da segunda fita, reduzindo assim a expressão do gene-alvo no mamífero. Opcionalmente, o agente de RNAi inclui ainda um ligante.

[00292] Em uma modalidade, a fita senso do agente de RNAi contém pelo menos um motivo de três modificações idênticas em três nucleótidos consecutivos, onde um dos motivos ocorre no sítio de clivagem na fita senso.

[00293] Em uma modalidade, a fita antissenso do agente de RNAi também pode conter pelo menos um motivo de três modificações idênticas em três nucleotídeos consecutivos, onde um dos motivos ocorre no ou perto do sítio de clivagem na fita antissenso.

[00294] Para um agente de RNAi com uma região duplex de 17-23 nucleotídeos de comprimento, o sítio de clivagem da fita antissenso é normalmente em torno de 10, 11 e 12 posições da extremidade 5'. Assim, os motivos de três modificações idênticas podem ocorrer nas posições 9, 10, 11, posições 10, 11; 12; posições 11, 12, 13; posições 12, 13, 14 ou posições 13, 14, 15 da fita antissenso, a contagem

começando a partir do primeiro nucleotídeo da extremidade 5' da fita antissenso, ou, a contagem começando a partir do 1º de nucleotídeos pareado na região duplex da extremidade 5' da fita antissenso. O sítio de clivagem na fita antissenso também pode mudar, de acordo com o comprimento da região duplex do RNAi da extremidade 5'.

[00295] A fita senso do agente do RNAi pode conter pelo menos um motivo de três modificações idênticas em três nucleotídeos consecutivos no sítio de clivagem da fita; e a fita antissenso pode ter pelo menos um motivo de três modificações idênticas em três nucleotídeos consecutivos em ou perto do sítio de clivagem da fita. Quando a fita senso e a fita antissenso formam um dsRNA duplex, a fita senso e a fita antissenso podem ser orientadas de forma que um motivo de três nucleotídeos na fita senso e um motivo de três nucleotídeos na fita antissenso têm pelo menos uma sobreposição de nucleotídeos, ou seja, pelo menos um dos três nucleotídeos do motivo na fita senso forma um par de base com pelo menos um dos três nucleotídeos do motivo na fita antissenso. Alternativamente, pelo menos dois nucleotídeos podem se sobrepor, ou todos os três nucleotídeos podem se sobrepor.

[00296] Em uma modalidade, a fita senso do agente de RNAi pode conter mais de um motivo de três modificações idênticas em três nucleotídeos consecutivos. O primeiro motivo pode ocorrer em ou perto do sítio de clivagem da fita e a outros motivos pode ser uma modificação da asa. O termo "modificação da asa" neste documento refere-se a um motivo ocorrendo em outra parte da fita que é separada do motivo no ou perto do sítio de clivagem da mesma fita. A modificação da asa é adjacente para o primeiro motivo ou é separada por pelo menos um ou mais nucleotídeos. Quando os motivos são imediatamente adjacentes uns aos outros, então, a química dos motivos são distintas umas das outras e quando os motivos são

separados por um ou mais nucleotídeos que os produtos químicos podem ser os mesmos ou diferentes. Duas ou mais modificações de asa podem estar presentes. Por exemplo, quando duas modificações de asa estão presentes, cada modificação de asa pode ocorrer em uma extremidade em relação ao primeiro motivo que está no ou perto do sítio de clivagem em ambos os lados do motivo principal.

[00297] Como na fita senso, a fita antissenso do agente de RNAi também pode conter pelo menos um motivo de três modificações idênticas em três nucleotídeos consecutivos, com pelo menos um dos motivos ocorrendo no ou perto do sítio de clivagem na fita. Esta fita antissenso também pode conter uma ou mais modificações da asa em um alinhamento semelhante às modificações da asa que podem estar presentes na fita senso.

[00298] Em uma modalidade, a modificação da asa na fita senso ou fita antissenso do agente de RNAi normalmente não incluem o primeiro um ou dois nucleotídeos terminais na extremidade 3', 5' ou ambas as extremidades da fita.

[00299] Em outra modalidade, a modificação da asa na fita senso ou na fita antissenso do agente de RNAi normalmente não inclui o primeiro um ou dois nucleotídeos pareados na região duplex na extremidade 3', 5' ou ambas as extremidades da fita.

[00300] Quando a fita senso e a fita antissenso do agente de RNAi cada contêm pelo menos uma modificação da asa, as modificações da asa podem cair na mesma extremidade da região duplex e possuem uma sobreposição de um, dois ou três nucleotídeos.

[00301] Quando a fita senso e a fita antissenso do agente de RNAi cada conter pelo menos duas modificações da asa, a fita senso e a fita antissenso podem ser orientadas de forma a que duas modificações cada de uma fita cai em uma extremidade da região duplex, tendo uma sobreposição de um, dois ou três nucleotídeos;

duas modificações cada de uma fita cai sobre a outra extremidade da região duplex, com uma sobreposição de um, dois ou três nucleotídeos; duas modificações uma fita cai em cada lado do motivo principal, tendo uma sobreposição de um, dois ou três nucleotídeos na região duplex.

[00302] Em uma modalidade, cada nucleotídeo na fita senso e a fita antissenso do agente de RNAi, incluindo os nucleotídeos que são parte dos motivos podem ser modificados. Cada nucleotídeo pode ser modificado com a mesma ou diferente modificação que pode incluir uma ou mais a alteração de um ou ambos dos oxigênios de fosfato não ligante e/ou de um ou mais dos oxigênios de fosfato ligados; alteração de um componente do açúcar ribose como, por exemplo, do 2' hidroxila no açúcar ribose; substituição indiscriminada do agrupamento de fosfato com ligantes "defosfo"; modificação ou substituição de uma base de ocorrência natural; e a substituição ou modificação da cadeia principal ribose-fosfato.

[00303] Como ácidos nucleicos são polímeros de subunidades, muitas das modificações ocorrem em uma posição que é repetida dentro de um ácido nucleico, por exemplo, uma modificação de uma base, ou um agrupamento de fosfato, ou um O não ligante de um agrupamento fosfato. Em alguns casos a modificação ocorrerá em todas as posições de sujeitas no ácido nucléico, mas em muitos casos não. A título de exemplo, uma modificação só pode ocorrer em uma posição 3' ou 5' terminal, só pode ocorrer em uma região terminal, como, por exemplo, em uma posição em um nucleotídeo terminal ou nos últimos 2, 3, 4, 5, ou 10 nucleotídeos de uma fita. Uma modificação pode ocorrer em uma região de fita dupla, uma região de fita única ou em ambas. Uma modificação pode ocorrer apenas na região de fita dupla de um RNA ou só pode ocorrer em uma região de fita simples de um RNA. Por exemplo, uma modificação de

fosforotioato em uma posição O não ligante só pode ocorrer em um ou ambos os terminos, só pode ocorrer em uma região terminal, como, por exemplo, em uma posição em um nucleotídeo terminal ou nos últimos 2, 3, 4, 5, ou 10 nucleotídeos de uma fita, ou pode ocorrer em regiões de fita dupla e de fita simples, sobretudo nos terminos. A extremidade 5' ou extremidades podem ser fosforiladas.

[00304] Pode ser possível, por exemplo, melhorar a estabilidade, para incluir bases específicas em saliências, ou para incluir nucleotídeos modificados ou substitutos de nucleotídeos, em saliências de fita simples, por exemplo, em uma saliência 5' ou 3', ou em ambos. Por exemplo, pode ser desejável a inclusão de nucleotídeos purina nas saliências. Em algumas modalidades todas ou algumas das bases em uma saliência 3' ou 5' podem ser modificada, por exemplo, com uma modificação descrita aqui. As modificações podem incluir, por exemplo, o uso de modificações na posição 2' do açúcar ribose com modificações que são conhecidas na técnica, por exemplo, o uso de desoxiribonucleotídeos, 2'-desóxi-2'-fluoro (2'-F) ou 2'-O-metila modificados em vez do riboaçúcar da nucleobase, e modificações no grupo fosfato como, por exemplo, modificações fosforotioato. Saliências não precisam ser homólogas com a sequência-alvo.

[00305] Em uma modalidade, cada resíduo da fita senso e fita antissenso é modificado de forma independente com o LNA, HNA, CeNA-2'-metoxietila, 2'-O-metilaila, 2'-O-alila, 2'-C-alila, 2'-desóxi, 2'-hidróxi, ou 2'-fluoro. As fitas podem conter mais de uma modificação. Em uma modalidade, cada resíduo da fita senso e fita antissenso é modificado de forma independente com 2'-O-metila ou 2'-fluoro.

[00306] Pelo menos duas diferentes modificações estão normalmente presentes na fita senso e fita antissenso. Essas duas modificações podem ser as modificações 2'-O-metila ou 2'-fluoro, ou

outras.

[00307] Em uma modalidade, o Na e/ou Nb compreende modificações de um padrão alternado. O termo "motivo alternando" como usado aqui refere-se a um motivo tendo uma ou mais modificações, cada modificação ocorrendo em nucleotídeos alternados de uma fita. O nucleotídeo alternado pode referir-se a um por cada outro nucleotídeo ou um por cada três nucleotídeos, ou um padrão semelhante. Por exemplo, se A, B e C representam cada um um tipo de modificação do nucleotídeo, o motivo alternado pode ser "ABABABABABAB...", "AABBAABBAABB...", "AABAABAABAAB...", "AAABAAABAAAB...", "AAABBBAAABBB..." ou "ABCABCABCABC...", etc.

[00308] O tipo de modificações contidas no motivo alternado pode ser a mesma ou diferente. Por exemplo, se A, B, C, D cada um representa um tipo de modificação no nucleotídeo, o padrão alternado, ou seja, modificações em cada outro nucleotídeo, pode ser o mesmo, mas cada uma da fita senso ou fita antissenso pode ser selecionada a partir de várias possibilidades de modificações dentro do motivo alternado como "ABABAB...", "ACACAC..." "BDBDBD..." ou "CDCDCD...", etc.

[00309] Em uma modalidade, o agente de RNAi da invenção compreende o padrão de modificação para o motivo alternado na fita senso em relação ao padrão de modificação para o motivo alternado na fita antissenso está deslocado. O deslocamento pode ser tal que o grupo modificado de nucleotídeos da fita senso corresponde a um diferente grupo modificado de nucleotídeos da fita antissenso e vice-versa. Por exemplo, a fita senso quando pareada com a fita antissenso no duplex dsRNA, o motivo alternado na fita senso pode começar com "ABABAB" a partir de 5' 3' da fita e o motivo alternado na fita antissenso pode começar com "BABABA" a partir de 5'-3' da fita dentro

da região duplex. Como outro exemplo, o motivo alternado na fita senso pode começar com "AABBAABB" a partir de 5' 3' da fita e o motivo alternado na fita antissenso pode começar com "BBAABBAA" de 5'-3' da fita dentro da região duplex, de modo que há uma mudança completa ou parcial dos padrões de modificação entre a fita senso e a fita antissenso.

[00310] Em uma modalidade, o agente de RNAi compreende o padrão do motivo alternado da modificação 2'-O-metila e modificação 2'-F na fita senso inicialmente, tem uma mudança em relação ao padrão do motivo alternado da modificação 2'-O-metila e modificação 2'-F da fita antissenso inicialmente, ou seja, o nucleotídeo modificado 2'-O-metila nos pares de base na fita senso com um nucleotídeo modificado 2'-F na fita antissenso e vice-versa. A posição 1 da fita senso pode começar com a modificação 2'-F, e a posição 1 da fita antissenso pode começar com a modificação 2'-O-metilaila.metila

[00311] A introdução de um ou mais motivos de três modificações idênticas em três nucleotídeos consecutivos para a fita senso e/ou fita antissenso interrompe o padrão de modificação inicial presente na fita senso e/ou fita antissenso. Esta interrupção da modificação do padrão da fita senso e/ou fita antissenso, introduzindo um ou mais motivos de três modificações idênticas em três nucleotídeos consecutivos para a fita senso e/ou fita antissenso surpreendentemente potencializa a atividade de silenciamento gênico para o gene-alvo.

[00312] Em uma modalidade, quando o motivo de três modificações idênticas em três nucleotídeos consecutivos é introduzido em qualquer uma das fitas, a modificação do nucleotídeo ao lado do motivo é uma modificação diferente do que a modificação do motivo. Por exemplo, a porção da sequência contendo o motivo é "...NaYYNb...", onde "Y" representa a modificação do motivo de três modificações idênticas em três nucleotídeos consecutivos, e "Na" e "Nb" representam uma

modificação para o nucleotídeo ao lado do motivo "YYY" que é diferente da modificação de Y, e onde Na e Nb podem ser modificações iguais ou diferentes. Alternativamente, Na e/ou Nb podem estar presentes ou ausentes quando há uma modificação de asa presente.

[00313] O agente de RNAi pode incluir ainda pelo menos um acoplamento internucleotídeo e fosforotioato ou metilfosfonato. A modificação de acoplamento internucleotídeo de fosforotioato e metilfosfonato pode ocorrer em qualquer nucleotídeo da fita senso ou fita antissenso ou ambas as fitas em qualquer posição da fita. Por exemplo, a modificação do acoplamento de internucleotídeo pode ocorrer em cada nucleotídeo na fita senso e/ou fita antissenso; cada modificação do acoplamento internucleotídeo pode ocorrer em um padrão alternado na fita senso e/ou fita antissenso; ou a fita senso ou fita antissenso pode conter ambas as modificações de acoplamento internucleotídeo em um padrão alternado. O padrão alternado da modificação do acoplamento internucleotídeo na fita senso pode ser o mesmo ou diferente da fita antissenso, e o padrão alternado da modificação do acoplamento internucleotídeo na fita senso pode ter um deslocamento em relação ao padrão alternado de modificação de acoplamento internucleotídeo sobre a fita antissenso.

[00314] Em uma modalidade, o RNAi compreende uma modificação de acoplamento internucleotídeo de fosforotioato e metilfosfonato na região de saliência. Por exemplo, a região de saliência pode conter dois nucleotídeos tendo um acoplamento internucleotídeo de fosforotioato e metilfosfonato entre os dois nucleotídeos. Modificações do acoplamento Internucleotídeo também podem ser feitas para ligar os nucleotídeos de saliência com os nucleotídeos pareados terminais da região duplex. Por exemplo, pelo menos 2, 3, 4, ou todos os nucleotídeos de saliência podem ser ligados através de acoplamentos

internucleotídeos de fosforotioato ou metilfosfonato e, opcionalmente, pode haver mais acoplamentos internucleotídeos de fosforotioato e metilfosfonato ligando o nucleotídeo de saliência com um nucleotídeo pareado que fica ao lado do nucleotídeo de saliência. Por exemplo, pode haver pelo menos dois acoplamentos internucleotídeo de fosforotioato entre os três nucleotídeos terminal, onde dois dos três nucleotídeos são os nucleotídeos de saliência, e o terceiro nucleotídeo é um nucleotídeo pareado ao lado do nucleotídeo de saliência. Estes três nucleotídeos terminais podem ter na extremidade 3' da fita antissenso, uma extremidade 3' da fita senso, a extremidade 5' da fita antissenso, e/ou a extremidade 5' da fita antissenso.

[00315] Em uma modalidade, a saliência de 2 nucleotídeos é a extremidade 3' da fita antissenso, e pode haver duas ligações internucleotídeo fosforotioato entre o terminal de três nucleotídeos, onde dois dos três nucleotídeos são os nucleotídeos da saliência, e o terceiro nucleotídeo é um nucleotídeo emparelhado ao lado do nucleotídeo de saliência. Opcionalmente, o agente de RNAi pode além disso ter dois acoplamentos internucleotídeo de fosforotioato entre o terminal de três nucleotídeos tanto a extremidade 5' da fita senso como na extremidade 5' da fita antissenso.

[00316] Em uma modalidade, o agente de RNAi compreende um não pareamento(s) com o alvo, dentro do duplex, ou suas combinações. Um "não pareamento" pode ser pareamento de bases não canônico ou outro que não pareamento canônico de nucleotídeos. O não pareamento pode ocorrer na região de saliência ou região duplex. O par de base pode ser classificado com base na sua propensão para promover a dissociação ou fusão (por exemplo, sobre a energia livre de associação ou dissociação de um par em particular, a abordagem mais simples é examinar os pares em um par de bases individual, embora próximo vizinho ou análise semelhante também

possa ser usado). Em termos de promoção da dissociação: A:U é preferido sobre G:C; G:U é preferido sobre G:C; e I:C é preferido sobre G:C (I=inosina). Não pareamento, por exemplo, pareamentos não canônicos ou outros que não canônicos (conforme já descrito neste documento) são preferidos sobre pareamentos canônicos (A:T, A:U, G:C); e pareamentos que incluem uma base universal são preferidos sobre pareamentos canônicos. Uma "base universal" é uma base que apresenta a capacidade de substituir qualquer uma das quatro bases normal (G, C, A e U) sem desestabilizar significativamente as interações de pares de base vizinhas ou interromper a utilidade bioquímica funcional esperada do oligonucleotídeo modificado. Exemplos não limitantes de bases universais incluem 2'-desoxinosina (desoxinucleotídeo hipoxantia) ou seus derivados, análogos nitroazol e bases de ligação não hidrogênio aromáticos hidrofóbicos.

[00317] Em uma modalidade, o agente de RNAi compreende, pelo menos, um dos primeiros pares de base 1, 2, 3, 4, ou 5 dentro das regiões duplex da extremidade 5' da fita antissenso independentemente selecionado a partir do grupo de: A:U, G:U, I:C, e pares não pareados, como, por exemplo, não canônico ou outro que não pareamento canônico ou pareamentos que incluem uma base universal, para promover a dissociação da fita antissenso na extremidade 5' do duplex.

[00318] Em uma modalidade, o nucleotídeo na posição 1 dentro da região duplex a partir da extremidade 5' na fita antissenso é selecionado do grupo consistindo de A, dA, dU, U e dT. Alternativamente, pelo menos um dos primeiros pares de base 1, 2 ou 3 na região duplex da extremidade 5' da fita antissenso é um par de base AU. Por exemplo, o primeiro par de base na região duplex da extremidade 5' da fita antissenso é um par de base AU.

[00319] Em outra modalidade, o nucleotídeo na extremidade 3' da

fita senso é desóxi-timida (dT). Em outra modalidade, o nucleotídeo na extremidade 3' da fita antissenso é desóxi-timina (dT). Em uma modalidade, há uma sequência curta de nucleotídeos desóxi-timina, por exemplo, dois nucleotídeos dT na extremidade 3' da fita senso e/ou fita antissenso.

[00320] Em uma modalidade, a sequência de fita senso pode ser representado pela fórmula (I):



em que:

i e j são cada independente 0 ou 1;

p e q são cada independente 0-6;

cada Na independentemente representa uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-25 nucleotídeos modificados, cada sequência compreendendo, pelo menos, dois nucleotídeos modificados de forma diferente;

cada Nb independente representa uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-10 nucleotídeos modificados;

Cada np e nq independentemente representa um nucleotídeo de saliência;

em que Nb e Y não têm a mesma modificação; e

XXX, YYY e ZZZ cada independentemente representa um motivo de três idênticas modificações em três nucleotídeos consecutivos. De preferência YYY são todos nucleotídeos modificados 2'-F.

[00321] Em uma modalidade, o Na e/ou Nb compreende modificações de padrão alternado.

[00322] Em uma modalidade, o motivo YYY ocorre no ou perto do sítio de clivagem da fita senso. Por exemplo, quando o agente de RNAi tem uma região duplex de 17-23 nucleotídeos de comprimento, o motivo YYY pode ocorrer em ou perto do sítio de clivagem (por

exemplo, pode ocorrer nas posições 6, 7, 8, 7, 8, 9, 8, 9, 9, 10, 10, 11, 10, 11,12 ou 11, 12, 13) - a fita senso, a conta começando no primeiro nucleotídeo, a partir da extremidade 5'; ou, opcionalmente, a contagem começando no primeiro nucleotídeo pareado com a região duplex, a partir da extremidade 5'.

[00323] Em uma modalidade,  $i$  é 1 e  $j$  é 0, ou  $i$  é 0 e  $j$  é 1, ou ambos  $i$  e  $j$  são 1. A fita senso, portanto, pode ser representada pelas seguintes fórmulas:

5' np-Na-YYY-Nb-ZZZ-Na-nq 3' (Ib);

5' np-Na-XXX-Nb-YYY-Na-nq 3' (Ic); ou

5' np-Na-XXX-Nb-YYY-Nb-ZZZ-Na-nq 3' (Id).

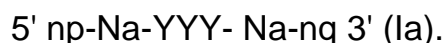
[00324] Quando a fita senso é representada pela fórmula (Ib), Nb representa uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 ou 0 nucleotídeos modificados. Cada Na independente pode representar uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 2-20, 2-15 ou 2-10 nucleotídeos modificados.

[00325] Quando a fita senso é representada como a fórmula (Ic), Nb representa uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 ou 0 nucleotídeos modificados. Cada Na independente representa uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 2-20, 2-15 ou 2-10 nucleotídeos modificados.

[00326] Quando a fita senso é representada pela fórmula (Id), cada Nb representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 ou 0 nucleotídeos modificados. De preferência, Nb is 0, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6. Cada Na independente representa uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 2-20, 2-15 ou 2-10 nucleotídeos modificados.

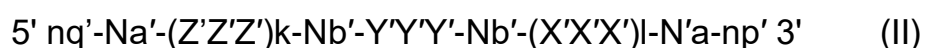
[00327] Cada um dos X, Y e Z podem ser os mesmos ou diferentes uns dos outros.

[00328] Em outras modalidades,  $i$  é 0 e  $j$  é 0, e a fita senso pode ser representada pela fórmula:



[00329] Quando a fita senso é representada pela fórmula (Ia), cada Na independentemente pode representar uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 2-20, 2-15 ou 2-10 nucleotídeos modificados.

[00330] Em uma modalidade, a sequência de fita antissenso do RNAi pode ser representada pela fórmula (II):



em que:

$k$  e  $l$  são cada independente 0 ou 1;

$p'$  e  $q'$  são cada independente 0-6;

cada Na' independentemente representa uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-25 nucleotídeos modificados, cada sequência compreendendo, pelo menos, dois nucleotídeos modificados de forma diferente;

cada Nb' independente representa uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-10 nucleotídeos modificados;

Cada np' e nq' independentemente representa um nucleotídeo de saliência;

em que Nb' e Y' não têm a mesma modificação;

e

X'X'X', Y'Y'Y' e Z'Z'Z' cada independentemente representa um motivo de três idênticas modificações em três nucleotídeos consecutivos.

[00331] Em uma modalidade, o Na' e/ou Nb' compreende modificações de padrão alternado.

[00332] Em uma modalidade, o motivo Y'Y'Y' ocorre no ou perto do sítio de clivagem da fita antissenso. Por exemplo, quando o agente de

RNAi tem uma região duplex de 17-23 nucleotídeos de comprimento, o motivo Y'Y'Y' pode ocorrer nas posições 9, 10, 11; 10, 11, 12; 11, 12, 13; 12, 13, 14; ou 13, 14, 15 da fita antissenso, com a conta começando no primeiro nucleotídeo, a partir da extremidade 5'; ou, opcionalmente, a contagem começando no primeiro nucleotídeo pareado com a região duplex, a partir da extremidade 5'. De preferência, o motivo Y'Y'Y' ocorre nas posições 11, 12, 13.

[00333] Em uma modalidade, o motivo Y'Y'Y' são todos os nucleotídeos modificados 2'-OMe.

[00334] Em uma modalidade, k é 1 e l é 0, ou k é 0 e l é 1, ou ambos k e l são 1.

[00335] A fita antissenso, portanto, pode ser representada pelas seguintes fórmulas:

[00336] 5' nq'-Na'-Z'Z'Z'-Nb'-Y'Y'Y'-Na'-np' (IIb);

[00337] 5' nq'-Na'-Y'Y'Y'-Nb'-X'X'X'-np' 3' (IIc); ou

[00338] 5' nq'-Na'- Z'Z'Z'-Nb'-Y'Y'Y'-Nb'- X'X'X'-Na'-np' 3' (IId).

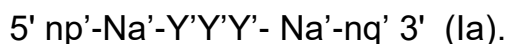
[00339] Quando a fita antissenso é representada pela fórmula (IIb), Nb' representa uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 ou 0 nucleotídeos modificados. Cada Na' independente representa uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 2-20, 2-15 ou 2-10 nucleotídeos modificados.

[00340] Quando a fita antissenso é representada como a fórmula (IIc), Nb' representa uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 ou 0 nucleotídeos modificados. Cada Na' independente representa uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 2-20, 2-15 ou 2-10 nucleotídeos modificados.

[00341] Quando a fita antissenso é representada como fórmula (IId), cada Nb' representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 ou

0 nucleotídeos modificados. Cada Na' independente representa uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 2-20, 2-15 ou 2-10 nucleotídeos modificados. De preferência, Nb is 0, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6.

[00342] Em outras modalidades, k é 0 e l é 0, e a fita antissenso pode ser representada pela fórmula:



[00343] Quando a fita antissenso é representada como fórmula (IIa), cada Na' independentemente representar uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 2-20, 2-15 ou 2-10 nucleotídeos modificados.

[00344] Cada um dos X', Y' e Z' podem ser os mesmos ou diferentes uns dos outros.

[00345] Cada resíduo da fita senso e fita antissenso pode ser modificado de forma independente com o LNA, HNA, CeNA-2'-metoxietila, 2'-O-metilaila, 2'-O-alila, 2'-C-alila, 2'-hidroxila, ou 2'-fluoro. Por exemplo, cada nucleotídeo da fita senso e fita antissenso é modificado de forma independente com 2'-O-metila ou 2'-fluoro. Cada X, Y, Z, X', Y' e Z', em particular, pode representar uma modificação 2'-O-metila ou uma modificação 2'-fluoro.

[00346] Em uma modalidade, a fita senso do agente de RNAi pode conter o motivo YYY ocorrendo nas posições 9, 10 e 11 da fita quando a região duplex é 21 nt, a contagem começando do 1º nucleotídeo da extremidade 5', ou, opcionalmente, a contagem começando a partir do 1º nucleotídeo pareado na região duplex, a partir da extremidade 5'; e Y representa a modificação 2'-F. A fita senso poderá conter adicionalmente o motivo XXX ou motivos ZZZ como modificações asa na extremidade oposta da região duplex; e XXX e ZZZ cada independentemente representa uma modificação 2'-OMe ou modificação 2'-F.

[00347] Em uma modalidade a fita antissenso pode conter o motivo

Y'Y'Y' ocorrendo nas posições 11, 12, 13 da fita, a contar começando do 1º nucleotídeo da extremidade 5', ou, opcionalmente, a contagem começando partir do 1º nucleotídeo pareado na região duplex, a partir da extremidade 5'; e Y' representa a modificação 2'-O-metilaila.metila. A fita antt-senso poderá conter o motivo X'X'X' ou motivos Z'Z'Z' como modificação de asa na extremidade oposta da região duplex; e X'X'X' e Z'Z'Z' cada um de forma independente representa uma modificação 2'-OMe ou modificação 2'-F.

[00348] A fita senso representada por qualquer uma das fórmulas acima (Ia), (Ib), (Ic) e (Id) forma um duplex com uma fita antissenso sendo representado por qualquer uma das fórmulas (IIa), (IIb), (IIc) e (IId), respectivamente.

[00349] Consequentemente, os agentes de RNAi para uso nos métodos da invenção podem incluir uma fita senso e uma fita antissenso, cada uma tendo 14 a 30 nucleotídeos, o RNAi duplex representado pela fórmula (III):

senso: 5' np -Na-(X X X)<sub>i</sub> -Nb- Y Y Y -Nb -(Z Z Z)<sub>j</sub>-Na-nq 3'

antissenso: 3' np'-Na'-(X'X'X')<sub>k</sub>-Nb'-Y'Y'Y'-Nb'-(Z'Z'Z')<sub>l</sub>-Na'-

nq' 5'

(III)

em que:

i, j, k, e l são cada independente 0 ou 1;

P, p',q e q' são cada independente 0-6;

cada Na e Na' independentemente representa uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-25 nucleotídeos modificados, cada sequência compreendendo, pelo menos, dois nucleotídeos modificados de forma diferente;

cada Nb e Nb' independente representa uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-10 nucleotídeos modificados;

em que

cada np', np, nq' e nq, cada um dos quais podem ou não estar presentes, independentemente representa um nucleotídeo de saliência; e

XXX, YYY, ZZZ, X'X'X', Y'Y'Y' e Z'Z'Z' cada independentemente representa um motivo de três idênticas modificações em três nucleotídeos consecutivos.

[00350] Em uma modalidade, i é 0 e j é 0; ou i é 1 e j é 0; ou i é 0 e j é 1; ou i e j são 0; ou ambos i e j são 1. Em outra modalidade, k é 0 e l é 0; ou k é 1 e l é 0; k é 0 e l é 1; ou ambos k e l são 0; ou ambos k e l são 1.

[00351] Combinações exemplares da fita senso e fita antissenso formando um RNAi duplex incluem as fórmulas abaixo:

$$5' \text{ np - Na - Y Y Y - Na - nq } 3'$$

$$3' \text{ np}'\text{-Na}'\text{-Y}'\text{Y}'\text{Y}'\text{-Na}'\text{ nq}' 5'$$

(IIIa)

$$5' \text{ np - Na - Y Y Y - Nb - Z Z Z - Na - nq } 3'$$

$$3' \text{ np}'\text{-Na}'\text{-Y}'\text{Y}'\text{Y}'\text{-Nb}'\text{-Z}'\text{Z}'\text{Z}'\text{-Na}'\text{ nq}' 5'$$

(IIIb)

$$5' \text{ np - Na - X X X - Nb - Y Y Y - Na - nq } 3'$$

$$3' \text{ np}'\text{-Na}'\text{-X}'\text{X}'\text{X}'\text{-Nb}'\text{-Y}'\text{Y}'\text{Y}'\text{-Na}'\text{ nq}' 5'$$

(IIIc)

$$5' \text{ np - Na - X X X - Nb - Y Y Y - Nb - Z Z Z - Na - nq } 3'$$

$$3' \text{ np}'\text{-Na}'\text{-X}'\text{X}'\text{X}'\text{-Nb}'\text{-Y}'\text{Y}'\text{Y}'\text{-Nb}'\text{-Z}'\text{Z}'\text{Z}'\text{-Na}'\text{ nq}' 5'$$

(III d)

$$5' - \text{ Na - Y Y Y - Na - } 3'$$

$$3' \text{ np}'\text{-Na}'\text{-Y}'\text{Y}'\text{Y}'\text{-Na}' 5'$$

(III e)

[00352] Quando o agente de RNAi é representado pela fórmula (IIIa), cada Na independentemente representa uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 2-20, 2-15 ou 2-10 nucleotídeos

modificados.

[00353] Quando o agente de RNAi é representado pela fórmula (IIb), cada Nb independentemente representa uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 1-10, 1-7, 1-5 ou 1-4 nucleotídeos modificados. Cada Na independente representa uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 2-20, 2-15 ou 2-10 nucleotídeos modificados.

[00354] Quando o agente de RNAi é representado como fórmula (IIIc), cada Nb, Nb' representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 ou 0 nucleotídeos modificados. Cada Na independente representa uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 2-20, 2-15 ou 2-10 nucleotídeos modificados.

[00355] Quando o agente de RNAi é representado como fórmula (IIId), cada Nb, Nb' representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 ou 0 nucleotídeos modificados. Cada Na, Na' independente representa uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 2-20, 2-15 ou 2-10 nucleotídeos modificados. Cada um de Na, Na', Nb e Nb' independentemente compreende modificações do padrão alternado.

[00356] Quando o agente de RNAi é representado como fórmula (IIId), cada Nb, Nb' representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 ou 0 nucleotídeos modificados. Cada Na, Na' independente representa uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 2-20, 2-15 ou 2-10 nucleotídeos modificados. Cada um de Na, Na', Nb e Nb' independentemente compreende modificações do padrão alternado.

[00357] Quando o agente de RNAi é representado como a fórmula (IIIe), cada Na e Na' independentemente representa uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-25 nucleotídeos que são

modificados ou não modificados ou suas combinações, cada sequência, compreendendo, pelo menos, dois nucleotídeos modificados de forma diferente.

[00358] Cada um dos X, Y e Z nas fórmulas (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc), (IIId) e (IIIe) podem ser os mesmos ou diferentes uns dos outros.

[00359] Quando o agente de RNAi é representado pela fórmula (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc), (IIId), e (IIIe) pelo menos um dos nucleotídeos Y pode formar um par de bases com um dos nucleotídeos Y'. Alternativamente, pelo menos dois dos nucleotídeos Y formam pares de base com os correspondentes nucleotídeos Y'; ou todos os três nucleotídeos Y formam pares de base com os correspondentes nucleotídeos Y'.

[00360] Quando o agente de RNAi é representado pela fórmula (IIIb) ou (IIId), pelo menos um dos nucleotídeos Z pode formar um par de base com um dos nucleotídeos Z'. Alternativamente, pelo menos dois dos nucleotídeos Z formam pares de base com o correspondente nucleotídeo Z'; ou todos os três do Z nucleotídeos formam pares de base com os correspondentes nucleotídeos Z'.

[00361] Quando o agente de RNAi é representado como fórmula (IIIc) ou (IIId), pelo menos um dos nucleotídeos Y pode formar um par de bases com um dos nucleotídeos Y'. Alternativamente, pelo menos dois dos nucleotídeos X formam pares de base com o correspondente nucleotídeo X'; ou todos os três nucleotídeos X formam pares de base com o correspondente nucleotídeo X'.

[00362] Em uma modalidade, a modificação no nucleotídeo Y é diferente do que a modificação no nucleotídeo Y', a modificação no nucleotídeo Z é diferente da modificação do nucleotídeos Z', e/ou a modificação no nucleotídeo X é diferente do que a modificação no nucleotídeo X'.

[00363] Em uma modalidade, quando o agente de RNAi é

representado pela fórmula (IIIId), as modificações Na são modificações 2'-O-metila ou 2'-fluoro. Em outra modalidade, quando o agente de RNAi é representado pela fórmula (IIIId), as modificações de Na são modificações 2'-O-metilaa ou 2'-fluoro e  $np' > 0$  e pelo menos um  $np'$  está ligado a um nucleotídeo vizinho via acoplamento fosforotioato. Em outra modalidade, quando o agente de RNAi é representado pela fórmula (IIIId), as modificações Na são modificações 2'-O-metilaa ou 2'-fluoro,  $np' > 0$  e pelo menos um  $np'$  está ligado a um nucleotídeo vizinho via acoplamento fosforotioato, e a fita senso está conjugada com um ou mais derivados GalNAc conectados através de um ligante ramificado monovalente, bivalente ou trivalente. Em outra modalidade, quando o agente de RNAi é representado pela fórmula (IIIId), as modificações Na são modificações 2'-O-metila ou 2'-fluoro,  $np' > 0$  e pelo menos um  $np'$  está ligado a um nucleotídeo vizinho via acoplamento fosforotioato, a fita senso inclui pelo menos um acoplamento fosforotioato, e a fita senso está conjugada a um ou mais derivados GalNAc conectados através de um ligante ramificado monovalente, bivalente ou trivalente.

[00364] Em uma modalidade, quando o agente de RNAi é representado pela fórmula (IIIa), as modificações Na são modificações 2'-O-metila ou 2'-fluoro,  $np' > 0$  e pelo menos um  $np'$  está ligado a um nucleotídeo vizinho através de acoplamento fosforotioato, a fita senso inclui pelo menos um acoplamento fosforotioato, e a fita senso está conjugada a um ou mais derivados GalNAc conectados através de um ligante ramificado monovalente, bivalente ou trivalente.

[00365] Em uma modalidade, o agente de RNAi é um multímero contendo pelo menos dois duplex representados pela fórmula(III), (IIIa), (IIIb), (IIIc), (IIIId) e (IIIe), onde os duplex são conectados por um ligante. O ligante pode ser clivável ou não clivável. Opcionalmente, o multímero compreende ainda um ligante. Cada uma dos duplex pode

direcionar o mesmo gene ou dois genes diferentes; ou cada um dos duplex pode alvejar o mesmo gene em dois sítios diferentes de destino.

[00366] Em uma modalidade, o agente de RNAi é um multímero contendo três, quatro, cinco, seis ou mais duplexes representados pela fórmula(III), (IIIa), (IIIb), (IIIc), (IIId) e (IIIe), onde os duplex são conectados por um ligante. O ligante pode ser clivável ou não clivável. Opcionalmente, o multímero compreende ainda um ligante. Cada uma dos duplex pode direcionar o mesmo gene ou dois genes diferentes; ou cada um dos duplex pode alvejar o mesmo gene em dois sítios diferentes de destino.

[00367] Em uma modalidade, dois agentes de RNAi representados pela fórmula (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc), (IIId) e (IIIe) são ligados uns aos outros na extremidade 5', e uma ou ambas as extremidades 3' e são opcionalmente conjugados a um ligante. Cada uma dos agentes pode direcionar o mesmo gene ou dois genes diferentes; ou cada um dos agentes pode alvejar o mesmo gene em dois sítios diferentes de destino.

[00368] Várias publicações descrevem agentes de RNAi multiméricos que podem ser usados nos métodos da invenção. Essas publicações incluem WO2007/091269, patente US nº 7858769, WO2010/141511, WO2007/117686, WO2009/014887 e WO2011/031520, cada uma das quais está aqui incorporada, a título de referência.

[00369] O agente de RNAi que contém conjugações de um ou mais agrupamento de carboidrato a um agente de RNAi pode otimizar uma ou mais propriedades do agente de RNAi. Em muitos casos, o agrupamento de carboidratos será fixado a uma subunidade modificada do agente de RNAi. Por exemplo, o açúcar ribose de uma ou mais subunidades de ribonucleotídeo de um agente de dsRNA

pode ser substituído por outro agrupamento, por exemplo, um carreador não carboidrato (de preferência cíclico) ao qual está fixado um ligante carboidrato. Uma subunidade de ribonucleotídeo em que o açúcar ribose da subunidade foi assim substituído é referido aqui como uma subunidade de modificação de substituição de ribose (RRMS). Um carreador ciclo pode ser um sistema de anel carbocíclico, ou seja, todos os átomos do anel são átomos de carbono, ou um sistema de anel heterocíclico, ou seja, um ou mais átomos do anel pode ser um heteroátomo como, por exemplo, nitrogênio, oxigênio, enxofre. O carreador cíclico pode ser um sistema de anel monocíclico, ou pode conter dois ou mais anéis, por exemplo, anéis fundidos. O carreador cíclico pode ser um sistema de anel totalmente saturado, ou pode conter uma ou mais ligações duplas.

[00370] O ligante pode ser fixado ao polinucleotídeo através de um carreador. Os carreadores incluem (i) pelo menos um "ponto de fixação da cadeia principal", preferencialmente "dois pontos de fixação da cadeia principal" e (ii) pelo menos "um ponto de fixação de amarração". Um "ponto de fixação da cadeia principal", como usado aqui, refere-se a um grupo funcional, por exemplo, um grupo hidroxila, ou de um modo geral, uma ligação disponível para, e que é adequada para a incorporação do carreador para a cadeia principal, como, por exemplo, fosfato ou fosfato modificado, como, por exemplo, contendo enxofre, cadeia principal de um ácido ribonucléico. Um "ponto de fixação de amarração" (TAP) em algumas modalidades refere-se a um átomo de anel constituinte do carreador cíclico, como, por exemplo, um átomo de carbono ou um heteroátomo (distinto de um átomo que fornece um ponto de fixação de cadeia principal), que conecta um agrupamento selecionado. O agrupamento pode ser, por exemplo, um carboidrato, por exemplo, monossacarídeo, dissacarídeo, trissacarídeo, tetrassacarídeo, oligossacarídeos e polissacarídeos.

Opcionalmente, o agrupamento selecionado está conectado através de uma amarração ao carreador cíclico. Assim, o carreador cíclico frequentemente inclui um grupo funcional, por exemplo, um grupo amino, ou de um modo geral, fornece uma ligação, que é adequada para incorporação ou amarração de outra entidade química, por exemplo, um ligante para o anel constituinte.

[00371] Os agentes de RNAi podem ser conjugados a um ligante através de um carreador, onde o carreador pode ser um grupo cíclico ou grupo acíclico; de preferência, o grupo cíclico é selecionado a partir de pirrolidinila, pirazolinila, pirazolidinila, imidazolinila, imidazolidinila, piperidinila, piperazinila, [1,3]dioxolano, oxazolidinila, isoxazolidinila, morfolinila, tiazolidinila, isotiazolidinila, quinoxalinila, piridazinonila, tetrahidrofurila e decalina, de preferência, o grupo acíclico é selecionado a partir da cadeia principal de serinol ou cadeia principal de dietanolamina.

[00372] Em algumas modalidades específicas, o agente de RNAi para uso nos métodos da invenção é AT3SC-001 (AD-57213 -Fita senso: 5'- GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf – 3' (SEQ ID NO:13) e Fita antissenso: 5'- usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg – 3' (SEQ ID NO:14), em que a, c, g e u são 2'-O-metila (2'-OMe) A, C, G, ou U; Af, Cf, Gf ou Uf são 2'-fluoro A, C, G ou U; e s é um acoplamento fosforotioato.

[00373] Esses agentes podem incluir ainda um ligante.

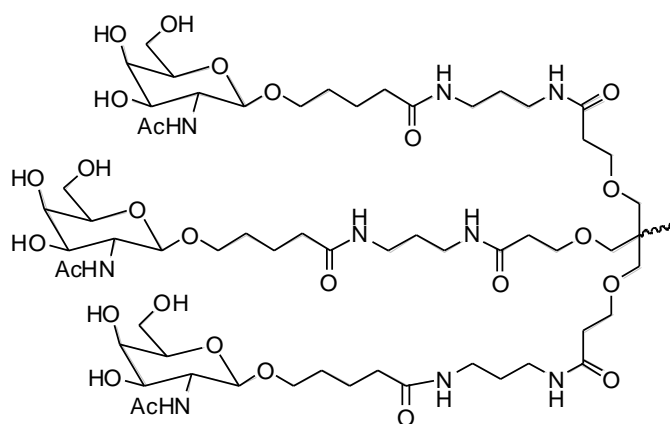
#### *Ligantes*

[00374] Os agentes de RNA de fita dupla (dsRNA) da invenção podem ser opcionalmente conjugados a um ou mais ligantes. O ligante pode ser fixado à fita senso, fita antissenso ou ambas as fitas, na extremidade 3', extremidade 5' ou ambas as extremidades. Por exemplo, o ligante pode ser conjugado com a fita senso. Em modalidades preferidas, o ligante é conjugado para a extremidade 3'

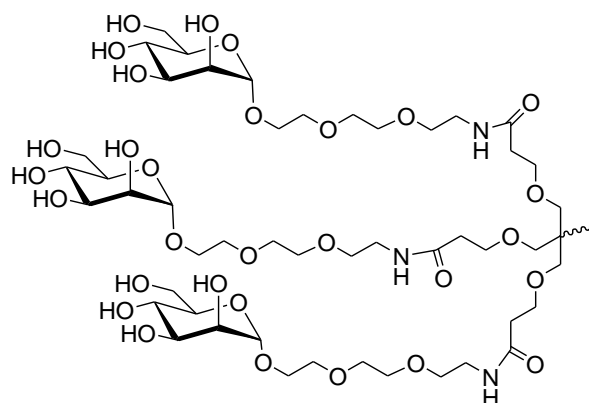
da fita senso.

[00375] Em uma modalidade, o ligante é um carboidrato conjugado, como um monossacarídeo. Em uma modalidade, o ligante é uma N-acetilgalactosamina (GalNAc) ou derivado de GalNAc. Em certas modalidades da invenção, a GalNAc ou derivado de GalNAc é ligado a um agente de iRNA da invenção através de um ligante monovalente. Em algumas modalidades, a GalNAc ou o derivado de GalNAc é ligado a um agente de iRNA da invenção através de um ligante bivalente. Ainda em outras modalidades da invenção, a GalNAc ou derivado de GalNAc é ligado a um agente de iRNA da invenção através de um ligante trivalente.

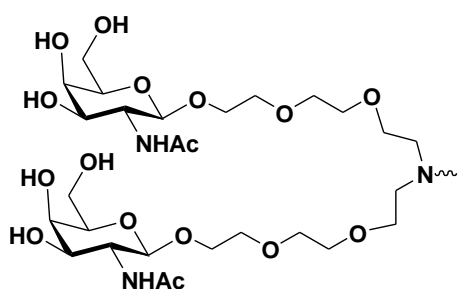
[00376] Em uma modalidade, um carboidrato conjugado para uso em composições e métodos da invenção é selecionado do grupo consistindo em:



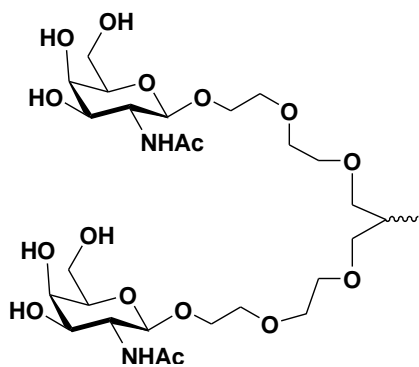
Fórmula II,



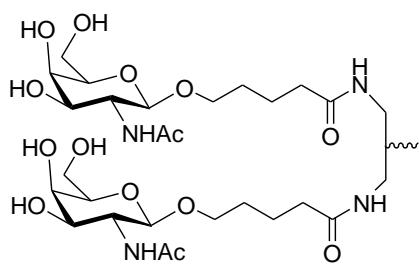
Fórmula III,



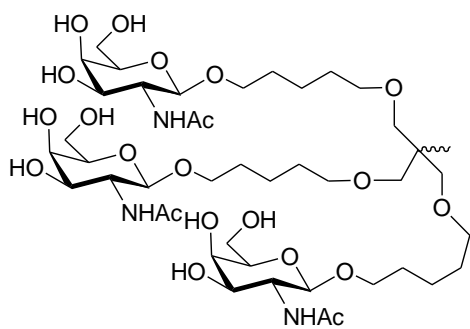
Fórmula IV,



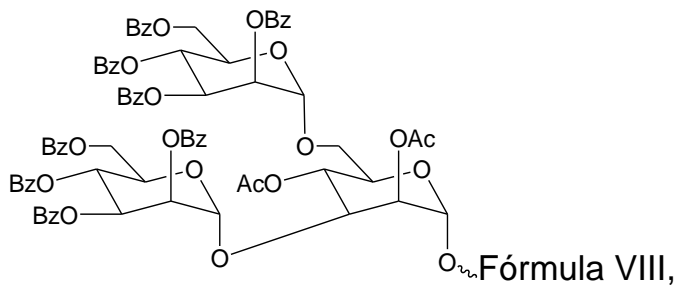
Fórmula V,



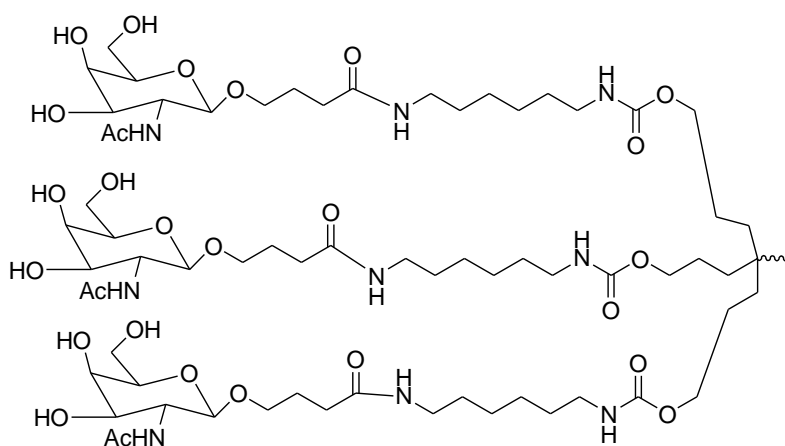
Fórmula VI,



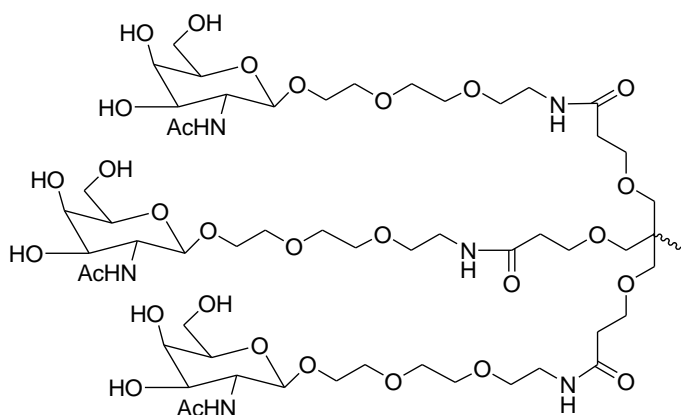
Fórmula VII,



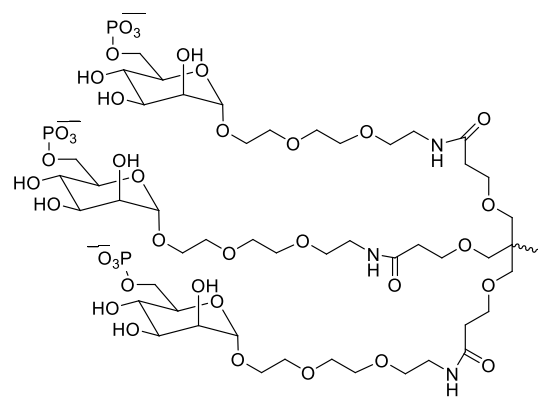
Fórmula VIII,



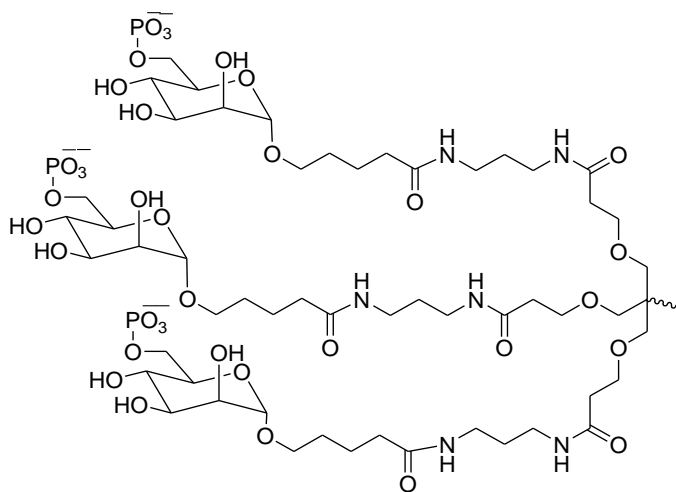
Fórmula IX,



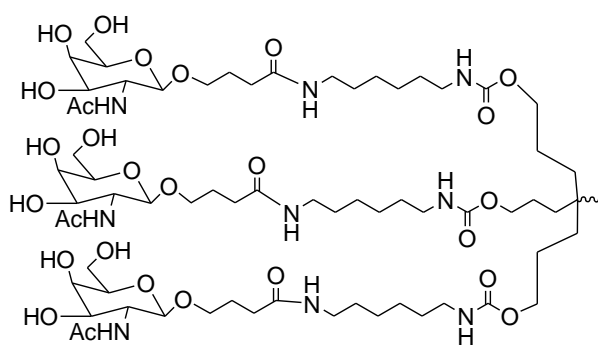
Fórmula X,



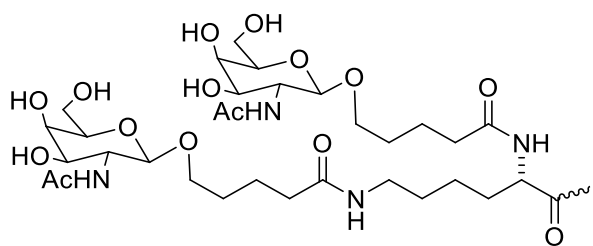
Fórmula XI,



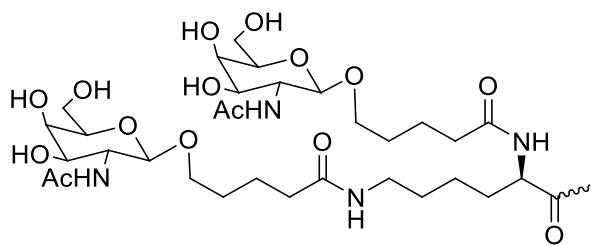
Fórmula XII,



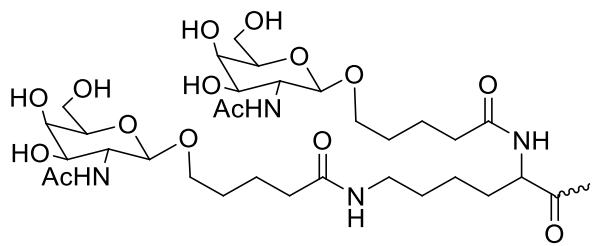
Fórmula XIII,



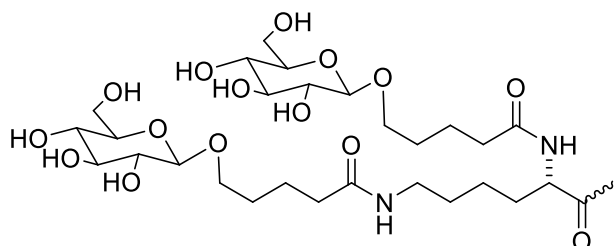
Fórmula XIV,



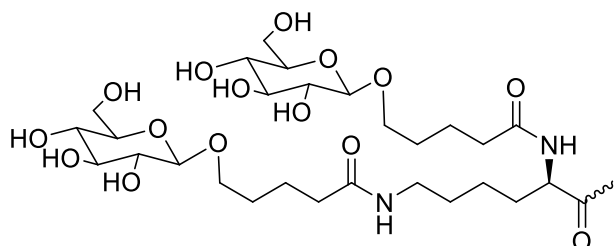
Fórmula XV,



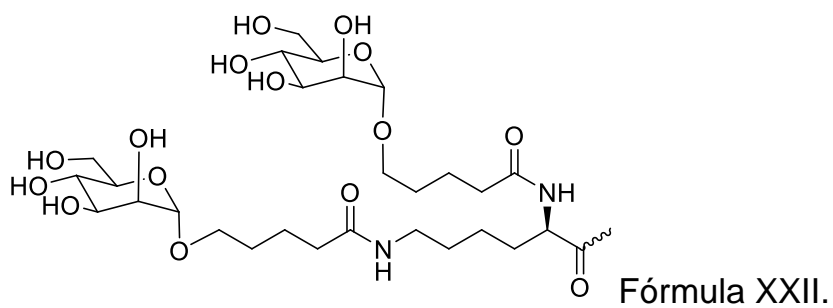
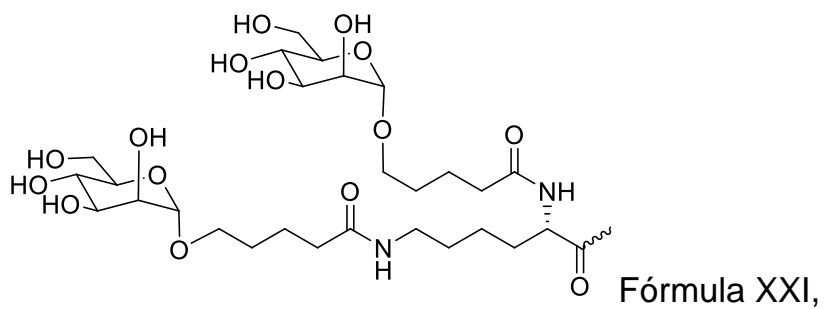
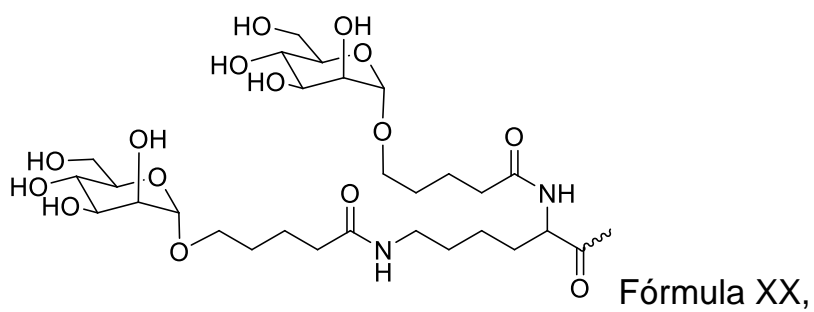
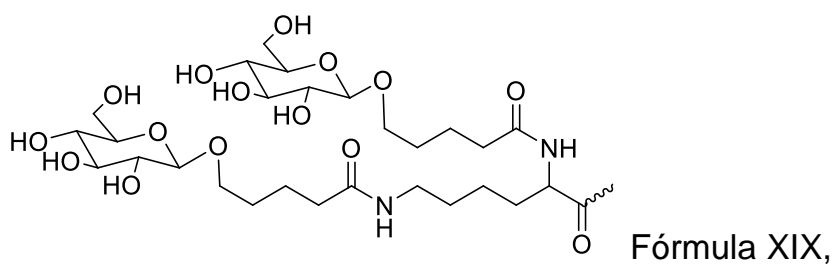
Fórmula XVI,



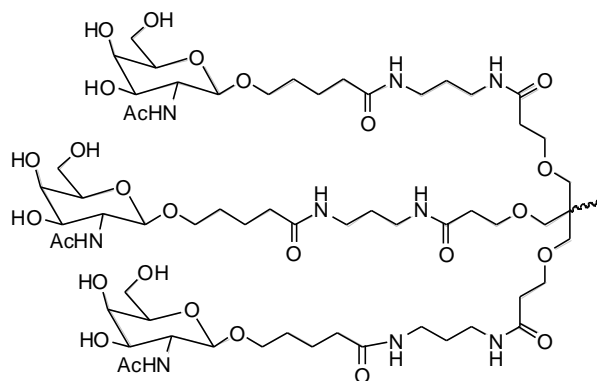
Fórmula XVII,



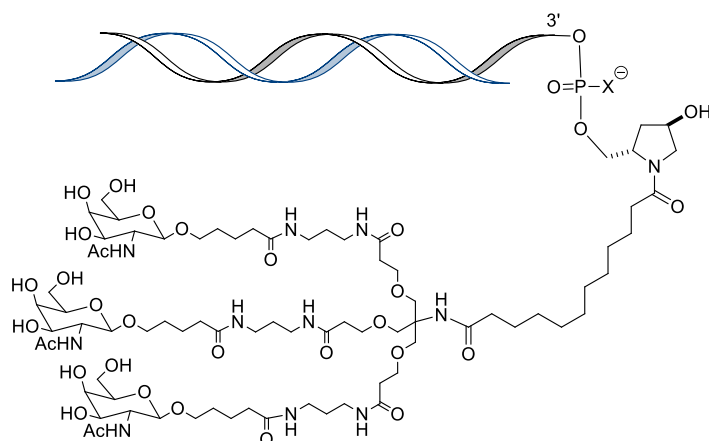
Fórmula XVIII,



[00377] Em uma modalidade, a GalNAc ou um derivado de GalNAc é GalNAc3:



[00378] Em algumas modalidades, o ligante, por exemplo, ligante GalNAc, é anexado à extremidade 3' do agente de RNAi. Em uma modalidade, o agente de RNAi é conjugado com o ligante, por exemplo, ligante GalNAc, como mostra o seguinte esquema



[00379] em que X é O ou S. Em uma modalidade, o X é O.

[00380] Uma grande variedade de entidades pode ser acoplada aos agentes de RNAi da presente invenção. Agrupamentos preferidos são ligantes, que são acoplados, de preferência covalentemente, quer diretamente, quer indiretamente, através de uma amarração de intervenção.

[00381] Em modalidades preferidas, um ligante altera a distribuição, o direcionamento ou ciclo de vida da molécula em que se incorpora. Em modalidades preferidas, um ligante fornece uma maior afinidade por um alvo selecionado, por exemplo, molécula, célula ou tipo de célula, compartimento, receptor, por exemplo, um compartimento celular ou de órgãos, tecido, órgão ou região do corpo, como, por exemplo, comparado com uma espécie ausente como um ligante. Ligantes proporcionando uma melhor afinidade por um alvo selecionado também são chamados de ligantes de alvo.

[00382] Alguns ligantes podem ter propriedades endossomolíticas. Os ligantes endossomolíticos promovem a lise do endossomo e/ou transporte da composição da invenção, ou de seus componentes, do endossomo para o citoplasma da célula. O ligante endossomolítico

pode ser um peptídeo polianiônico ou peptídeo mimético que mostra atividade da membrana dependente de pH e fusogenicidade. Em uma modalidade, o ligante endossomolytíco assume a sua conformação ativa no pH endossomal. A conformação “ativa” é a conformação em que os ligantes endossomolíticos promovem a lise do endossomo e/ou transporte da composição da invenção, ou de seus componentes, do endossomo para o citoplasma da célula. Ligantes endossomolíticos exemplares incluem o peptídeo GALA (Subbarao et al., *Biochemistry*, 1987, 26: 2964-2972), o peptídeo EALA (Vogel et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, 118: 1581-1586), e seus derivados (Turk et al., *Biochem. Biophys. Acta*, 2002, 1559: 56-68). Em uma modalidade, o componente endossomolítico pode conter um grupo químico (por exemplo, um amino-ácido), que irá sofrer uma mudança na carga ou protonação em resposta a uma mudança no pH. O componente endossomolítico pode ser linear ou ramificado.

[00383] Os ligantes podem melhorar o transporte, a hibridação, e propriedades de especificidade e podem também melhorar a resistência de nuclease do oligoribonucleotídeo resultante natural ou modificado, ou uma molécula polimérica compreendendo qualquer combinação de monômeros descritos aqui e/ou ribonucleotídeos naturais ou modificados.

[00384] Ligantes em geral podem incluir modificadores terapêuticos, por exemplo, para melhorar a absorção; compostos de diagnóstico ou grupos repórter, por exemplo, para distribuição de monitoramento; agentes de ligação cruzada; e agrupamentos conferindo resistência a nuclease. Exemplos gerais incluem lipídeos, esteroides, vitaminas, açúcares, proteínas, peptídeos, poliaminas e imitações de peptídeo.

[00385] Os ligantes podem incluir uma substância que ocorre naturalmente, como uma proteína (por exemplo, albumina sérica humana (HSA), lipoproteína de baixa densidade (LDL), lipoproteína de

alta densidade (HDL), ou globulina); um carboidrato (por exemplo, um dextrano, pululano, quitina, quitosana, inulina, ciclodextrina ou ácido hialurônico); ou um lipídeo. O ligante pode ser também uma molécula recombinante ou sintética, como, por exemplo, um polímero sintético, por exemplo, um ácido poliamino sintético, um oligonucleotídeo (por exemplo, um aptâmero). Exemplos de ácidos poliamino que incluem ácido poliamino é uma polilisina (PLL), ácido poli L aspártico, ácido L glutâmico, copolímero de anidrido de ácido estireno-maleico, copolímero poli (L-lactídeo-co-glicolizado), copolímero de anidrido maleico éter divinílico, copolímero N-(2-hidroxiopropil)metacrilamida (HMPA), polietileno glicol (PEG), álcool polivinílico (PVA), poliuretano, poli(ácido 2-etilacrílico), polímeros de N-isopropilacrilamida, ou polifosfazina. Exemplo de poliaminas incluem: polietilenimina, polilisina (PLL), espermina, espermidina, poliamina, pseudopeptídeo-poliamina, poliamina peptidomimético, dendrímero de poliamina, arginina, amidina, protamina, lipídios catiônicos, porfirinas catiônicas, sal quaternário de uma poliamina, ou um peptídeo alfa helicoidal.

[00386] Ligantes também pode incluir grupos alvo, p. ex., um agente alvo de célula ou tecido, por exemplo, uma lectina, glicoproteína, lipídios ou proteínas, por exemplo, um anticorpo, que se liga a um determinado tipo de célula, como uma célula renal. Um grupo alvo pode ser uma tirotrófina, melanotropin, LECTINA, glicoproteína, a proteína A do surfactante, carboidrato mucina, vacina polivalente polivalente de lactose, galactose, N-acetil-galactosamina, manose multivalente N-acetil-gulucosamina, fucose multivalente, poliaminoácidos glicosilados, galactose multivalente, transferrina, bisfosfonato, poliglutamato, poliaspartato, um lipídeo, colesterol, um esteróide, ácidos biliares, folato, vitamina B12, biotina, um peptídeo RGD, um peptídeo RGD mimético ou um aptâmero.

[00387] Outros exemplos de ligantes incluem corantes, agentes de

intercalamento (por exemplo, acridinas), reticuladores (por exemplo, psoraleno, mitomicina C), porfirinas (TPPC4, texafirina, Sapirina), hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (por exemplo, fenazina, dihidrofenazina), ou endonucleases artificiais ou um quelante (por exemplo, EDTA), moléculas lipofílicas, por exemplo, colesterol, ácido cólico, ácido acético adamantano, ácido butírico 1-pireno, dihidrotestosterona, 1,3-Bis-O(hexadecil)glicerol, grupo geraniloxihexila, hexadecilglicerol, borneol, mentol, 1,3-propanodiol, grupo heptadecila, ácido palmítico, ácido mirístico, ácido O3-(oleoil)litocólico, ácido O3-(oleoil)colênico, dimetoxitritila, ou fenoxazina) e conjugados de peptídeo (por exemplo, peptídeo antenapedia, peptídeo Tat), agentes alquilantes, fosfato, amino, mercapto, PEG (por exemplo, PEG-40K), MPEG, MPEG [2], poliamino, alquila, alquila substituída, marcadores radiomarcados, enzimas, haptenos (por exemplo, biotina), facilitadores de transporte/ absorção (por exemplo, aspirina, vitamina E, ácido fólico), ribonucleases sintéticas (por exemplo, imidazol, bisimidazol, histamina, clusters de imidazol, conjugados de acridina-imidazol, complexos Eu<sup>3+</sup> de tetraazamacrociclos), dinitrofenila, HRP ou AP.

[00388] Ligantes podem ser proteínas, por exemplo, glicoproteínas ou peptídeos, por exemplo, moléculas com uma afinidade específica por um co-ligante, ou anticorpos, por exemplo, um anticorpo que se liga a um determinado tipo de célula, como uma célula cancerosa, célula endotelial ou célula óssea. Ligantes podem incluir também hormônios e receptores hormonais. Eles também podem incluir espécies não peptídias, como lipídeos, lectinas, carboidratos, vitaminas, cofatores, lactose multivalente, galactose multivalente, N-acetil-galactosamina, manose multivalente N-acetil-gulucosamina, fucose multivalente ou aptâmeros. O ligante pode ser, por exemplo, um lipopolissacarídeo, um ativador da p38 MAP quinase, ou um ativador de NF-κB.

[00389] O ligante pode ser uma substância, por exemplo, um fármaco, que pode aumentar a absorção do agente iRNA para a célula, por exemplo, interrompendo o citoesqueleto da célula, por exemplo, interrompendo os microtúbulos da célula, microfilamentos e/ou filamentos intermediários. O fármaco pode ser, por exemplo, taxon, vincristina, vimblastina, citocalasina, nocodazol, japlakinolide, latrunculina A, faloidina swinholide A, indanocina ou mioservina.

[00390] O ligante pode aumentar a absorção do oligonucleotídeo para dentro da célula, por exemplo, ativando uma resposta inflamatória. Ligantes exemplares que teria tal efeito incluem fator de necrose tumoral alfa (TNFalfa), interleucina-1 beta ou gama-interferon.

[00391] Em um aspecto, o ligante é um lipídeo ou molécula a base de lipídios. Tal lipídeo ou molécula a base de lipídios de preferência liga uma proteína sérica, por exemplo, albumina sérica humana (HSA). Um ligante de ligação HSA permite a distribuição do conjugado a um tecido alvo, por exemplo, um tecido alvo não rim do corpo. Por exemplo, o tecido-alvo pode ser o fígado, incluindo as células do parênquima do fígado. Outras moléculas que podem se ligar a HSA podem também ser usadas como ligantes. Por exemplo, naproxeno ou aspirina podem ser usados. Um lipídio ou um ligante a base de lipídio pode (a) aumentar a resistência à degradação do conjugado, (b) aumentar o direcionamento ou o transporte para uma célula-alvo ou membrana celular, e/ou (c) pode ser usado para ajustar a ligação a uma proteína sérica, por exemplo, HSA.

[00392] Um ligante a base de lipídeo pode ser usado para modular, por exemplo, controlar a ligação do conjugado a um tecido alvo. Por exemplo, um lipídeo ou ligante a base de lipídeo que se liga a HSA mais fortemente será menos provável de ser direcionado para o rim e, portanto, menos provável de ser eliminado do corpo. Um lipídeo ou um ligante a base de lipídeo que se liga ao HSA menos fortemente pode

ser usado para direcionar o conjugado para o rim.

[00393] Em uma modalidade preferida, o ligante a base de lipídeo se liga ao HSA. Preferencialmente, ele se liga ao HSA com uma afinidade suficiente tal que o conjugado será preferencialmente distribuído a um tecido não renal. No entanto, é preferível que a afinidade não seja tão forte que a ligação HSA-ligante não possa ser revertida.

[00394] Em outra modalidade preferida, o ligante a base de lipídeo se liga fracamente ao HSA ou nem se liga, de tal forma que o conjugado será distribuído preferencialmente para o rim. Outros grupamentos que direcionam para células renais também podem ser usados no lugar de em adição do ligante a base de lipídeo.

[00395] Em outro aspecto, o ligante é um agrupamento, por exemplo, uma vitamina, que é tomada por uma célula-alvo, por exemplo, uma células de proliferação. Estes são particularmente úteis para tratar distúrbios caracterizados por proliferação de células indesejáveis, como, por exemplo, do tipo maligno ou não maligno, por exemplo, células cancerosas. Vitaminas exemplares incluem vitamina A, E e K. Outras vitaminas exemplares incluem vitaminas do complexo B, por exemplo, ácido fólico, B12, riboflavina, biotina, piridoxal ou outras vitaminas ou nutrientes absorvidas por células cancerosas. Também estão incluídas HAS, lipoproteína de baixa densidade (LDL) e lipoproteína de alta densidade (HDL).

[00396] Em outro aspecto, o ligante é um agente de permeação celular, de preferência um agente de permeação celular helicoidal. De preferência, o agente é anfipático. Um agente exemplar é um peptídeo como tat ou antennapedia. Se o agente for um peptídeo, ele pode ser modificado, incluindo um peptidomimético, invertômeros ou ligações pseudo-peptídicas ou não peptídicas e uso de D-aminoácidos. O agente helicoidal é preferencialmente um agente alfa-hélice, que de

preferência tem uma fase lipofílica e uma lipofóbica.

[00397] O ligante pode ser um peptídeo ou peptídeo mimético. Uma peptídeo mimético (também referido aqui como um oligopeptídeo mimético) é uma molécula capaz de dobrar em uma estrutura tridimensional similar a um peptídeo natural. O peptídeo ou agrupamento peptídeo mimético pode ter aproximadamente 5-50 aminoácidos de comprimento, como, por exemplo, cerca de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, ou 50 aminoácidos. Um peptídeo ou peptídeo mimético pode ser, por exemplo, um peptídeo de permeação celular, peptídeo catiônico, peptídeo anfipático, ou peptídeo hidrofóbico (por exemplo, consistindo principalmente de Tyr, Trp ou Phe). O agrupamento de peptídeo pode ser um peptídeo dendrímero, um peptídeo contido ou peptídeo reticulado. Em outra alternativa, o agrupamento de peptídeo pode incluir uma sequência de translocação de membrana hidrofóbica (MTS). Um peptídeo exemplar contendo MTS hidrofóbico é RFGF tendo a sequência de aminoácidos AAVALLPAVLLALLAP (SEQ ID NO: 9). Um análogo RFGF (por exemplo, sequência de aminoácidos AALLPVLLAAP (SEQ ID NO: 10)) contendo um MTS hidrofóbico pode também ser um agrupamento alvo. O agrupamento de peptídeo pode ser um peptídeo de "entrega", o que pode transportar grandes moléculas polares, incluindo peptídeos, oligonucleotídeos e proteínas através das membranas celulares. Por exemplo, sequências da proteína Tat do VIH (GRKKRRQRRRPPQ (SEQ ID NO: 11)) e a proteína da Drosophila Antennapedia (RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO: 12)) foram encontrados como sendo capaz de funcionar como peptídeos de entrega. Um peptídeo ou peptídeo mimético podem ser codificados por uma sequência aleatória de DNA, como um peptídeo identificado a partir de uma biblioteca de exibição de fagos, ou uma biblioteca combinatória de uma esfera-um-composto (OBOC) (Lam et al., Nature,

354:82-84, 1991). De preferência, o peptídeo ou peptídeo mimético amarrado a um agente de iRNA através de uma unidade monomérica incorporada é um peptídeo direcionando a célula como um peptídeo arginina-glicina-ácido aspártico (RGD), ou imitação de RGD. Um agrupamento de peptídeo pode variar em comprimento de cerca de 5 aminoácidos a cerca de 40 aminoácidos. Os agrupamentos de peptídeo podem ter uma modificação estrutural, como, por exemplo, para aumentar a estabilidade ou propriedades conformacionais diretas. Qualquer uma das modificações estruturais descritas abaixo podem ser usadas. Um agrupamento de peptídeo RGD pode ser usado para direcionar uma célula tumoral, como uma célula tumoral endotelial ou uma célula tumoral do câncer de mama (Zitzmann et al., *Cancer Res.*, 62:5139-43, 2002). Um peptídeo RGD pode facilitar o direcionamento de um agente iRNA a tumores de uma variedade de outros tecidos, incluindo o pulmão, rim, baço ou fígado (Aoki et al., *Cancer Gene Therapy* 8:783-787, 2001). De preferência, o peptídeo RGD irá facilitar o direcionamento de um agente de iRNA para o rim. O peptídeo RGD pode ser linear ou cíclico, e pode ser modificado, como, por exemplo, glicosilado ou metilado para facilitar o direcionamento de tecidos específicos. Por exemplo, um peptídeo RGD glicosilado pode entregar um agente de iRNA a uma célula tumoral expressando  $\alpha V\beta 3$  (Haubner et al., *Jour. Nucl. Med.*, 42:326-336, 2001). Peptídeos que direcionam marcadores enriquecidos em células proliferativas podem ser usados. Por exemplo, RGD contendo peptídeos e peptídeos miméticos pode alvejar as células do câncer, em particular as células que apresentam uma integrina. Assim, pode-se usar peptídeos RGD, peptídeos cíclicos contendo RGD, peptídeos RGD que incluem D-aminoácidos, bem como imitadores de RGD sintético. Além do RGD, pode-se usar outros agrupamentos que alvejam o ligante integrina. Geralmente, tais ligantes podem ser usados para controlar as células proliferativas e

angiogênese. Conjugados preferenciais deste tipo de ligante direcionam PECAM-1, VEGF, ou outro gene do câncer, como, por exemplo, um gene de câncer descrito aqui.

[00398] Um "peptídeo de permeação celular" é capaz de permear uma célula, por exemplo, uma célula microbiana, como uma célula bacteriana ou fúngica, ou uma célula de mamíferos, como uma célula humana. Um peptídeo de permeação celular microbiana pode ser, por exemplo, um peptídeo linear  $\alpha$ -hélice (por exemplo, LL-37 ou Ceropin P1), um peptídeo contendo ligação bissulfeto (por exemplo,  $\alpha$ -defensina,  $\beta$ -defensina ou bactenecina) ou um peptídeo contendo apenas um ou dois aminoácidos dominantes (por exemplo, PR-39 ou indolicidina). Um peptídeo de permeação celular também pode incluir um sinal de localização nuclear (NLS). Por exemplo, um peptídeo de permeação celular pode ser um peptídeo anfipático bipartido, como MPG, que é derivado do domínio de peptídeo de fusão do HIV-1 gp41 e o NLS do antígeno grande T SV40 (Simeoni et al., Nucl. Acids Res. 31:2717-2724, 2003).

[00399] Em uma modalidade, um peptídeo de direcionamento pode ser um peptídeo ampifático  $\alpha$ -hélice. Peptídeos  $\alpha$ -helicoidal anfipáticos exemplares incluem, mas não estão limitados a, cecropinas, licotoxinas, paradaxinas, buforina, CPF, peptídeo tipo bombinina (BLP), catelicidinas, ceratotoxinas, peptídeos *S. clava*, peptídeos antimicrobianos intestinais de mixina (HFIAPs), magaininas, brevininas-2, dermaseptinas, melitinas, pleurocidina, peptídeos H2A, peptídeos *Xenopus*, esculentinis-1 e caerinas. Uma série de fatores será, de preferência, considerada para manter a integridade da estabilidade da hélice. Por exemplo, um número máximo de resíduos de estabilização da hélice serão utilizados (por exemplo, leu, ala, ou lys), e um número mínimo de resíduos de desestabilização da hélice serão utilizados (por exemplo, prolina, ou unidades cíclica e

monoméricas). O resíduo capping será considerado (por exemplo Gly é um resíduo N-capping exemplificador e/ou amidação C-terminal pode ser usado para fornecer uma ligação H extra para estabilizar a hélice). A formação de pontes de sal entre resíduos com cargas opostas, separados por posições  $i \pm 3$ , ou  $i \pm 4$  pode proporcionar estabilidade. Por exemplo, resíduos catiônicos, como a lisina, arginina, homo-arginina, ornitina ou histidina pode formar pontes de sal com os resíduos aniônicos de glutamato ou aspartato.

[00400] Peptídeo e ligantes peptídeo miméticos incluem aqueles que têm peptídeos de ocorrência natural ou modificados, por exemplo, D ou L peptídeos; peptídeos  $\alpha$ ,  $\beta$  ou  $\gamma$ ; N-metil-peptídeos; azapeptídeos; peptídeos tendo uma ou mais amida, ou seja, peptídeo, acoplamentos substituídos por um ou mais ureia, tioureia, carbamatos, ou acoplamentos sulfonila ureia; ou peptídeos cíclicos.

[00401] O ligante alvo pode ser qualquer ligante que é capaz de direcionar um receptor específico. Exemplos são: folato, GalNAc, galactose, manose, manose-6P, clusters de açúcares como cluster GalNAc, cluster de manose, cluster de galactose ou um apatâmero. Um cluster é uma combinação de duas ou mais unidades de açúcar. O ligantes alvo também incluem ligantes do receptor de integrina, ligantes do receptor de quimiocina, transferrina, biotina, ligantes do receptor de serotonina, PSMA, endotelina, GCPII, somatostatina, ligantes LDL e HDL. Os ligantes também pode ser baseado em ácidos nucleicos, por exemplo, um aptâmero. O aptâmero pode não ser modificado ou qualquer combinação de modificações descritas aqui.

[00402] Agentes de liberação endossomal incluem imidazóis, poli ou oligoimidazóis, PEIs, peptídeos, peptídeos fusogênicos, natriuréticos, policaboxilatos, poliacations, cátions ou ânions oligo ou poli mascarados, acetais, poliacetais, cetais/policeiyais, ortoésteres, polímeros com cargas catiônicas ou aniônicas mascaradas ou

desmascaradas, dendrímeros com cargas aniônicas ou catiônicas mascaradas ou desmascaradas.

[00403] Modulador PK significa modulador de farmacocinética. Moduladores PK incluem lipófilos, ácidos biliares, esteroides, análogos de fosfolipídeos, peptídeos, agentes de ligação de proteínas, PEG, vitaminas etc. Moduladores PK exemplificadores incluem, mas não estão limitados a, colesterol, ácidos graxos, ácido cólico, ácido litocólico, dialquilglicerídeos, diacilglicerídeos, fosfolipídeos, esfingolipídeos, naproxeno, ibuprofeno, vitamina E, biotina, etc. Oligonucleotídeos que compreendem uma série de acoplamentos fosforotioato também são conhecidos para se ligar a proteínas séricas, assim oligonucleotídeos curtos, por exemplo, oligonucleotídeos de cerca de 5 bases, 10 bases, 15 bases ou 20 bases, compreendendo vários acoplamentos fosforotioato na cadeia principal também são propícios para a presente invenção como ligantes (por exemplo, como ligantes de modulação PK).

[00404] Além disso, aptâmeros que ligam os componentes séricos (por exemplo, proteínas séricas) são também propícios para a presente invenção como ligantes de modulação PK.

[00405] Outros conjugados ligantes propícios para a invenção são descritos nos pedidos de patente US USSN: 10/916.185, depositado em 10 de agosto de 2004; USSN: 10/946.873, depositado em 21 de setembro de 2004; USSN: 10/833.934, depositado em 3 de agosto de 2007; USSN: 11/115.989, depositado em 27 de abril de 2005; e USSN: 11/944.227 depositado em 21 de novembro de 2007, que são incorporados por referência em sua totalidade para todos os fins.

[00406] Quando dois ou mais ligantes estão presentes, os ligantes podem todos ter as mesmas propriedades, todos terem propriedades diferentes ou alguns ligantes têm as mesmas propriedades enquanto outros têm propriedades diferentes. Por exemplo, um ligante pode ter

propriedades de direcionamento, atividade endossomolítica ou propriedades de modulação PK. Em uma modalidade preferida, todos os ligantes têm propriedades diferentes.

[00407] Os ligantes podem ser acoplados aos oligonucleotídeos em vários lugares, por exemplo, extremidade 3', extremidade 5' e/ou a uma posição interna. Em modalidades preferidas, o ligante é fixado aos oligonucleotídeos através de uma amarração de intervenção, por exemplo, um carreador descrito aqui. O ligante ou ligante de amarração pode estar presente em um monômero quando o monômero é incorporado na fita crescente. Em algumas modalidades, o ligante pode ser incorporado através de acoplamento a um monômero "precursor" após o monômero "precursor" ter sido incorporado à fita crescente. Por exemplo, um monômero tendo, por exemplo, uma amarração amino-terminada (ou seja, não tendo ligante associado), por exemplo, TAP-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH<sub>2</sub> pode ser incorporado em uma fita de oligonucleotídeo de crescimento. Em uma operação subsequente, ou seja, após a incorporação do monômero precursor na fita, um ligante com um grupo eletrofílico, como, por exemplo, um éster pentafluorofenil ou grupo aldeído, pode ser posteriormente fixado ao monômero precursor pelo acoplamento do grupo eletrofílico do ligante com o grupo nucleofílico terminal da amarração do monômero precursor.

[00408] Em outro exemplo, um monômero tendo um grupo químico adequado para tomar parte na reação Click Chemistry pode ser incorporado, por exemplo, uma amarração/ligante terminado em azida ou alcino. Em uma operação subsequente, ou seja, após a incorporação do monômero precursor na fita, um ligante tendo grupo químico complementar, como, por exemplo, um alcino ou uma azida pode ser fixado ao monômero precursor por acoplamento do alcino e da azida juntos.

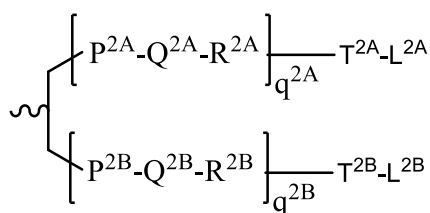
[00409] Para oligonucleotídeos de fita dupla, os ligantes podem ser fixados a um ou ambas as fitas. Em algumas modalidades, um agente de iRNA de fita dupla contém um ligante conjugado à fita senso. Em outras modalidades, um agente de iRNA de fita dupla contém um ligante conjugado à fita antissenso.

[00410] Em algumas modalidades, o ligante pode ser conjugado a nucleobases, agrupamentos de açúcar ou acoplamentos internucleosídeos de moléculas de ácidos nucleicos. Conjugação para nucleobases de purina ou seus derivados pode ocorrer em qualquer posição, incluindo átomos endocíclicos e exocíclicos. Em algumas modalidades, as posições 2, 6, 7 ou 8 de uma nucleobase de purina estão fixadas a um agrupamento conjugado. Conjugação de nucleobases de pirimidina ou seus derivados, também pode ocorrer em qualquer posição. Em algumas modalidades, as posições 2, 5 e 6 de uma nucleobase de pirimidina podem ser substituídas com um agrupamento conjugado. A conjugação aos agrupamentos de açúcar de nucleosídeos pode ocorrer em qualquer átomo de carbono. Exemplo de átomos de carbono de um agrupamento de açúcar que pode ser fixado a um agrupamento conjugado incluindo átomos de carbono 2', 3' e 5'. A posição 1 também pode ser fixada a um agrupamento conjugado, como em um resíduo abásico. Acoplamentos internucleosídicos também podem conter ter agrupamentos conjugados. Para acoplamentos contendo fósforo (por exemplo, fosfodiéster fosforotioato, fosforodiotato, fosforoamidato, e similares), o agrupamento conjugado pode ser fixado diretamente ao átomo de fósforo ou a um átomo O, N ou S ligado ao átomo de fósforo. Para acoplamentos internucleosídicos contendo amina ou amida (por exemplo, PNA), o agrupamento conjugado pode ser fixado ao átomo de nitrogênio da amina ou amida ou a um átomo de carbono adjacente.

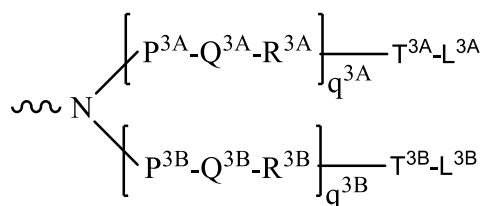
[00411] Qualquer ligante adequado no domínio do RNA de interferência pode ser usado, embora o ligante seja tipicamente um carboidrato, por exemplo, monossacarídeo (como uma GalNAc), dissacarídeo, trissacarídeo, tetrassacarídeo, polissacarídeo.

[00412] Ligantes que conjugam o ligante ao ácido nucléico incluem aqueles discutidos acima. Por exemplo, o ligante pode ser um ou mais derivados de GalNAc (N-acetilglucosamina) fixados através de um ligante monovalente, bivalente ou trivalente ramificado.

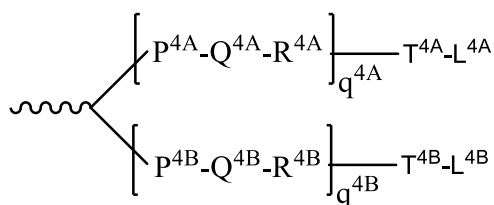
[00413] Em uma modalidade, o dsRNA da invenção é conjugado com um ligante ramificado bivalente e trivalente, inclui as estruturas mostradas em qualquer fórmula (IV) - (VII):



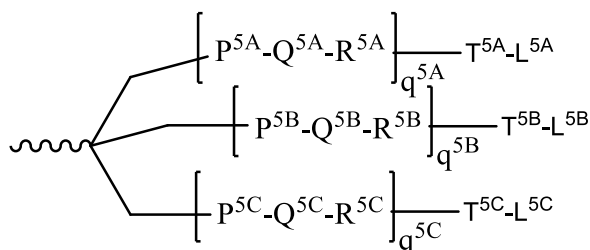
Formula (IV)



Formula (V)



Formula (VI)



Formula (VII)

OU

[00414] em que:

[00415]  $q^{2A}$ ,  $q^{2B}$ ,  $q^{3A}$ ,  $q^{3B}$ ,  $q^{4A}$ ,  $q^{4B}$ ,  $q^{5A}$ ,  $q^{5B}$  e  $q^{5C}$  representam de forma independente para cada ocorrência 0-20 e onde a unidade de

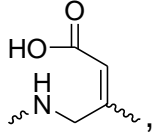
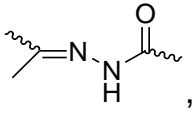
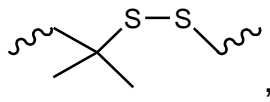
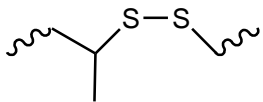
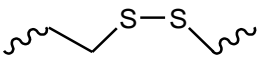
repetição pode ser igual ou diferente;

[00416]  $P^{2A}$ ,  $P^{2B}$ ,  $P^{3A}$ ,  $P^{3B}$ ,  $P^{4A}$ ,  $P^{4B}$ ,  $P^{5A}$ ,  $P^{5B}$ ,  $P^{5C}$ ,  $T^{2A}$ ,  $T^{2B}$ ,  $T^{3A}$ ,  $T^{3B}$ ,  $T^{4A}$ ,  $T^{4B}$ ,  $T^{4A}$ ,  $T^{5B}$ ,  $T^{5C}$  são cada um independentemente para cada ocorrência ausente, CO, NH, O, S, OC(O), NHC(O), CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>NH ou CH<sub>2</sub>O;

[00417]  $Q^{2A}$ ,  $Q^{2B}$ ,  $Q^{3A}$ ,  $Q^{3B}$ ,  $Q^{4A}$ ,  $Q^{4B}$ ,  $Q^{5A}$ ,  $Q^{5B}$ ,  $Q^{5C}$  são independentemente para cada ocorrência ausente, alquilenos, alquilenos substituído em que um ou mais metilenos pode ser interrompido ou terminado por um ou mais dos O, S, S(O), SO<sub>2</sub>, N(R<sup>N</sup>), C(R')=C(R''), C≡C ou C(O);

[00418]  $R^{2A}$ ,  $R^{2B}$ ,  $R^{3A}$ ,  $R^{3B}$ ,  $R^{4A}$ ,  $R^{4B}$ ,  $R^{5A}$ ,  $R^{5B}$ ,  $R^{5C}$  são cada um independentemente para cada ocorrência ausente,

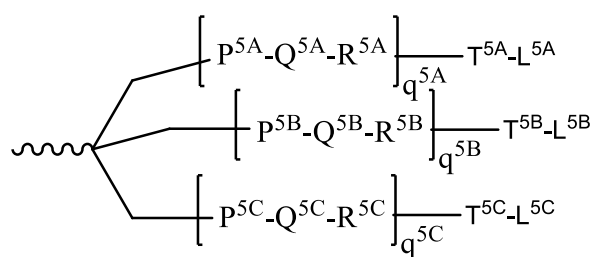
[00419] NH, O, S, CH<sub>2</sub>, C(O)O, C(O)NH, NHCH(R<sup>a</sup>)C(O), -C(O)-

CH(R<sup>a</sup>)-NH-, CO, CH=N-O, , , , ,  ou heterociclila;

[00420]  $L^{2A}$ ,  $L^{2B}$ ,  $L^{3A}$ ,  $L^{3B}$ ,  $L^{4A}$ ,  $L^{4B}$ ,  $L^{5A}$ ,  $L^{5B}$  e  $L^{5C}$  representam o ligante; isto é, cada um de forma independente para cada ocorrência de um monossacarídeo (como GalNAc), dissacarídeo, trissacarídeo, tetrassacarídeo, oligossacarídeo ou polissacarídeo; e

[00421] R<sup>a</sup> é H ou cadeia lateral de aminoácidos.

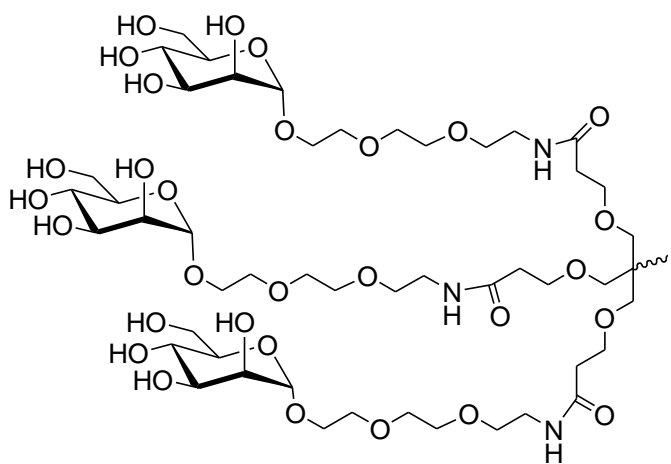
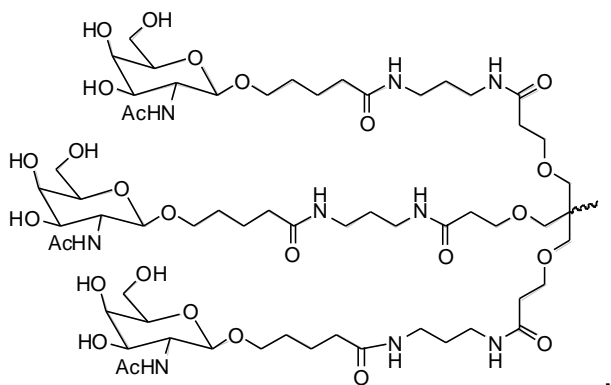
[00422] Derivados de GalNAc de conjugação trivalente são particularmente úteis para uso com agentes de RNAi para inibir a expressão de um gene-alvo, como as da fórmula (VII):

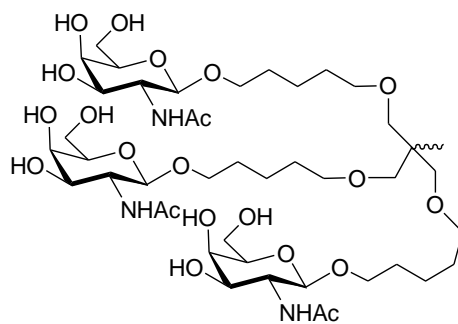
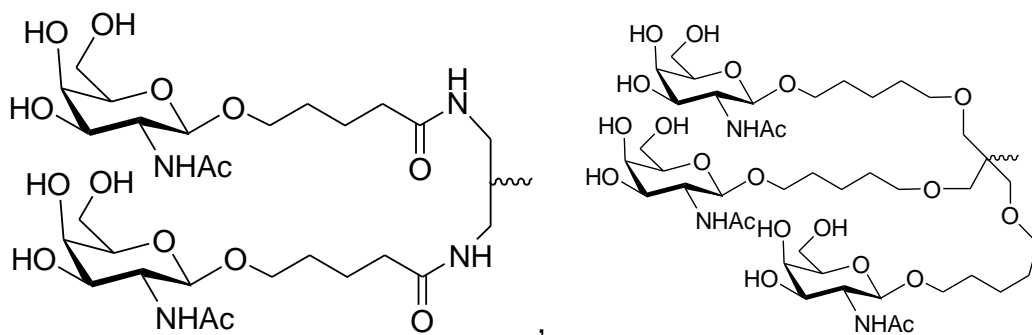
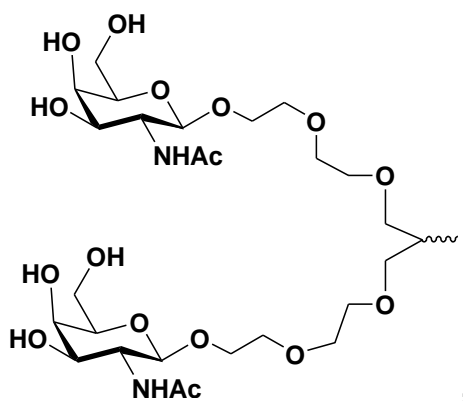
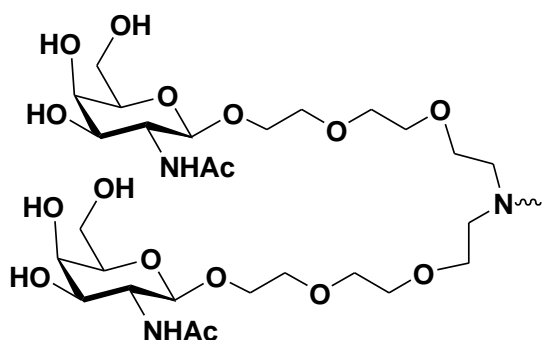
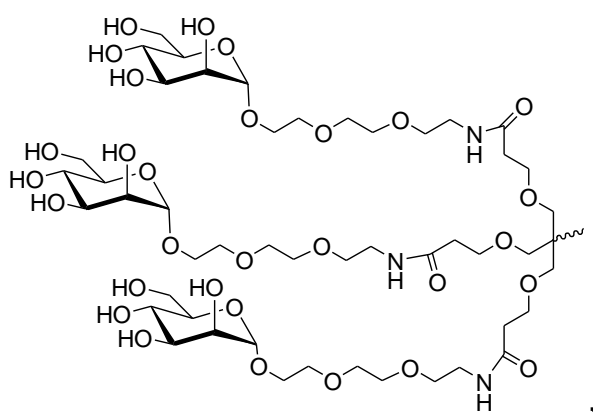


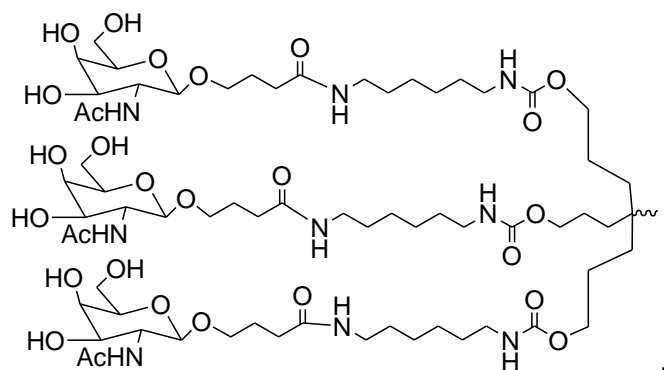
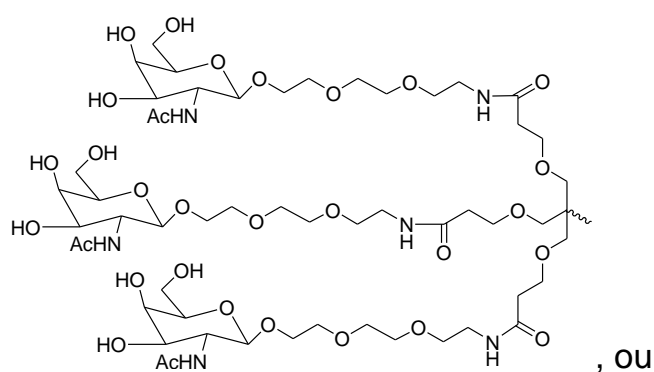
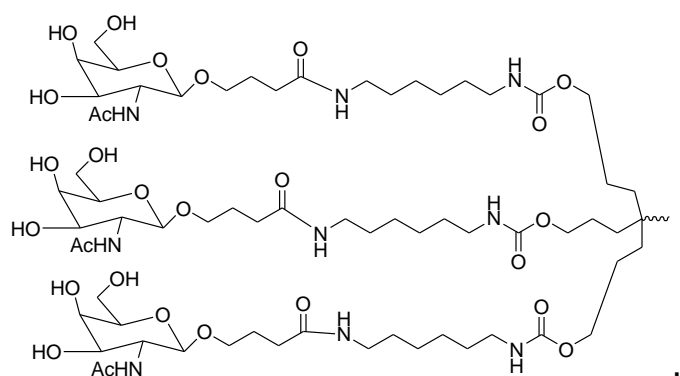
Formula (VII)

[00423] em que  $L^{5A}$ ,  $L^{5B}$  e  $L^{5C}$  representam um monossacarídeo, como derivado de GalNAc.

[00424] Exemplos de grupos ligantes ramificados bivalentes e trivalentes conjugando derivados de GalNAc incluem, mas não estão limitados a, os seguintes compostos:







[00425] Patentes US representativas que ensinam a preparação dos conjugados de RNA, incluem, mas não estão limitados a, patentes US n<sup>os</sup> 4.828.979; 4.948.882; 5.218.105; 5.525.465; 5.541.313; 5.545.730; 5.552.538; 5.578.717, 5.580.731; 5.591.584; 5.109.124; 5.118.802; 5.138.045; 5.414.077; 5.486.603; 5.512.439; 5.578.718; 5.608.046; 4.587.044; 4.605.735; 4.667.025; 4.762.779; 4.789.737; 4.824.941; 4.835.263; 4.876.335; 4.904.582; 4.958.013; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.245.022;

5.254.469; 5.258.506; 5.262.536; 5.272.250; 5.292.873; 5.317.098; 5.371.241, 5.391.723; 5.416.203, 5.451.463; 5.510.475; 5.512.667; 5.514.785; 5.565.552; 5.567.810; 5.574.142; 5585481; 5.587.371; 5.595.726; 5.597.696; 5.599.923; 5.599.928 e 5.688.941; 6.294.664; 6.320.017; 6.576.752; 6.783.931; 6.900.297; 7.037.646; 8.106.022, cada uma das quais está aqui incorporada, a título de referência.

[00426] Não é necessário para todas as posições em um determinado composto ser uniformemente modificado, e, na verdade, mais do que uma das referidas modificações podem ser incorporadas em um único composto ou mesmo em um único nucleosídeo dentro de um iRNA. A presente invenção inclui também compostos de iRNA que são compostos quiméricos.

[00427] Compostos de iRNA "quiméricos" ou "quimeras", no contexto da presente invenção, são compostos de iRNA, de preferência dsRNAs, que contêm duas ou mais regiões quimicamente distintas, cada uma composta de, pelo menos, uma unidade monomérica, isto é, um nucleotídeo no caso de composto dsRNA. Estes iRNAs normalmente contêm pelo menos uma região onde o RNA é modificado de forma a conferir ao iRNA maior resistência a degradação de nuclease, aumento da absorção celular, e/ou uma maior afinidade de ligação para o ácido nucleico alvo. Uma região adicional do iRNA pode servir como substrato para enzimas capazes de clivagem de RNA:DNA ou RNA:RNA híbridos. A título de exemplo, a RNase H é uma endonuclease celular que cliva a fita de RNA de um RNA:DNA duplex. A ativação de RNase H, portanto, resulta em clivagem do RNA alvo, potencializando, assim, muito a eficácia da inibição de iRNA da expressão do gene. Consequentemente, os resultados comparáveis muitas vezes pode ser obtido com iRNAs mais curtos quando dsRNAs quiméricos são usados, em comparação com dsRNAs desóxi fosforotioato hibridizando à mesma região alvo. A

clivagem do RNA alvo pode ser rotineiramente detectada por electroforese em gel e, se necessário, associadas às técnicas de hibridação de ácidos nucléicos conhecidas no campo.

[00428] Em certos casos, o RNA de um iRNA pode ser modificado por um grupo não ligante. Um número de moléculas não ligantes foram conjugadas a iRNAs para reforçar a atividade, distribuição celular ou absorção celular do iRNA, e os procedimentos para a realização de tais conjugações estão disponíveis na literatura científica. Tais agrupamentos não ligante incluíram agrupamentos de lipídios, como o colesterol (Kubo, T. et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 2007, 365(1):54-61; Letsinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86:6553), cácido cólico (Manoharan et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1994, 4:1053), um tioéter, por exemplo, hexil-S-tritiltiol (Manoharan et al., *Ann. N.Y. Acad. USA*, 1992, 660:306; Manoharan et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1993, 3:2765), um tiocolesterol (Oberhauser et al., *Nucl. Acids Res.*, 1992, 20:533), uma cadeia alifática, por exemplo, resíduos dodecandiol ou undecil (Saison-Behmoaras et al., *EMBO J.*, 1991, 10:111; Kabanov et al., *FEBS Lett.*, 1990, 259:327; Svinarchuk et al., *Biochimie*, 1993, 75:49), um fosfolípídeo, por exemplo, dihexadecil-rac-glicerol ou trietilammonio1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651; Shea et al., *Nucl. Acids Res.*, 1990, 18:3777), uma cadeia de poliamina ou um polietilenoglicol (Manoharan et al., *Nucleosides & Nucleotides*, 1995, 14:969), ou ácido acético adamantano (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651), uma porção palmitila (Mishra et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264:229), ou uma porção octadecilamina ou hexilamino-carbonil-oxicolesterol (Crooke et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, 277:923). Patentes dos Estados Unidos representativas que ensinam a preparação de tais conjugados de RNA foram listadas acima. Protocolos de conjugação típica envolvem a

síntese de um RNAs com um amino ligante em uma ou mais posições da sequência. O grupo amino é então reagido com a molécula sendo conjugada usando acoplamento adequado ou reagentes de ativação. A reação de conjugação pode ser realizada quer com o RNA ainda ligado ao suporte sólido, ou após a clivagem do RNA, em fase de solução. Purificação do conjugado de RNA por HPLC geralmente oferece o conjugado puro.

[00429] Em algumas modalidades, um agente de RNAi de fita dupla da invenção é AT3SC-001 (AD-57213).

#### **VI. Aplicação de um iRNA da invenção**

[00430] A aplicação de um iRNA da invenção para uma célula, por exemplo, uma célula dentro de um indivíduo, como um indivíduo humano (por exemplo, um indivíduo que precisa da mesma, como um indivíduo com um distúrbio hemorrágico) pode ser alcançada em um número de maneiras diferentes. Por exemplo, a aplicação pode ser feita colocando uma célula em contato com um iRNA da invenção quer in vitro quer in vivo. A aplicação in vivo pode ser feita diretamente pela administração de uma composição compreendendo um iRNA, como, por exemplo, um dsRNA, para um indivíduo. Alternativamente, a aplicação in vivo pode ser feita indiretamente pela administração de um ou mais vetores que codificam e direcionam a expressão do iRNA. Estas alternativas são discutidas mais adiante.

[00431] Em geral, qualquer método que libera uma molécula de ácido nucleico (in vitro ou in vivo) pode ser adaptado para uso com um iRNA da invenção (ver, por exemplo, Akhtar S. e Julian RL. (1992) Trends Cell. Biol. 2(5):139-144 e WO94/02595, os quais estão aqui incorporados a título de referência em sua totalidade). Para a aplicação in vivo, fatores a serem considerados, a fim de liberar uma molécula de iRNA, incluem, por exemplo, estabilidade biológica da molécula liberada, prevenção de efeitos não específicos e a

acumulação da molécula liberada no tecido-alvo. Os efeitos não específicos de um iRNA podem ser minimizados pela administração local, por exemplo, por injeção direta ou implante em um tecido ou topicamente administrando a preparação. Administração local a um local de tratamento maximiza a concentração local do agente, limita a exposição do agente para os tecidos sistêmicos que possam ser prejudicados pelo agente ou que podem degradar o agente, e permite uma menor dose total da molécula de iRNA para ser administrada. Vários estudos têm mostrado a inativação com sucesso de produtos gênicos quando um iRNA é administrado localmente. Por exemplo, a aplicação intra-ocular de um dsRNA VEGF por injeção intravitreal em macacos *Cynomolgus* (Tolentino, MJ., et al (2004) *Retina* 24:132-138) e injeções sub-retinianas em camundongos (Reich, SJ., et al (2003) *Mol. Vis.* 9:210-216) foram mostradas para prevenir a neovascularização em um modelo experimental de degeneração macular relacionada à idade. Além disso, a injeção intratumoral direta de um dsRNA em camundongos reduz o volume tumoral (Pille, J., et al (2005) *Mol. Ther.*11:267-274) e pode prolongar a sobrevivência de camundongos com tumor (Kim, WJ., et al (2006) *Mol. Ther.* 14:343-350; Li, S., et al (2007) *Mol. Ther.* 15:515-523). RNA de interferência também tem mostrado o sucesso com a aplicação local ao SNC por injeção direta (Dorn, G., et al. (2004) *Nucleic Acids* 32:e49; Tan, PH., et al (2005) *Gene Ther.* 12:59-66; Makimura, H., et al (2002) *BMC Neurosci.* 3:18; Shishkina, GT., et al (2004) *Neuroscience* 129:521-528; Thakker, ER., et al (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101:17270-17275; Akaneya, Y., et al (2005) *J. Neurophysiol.* 93:594-602) e para os pulmões pela administração intranasal (Howard, KA., et al (2006) *Mol. Ther.* 14:476-484; Zhang, X., et al (2004) *J. Biol. Chem.* 279:10677-10684; Bitko, V., et al (2005) *Nat. Med.* 11:50-55). Para a administração de um iRNA sistemicamente para o tratamento de uma

doença, o RNA pode ser modificado ou alternativamente aplicado através de um sistema de liberação de medicamentos; ambos os métodos agem para prevenir a rápida degradação do dsRNA de endo- e exo-nucleases in vivo. Modificação do RNA ou o carreador farmacêutico também pode permitir direcionar a composição de iRNA para o tecido alvo e evitar efeitos indesejáveis fora do alvo. As moléculas de iRNA podem ser modificadas pela conjugação química para grupos lipofílicos, como para melhorar a absorção celular de colesterol e prevenir a degradação. Por exemplo, um iRNA dirigido contra ApoB conjugado a um agrupamento de colesterol lipofílico foi injetado sistemicamente em camundongos e resultou na inativação de mRNA apoB tanto no fígado e jejuno (Soutschek, J., et al (2004) *Nature* 432:173-178). A conjugação de um iRNA a um aptâmero foi mostrada para inibir o crescimento do tumor e mediar a regressão tumoral em um modelo de camundongo do câncer de próstata (McNamara, JO., et al (2006) *Nat. Biotechnol.* 24:1005-1015). Em modalidade alternativa, o iRNA pode ser aplicado usando sistemas de distribuição de medicamentos, como uma nanopartícula, um dendrímero, um polímero, lipossomas ou um sistema de entrega catiônico. Sistemas de entrega catiônicos carregados positivamente facilitam a ligação de uma molécula de iRNA (carregado negativamente) e também reforçar as interações na membrana da célula negativamente carregada, para permitir a absorção eficiente de um iRNA pela célula. Lipídios catiônicos, dendrímeros ou polímeros podem ser ligados a um iRNA, ou induzido a formar uma vesícula ou micela (ver, por exemplo, Kim SH., et al (2008), *Journal of Controlled Release* 129(2):107-116) que envolvem um iRNA. A formação de vesículas ou micelas impede ainda a degradação do iRNA quando administrado sistemicamente. Métodos para fazer e administrar complexos de iRNA catiônicos estão bem dentro das habilidades de

um versado na técnica (ver, por exemplo, Sorensen, DR., et al (2003) J. Mol. Biol 327:761-766; Verma, UN., et al (2003) Clin. Cancer Res. 9:1291-1300; Arnold, AS et al (2007) J. Hypertens. 25:197-205, os quais estão aqui incorporados a título de referência em sua totalidade. Alguns exemplos não limitantes de sistemas de distribuição de medicamentos úteis para aplicação de iRNAs sistêmicos incluem DOTAP (Sorensen, DR., et al (2003), supra; Verma, UN., et al (2003), supra), Oligofectamina, "partículas de lipídios de ácido nucleico sólidas" (Zimmermann, TS., et al (2006) Nature 441:111-114), cardiolipina (Chien, PY., et al (2005) Cancer Gene Ther. 12:321-328; Pal, A., et al (2005) Int J. Oncol. 26:1087-1091), polietileno imina (Bonnet ME., et al (2008) Pharm. Res. Aug 16 Epub ahead of print; Aigner, A. (2006) J. Biomed. Biotechnol. 71659), Arg-Gly-Asp (RGD) peptídeos (Liu, S. (2006) Mol. Pharm. 3:472-487), e poliamino aminas (Tomalia, DA., et al (2007) Biochem. Soc. Trans. 35:61-67; Yoo, H., et al (1999) Pharm. Res. 16:1799-1804). Em algumas modalidades, um iRNA forma um complexo com ciclodextrina para administração sistêmica. Métodos para administração e composições farmacêuticas de iRNAs e ciclodextrinas podem ser encontrados em patente US No. 7.427.605, que está incorporada aqui por referência em sua totalidade.

#### *A. iRNAs codificados por vetor da invenção*

[00432] iRNA direcionando o gene *Serpinc1* pode ser expressado a partir de unidades de transcrição inseridas nos vetores de DNA ou RNA (ver, por exemplo, Couture, A, et al., TIG. (1996), 12:5-10; Skillern, A., et al., Publicação de patente PCT nº. WO 00/22113, Conrad, Publicação de patente PCT nº WO 00/22114, e Conrad, Patente US No. 6.054.299). Expressão pode ser transitória (da ordem de horas a semanas) ou sustentada (semanas a meses ou mais), dependendo da construção específica usada e o tecido alvo ou tipo de célula. Estes transgenes podem ser introduzidos como uma

construção linear, um plasmídeo circular ou um vetor viral, que pode ser um vetor de integração ou não integração. O transgene pode também ser construído de forma a permitir que seja herdado como um plasmídeo extracromossômico (Gassmann, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995) 92:1292).

[00433] A fita ou fitas individuais de um iRNA podem ser transcrita a partir de um promotor em um vetor de expressão. Onde duas vertentes separadas devem ser expressadas para gerar, por exemplo, um dsRNA, dois vetores de expressão separados podem ser co-introduzidos (por ex., por transfecção ou infecção) em uma célula-alvo. Alternativamente, cada fita individual de dsRNA pode ser transcrita por promotores que estão localizados no mesmo plasmídeo de expressão. Em uma modalidade, um dsRNA é expressado como polinucleotídeos de repetição invertida unidos por uma sequência de polinucleotídeos ligantes de tal forma que o dsRNA tem uma estrutura de caule e alça.

[00434] Os vetores de expressão do iRNA são geralmente plasmídios de DNA ou vetores virais. Vetores de expressão compatíveis com células eucarióticas, preferencialmente as compatíveis com células de vertebrados, podem ser usados para a produção de construções recombinantes para a expressão de um iRNA conforme descrito aqui. Vetores de expressão de células eucarióticas são bem conhecidos na técnica e estão disponíveis a partir de um número de fontes comerciais. Geralmente, esses vetores são fornecidos com locais de restrição convenientes para a inserção do segmento de ácido nucleico desejado. A aplicação de iRNA expressando vetores pode ser sistêmica, como por administração intravenosa ou intramuscular, por administração a células alvo explantadas do paciente, seguido de reintrodução no paciente, ou por qualquer outros meios que permita a sua introdução em uma célula-alvo desejada.

[00435] Os plasmídeos de expressão de iRNA podem ser transfectados para células-alvo como um complexo com carreadores de lipídios catiônicos (por exemplo, oligofectamina) ou carreadores baseados em lipídios não catiônicos (por exemplo, Transit-TKOTM). Várias transfecções lipídicas para inativações mediadas por iRNA direcionadas a diferentes regiões de um RNA alvo durante um período de uma semana ou mais são também contemplados pela invenção. Introdução bem sucedida de vetores em células hospedeiras pode ser monitorada usando vários métodos conhecidos. Por exemplo, transfecção transiente pode ser assinalada com um repórter, como um marcador fluorescente, como a proteína verde fluorescente (GFP). A transfecção estável de células ex vivo pode ser garantida usando marcadores que proporcionam à célula transfectada com resistência aos fatores ambientais específicos (por exemplo, antibióticos e fármacos), como a resistência à higromicina B.

[00436] Sistemas de vetor viral que pode ser usado com os métodos e as composições descritas neste documento incluem, mas não estão limitados a, (a) vetores adenovírus; (b) vetores retrovírus, incluindo mas não limitado a vetores lentivirais, vírus da leucemia murina de moloney, etc (c) vetores de vírus adeno-associado; (d) vetores de vírus herpes simplex; (e) vetores SV 40; (f) vetores do vírus polioma; (g) vetores do vírus papiloma; (h) vetores picornavírus; (i) vetores do vírus da varíola como um orthopox, por exemplo, vetores do vírus vaccinia ou avipox, por exemplo, varíola canária ou varíola de aves; e j) um adenovírus de intestino ou dependente de ajudante. Os vírus de replicação com defeito também pode ser vantajoso. Diferentes vetores vão ou não vão se tornar incorporados no genoma de células. As construções podem incluir sequências virais para a transfecção, se desejado. Alternativamente, a construção pode ser incorporada em vetores capazes de replicação episossomal, por

exemplo, vetores EPV e EBV. Construções para a expressão recombinante de um iRNA geralmente vai exigir elementos de regulamentação, por exemplo, promotores, etc, para garantir a expressão do iRNA nas células-alvo. Outros aspectos a considerar para vetores e construções são descritos mais abaixo.

[00437] Vetores úteis para a aplicação de um iRNA irá incluir elementos reguladores (promotor, potencializador, etc) suficiente para a expressão do iRNA no tecido ou na célula-alvo desejada. Os elementos reguladores podem ser escolhidos para fornecer a expressão constitutiva ou regulada/ induzível.

[00438] Expressão do iRNA pode ser regulada com precisão, por exemplo, usando uma sequência reguladora induzível que é sensível a certos reguladores fisiológicos, como, por exemplo, níveis de glicose circulante ou hormônios (Dochrety et al., 1994, FASEB J. 8:20-24). Tais sistemas de expressão induzíveis, adequados para o controle da expressão de dsRNA em células ou em mamíferos incluem, por exemplo, a regulação por ecdisona, por estrogênio, progesterona, tetraciclina, indutores químicos de dimerização e isopropil-beta-D1 - tiogalactopiranosídeo (IPTG). Um versado na técnica seria capaz de escolher a sequência promotora/reguladora adequada com base no uso pretendido do transgene de iRNA.

[00439] Vetores virais que contêm sequências de ácidos nucleicos de codificação de um iRNA podem ser usados. Por exemplo, um vetor retroviral pode ser usado (ver Miller et al., Meth. Enzymol. 217:581-599 (1993)). Estes vetores retrovirais contêm os elementos necessários para o empacotamento correto do genoma viral e integração no DNA da célula hospedeira. As sequências de ácidos nucleicos codificando um iRNA são clonadas em um ou mais vetores, o que facilita a distribuição do ácido nucleico em um paciente. Mais detalhes sobre vetores retrovirais podem ser encontrados, por exemplo, em Boesen et

al., *Biotherapy* 6:291-302 (1994), que descreve o uso de um vetor retroviral para aplicar o gene *mdr1* às células-tronco hematopoéticas para tornar as células-tronco mais resistentes à quimioterapia. Outras referências que ilustram o uso de vetores retrovirais na terapia gênica são: Clowes et al., *J. Clin. Invest.* 93:644-651 (1994); Kiem et al., *Blood* 83:1467-1473 (1994); Salmons and Gunzberg, *Human Gene Therapy* 4:129-141 (1993); e Grossman and Wilson, *Curr. Opin. in Genetics and Devel.* 3:110-114 (1993). Os vetores lentivirais contemplados para uso incluem, por exemplo, os vetores a base de HIV descritos nas patentes US nºs 6.143.520; 5.665.557 e 5.981.276, que são aqui incorporadas por referência.

[00440] Os adenovírus são também previstas para uso na aplicação de iRNAs da invenção. Os adenovírus são veículos especialmente atraentes, por exemplo, para aplicar os genes aos epitélios respiratórios. O Adenovírus infecta naturalmente epitélios respiratórios onde eles causam uma doença leve. Outros alvos para sistemas de aplicação a base de adenovírus são fígado, sistema nervoso central, células endoteliais e músculo. Os adenovírus têm a vantagem de ser capaz de infectar células de não divisão. Kozarsky and Wilson, *Current Opinion in Genetics and Development* 3:499-503 (1993) apresentam uma revisão de terapia gênica a base de adenovírus. Bout et al., *Human Gene Therapy* 5:3-10 (1994) demonstraram o uso de vetores de adenovírus para a transferência de genes para os epitélios respiratórios de macacos rhesus. Outros exemplos do uso de adenovírus na terapia gênica podem ser encontrados em Rosenfeld et al., *Science* 252:431-434 (1991); Rosenfeld et al., *Cell* 68:143-155 (1992); Mastrangeli et al., *J. Clin. Invest.* 91:225-234 (1993); Publicação PCT WO94/12649; e Wang, et al., *Gene Therapy* 2:775-783 (1995). Um vetor AV adequado para exprimir um iRNA em destaque na invenção, um método para construir o vetor de AV

recombinante, e um método para aplicar o vetor em células alvo, são descritos em Xia H et al. (2002), Nat. Biotech. 20: 1006-1010.

[00441] Os vetores do vírus adeno-associado (AAV) também podem ser usados para uma aplicação de iRNA da invenção (Walsh et al., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 204:289-300 (1993); patente US No. 5.436.146). Em uma modalidade, o iRNA pode ser expressado como duas moléculas de RNA de fita simples complementares a partir de um vetor recombinante AAV, por exemplo, os promotores de RNA U6 ou H1, ou o promotor de citomegalovírus (CMV). Vetores de AAV adequados para expressar um dsRNA em destaque na invenção, métodos para construir o vetor de AV recombinante, e métodos para aplicar os vetores em células alvo, são descritos em Samulski R et al. (1987), J. Virol. 61: 3096-3101; Fisher K J et al. (1996), J. Virol, 70: 520-532; Samulski R et al. (1989), J. Virol. 63: 3822-3826; patente US No. 5.252.479, Pat. US N° 5.139.941; pedido de patente internacional WO 94/13788; e pedido de patente internacional WO 93/24641, estando as revelações das mesmas aqui incorporadas, a título de referência

[00442] Outro vetor viral adequado para a aplicação de um iRNA da invenção é um vírus da varíola como um vírus atenuado, por exemplo, como um vírus vaccínia atenuado como Vírus modificado Ankara (MVA) ou NYVAC, avipox como varíola canária ou varíola de aves.

[00443] O tropismo de vetores virais pode ser modificado por pseudotipagem dos vetores com as proteínas do envelope ou outros antígenos de superfície de outros vírus, ou por substituição de diferentes proteínas do capsídeo viral, conforme apropriado. Por exemplo, os vetores lentivirais podem ser pseudotipados com proteínas de superfície do vírus da estomatite vesicular (VSV), raiva, ebola, Mokola, e similares. Os vetores AAV podem ser feitos para direcionar diferentes células pela modificação dos vetores para

expressar diferentes sorotipos da proteína capsidial; ver, por exemplo, Rabinowitz J E et al. (2002), J Virol 76:791-801, cuja descrição está aqui incorporada a título de referência.

[00444] A preparação farmacêutica de um vetor pode incluir o vetor em um diluente aceitável, ou pode incluir uma matriz de liberação lenta, em que o veículo de aplicação do gene está embebido. Alternativamente, onde o vetor completo de aplicação de genes pode ser produzido de forma intacta a partir de células recombinantes, por exemplo, vetores retrovirais, a preparação farmacêutica pode incluir uma ou mais células que produzem o sistema de liberação do gene.

#### **V. Composição farmacêutica da invenção**

[00445] A presente invenção também fornece composições farmacêuticas e formulações que incluem os iRNAs da invenção. Em uma modalidade, composições farmacêuticas são fornecidas contendo um iRNA, como descrito neste documento, e um carreador farmacêuticamente aceitável. As composições farmacêuticas contendo o iRNA são úteis para tratar uma doença ou distúrbio associado com a expressão ou atividade de um gene *Serpinc1*, por exemplo, uma doença associada ao *Serpinc1*. Tais composições farmacêuticas são formuladas com base no modo de aplicação. Um exemplo são as composições que são formuladas para a administração sistêmica via aplicação parenteral, por exemplo, por aplicação subcutânea (SC) ou intravenosa (IV). Outro exemplo é composições que são formuladas para aplicação direta no parênquima cerebral, por exemplo, por infusão no cérebro, como por infusão de bomba contínua. As composições farmacêuticas da invenção podem ser administradas em doses suficientes para inibir a expressão de um gene *Serpinc1*.

[00446] Em certas modalidades da invenção, por exemplo, quando uma composição farmacêutica compreende um agente de RNAi de fita

dupla, inclui um ou mais motivos de três modificações idênticas em três nucleotídeos consecutivos, incluindo um desses motivos no ou próximo ao sítio de clivagem do agente, seis ligações de fosforotioato e um ligante GalNAc, essa composição é administrada na dose de 0,200 a cerca de 1,825 mg/kg, 0,200 a cerca de 1,800 mg/kg, cerca de 0,200 a cerca de 1,700 mg/kg, cerca de 0,200 a cerca de 1,600 mg/kg, cerca de 0,200 a cerca de 1,500 mg/kg, cerca de 0,200 a cerca de 1,400 mg/kg, cerca de 0,200 a cerca de 1,400 mg/kg, cerca de 0,200 a cerca de 1,200 mg/kg, cerca de 0,200 a cerca de 1,100 mg/kg, cerca de 0,200 a cerca de 1,000 mg/kg, cerca de 0,200 a cerca de 0,900 mg/kg, cerca de 0,200 a cerca de 0,800 mg/kg, cerca de 0,200 a cerca de 0,700 mg/kg, cerca de 0,200 a cerca de 0,600 mg/kg, cerca de 0,200 a cerca de 0,500 mg/kg, cerca de 0,200 a cerca de 0,400 mg/kg, cerca de 0,225 a cerca de 1,825 mg/kg, cerca de 0,225 a cerca de 1,800 mg/kg, cerca de 0,225 a cerca de 1,700 mg/kg, cerca de 0,225 a cerca de 1,600 mg/kg, cerca de 0,225 a cerca de 1,500 mg/kg, cerca de 0,225 a cerca de 1,400 mg/kg, cerca de 0,225 a cerca de 1,400 mg/kg, cerca de 0,225 a cerca de 1,200 mg/kg, cerca de 0,225 a cerca de 1,100 mg/kg, cerca de 0,225 a cerca de 1,000 mg/kg, cerca de 0,225 a cerca de 0,900 mg/kg, cerca de 0,225 a cerca de 0,800 mg/kg, cerca de 0,225 a cerca de 0,700 mg/kg, cerca de 0,225 a cerca de 0,600 mg/kg, cerca de 0,225 a cerca de 0,500 mg/kg, cerca de 0,225 a cerca de 0,400 mg/kg, cerca de 0,250 a cerca de 1,825 mg/kg, cerca de 0,250 a cerca de 1,800 mg/kg, cerca de 0,250 a cerca de 1,700 mg/kg, cerca de 0,250 a cerca de 1,600 mg/kg, cerca de 0,250 a cerca de 1,500 mg/kg, cerca de 0,250 a cerca de 1,400 mg/kg, cerca de 0,250 a cerca de 1,400 mg/kg, cerca de 0,250 a cerca de 1,200 mg/kg, cerca de 0,250 a cerca de 1,100 mg/kg, cerca de 0,250 a cerca de 1,000 mg/kg, cerca de 0,250 a cerca de 0,900 mg/kg, cerca de 0,250 a cerca de 0,800 mg/kg, cerca de 0,250 a cerca de 0,700 mg/kg, cerca

de 0,250 a cerca de 0,600 mg/kg, cerca de 0,250 a cerca de 0,500 mg/kg, cerca de 0,250 a cerca de 0,400 mg/kg, cerca de 0,425 a cerca de 1,825 mg/kg, cerca de 0,425 a cerca de 1,800 mg/kg, cerca de 0,425 a cerca de 1,700 mg/kg, cerca de 0,425 a cerca de 1,600 mg/kg, cerca de 0,425 a cerca de 1,500 mg/kg, cerca de 0,425 a cerca de 1,400 mg/kg, cerca de 0,425 a cerca de 1,400 mg/kg, cerca de 0,425 a cerca de 1,200 mg/kg, cerca de 0,425 a cerca de 1,100 mg/kg, cerca de 0,425 a cerca de 1,000 mg/kg, cerca de 0,425 a cerca de 0,900 mg/kg, cerca de 0,425 a cerca de 0,800 mg/kg, cerca de 0,425 a cerca de 0,700 mg/kg, cerca de 0,425 a cerca de 0,600 mg/kg, cerca de 0,425 a cerca de 0,500 mg/kg, cerca de 0,450 a cerca de 1,825 mg/kg, cerca de 0,450 a cerca de 1,800 mg/kg, cerca de 0,450 a cerca de 1,700 mg/kg, cerca de 0,450 a cerca de 1,600 mg/kg, cerca de 0,450 a cerca de 1,500 mg/kg, cerca de 0,450 a cerca de 1,400 mg/kg, cerca de 0,450 a cerca de 1,400 mg/kg, cerca de 0,450 a cerca de 1,200 mg/kg, cerca de 0,450 a cerca de 1,100 mg/kg, cerca de 0,450 a cerca de 1,000 mg/kg, cerca de 0,450 a cerca de 0,900 mg/kg, cerca de 0,450 a cerca de 0,800 mg/kg, cerca de 0,450 a cerca de 0,700 mg/kg, cerca de 0,450 a cerca de 0,600 mg/kg, cerca de 0,450 a cerca de 0,500 mg/kg, cerca de 0,475 a cerca de 1,825 mg/kg, cerca de 0,475 a cerca de 1,800 mg/kg, cerca de 0,475 a cerca de 1,700 mg/kg, cerca de 0,475 a cerca de 1,600 mg/kg, cerca de 0,475 a cerca de 1,500 mg/kg, cerca de 0,475 a cerca de 1,400 mg/kg, cerca de 0,475 a cerca de 1,400 mg/kg, cerca de 0,475 a cerca de 1,200 mg/kg, cerca de 0,475 a cerca de 1,100 mg/kg, cerca de 0,475 a cerca de 1,000 mg/kg, cerca de 0,475 a cerca de 0,900 mg/kg, cerca de 0,475 a cerca de 0,800 mg/kg, cerca de 0,475 a cerca de 0,700 mg/kg, cerca de 0,475 a cerca de 0,600 mg/kg, cerca de 0,475 a cerca de 0,500 mg/kg, cerca de 0,875 a cerca de 1,825 mg/kg, cerca de 0,875 a cerca de 1,800 mg/kg, cerca de 0,875 a cerca de 1,700 mg/kg, cerca de 0,875 a cerca

de 1,600 mg/kg, cerca de 0,875 a cerca de 1,500 mg/kg, cerca de 0,875 a cerca de 1,400 mg/kg, cerca de 0,875 a cerca de 1,400 mg/kg, cerca de 0,875 a cerca de 1,200 mg/kg, cerca de 0,875 a cerca de 1,100 mg/kg, cerca de 0,875 a cerca de 1,000 mg/kg, cerca de 0,875 a cerca de 0,900 mg/kg, cerca de 0,900 a cerca de 1,825 mg/kg, cerca de 0,900 a cerca de 1,800 mg/kg, cerca de 0,900 a cerca de 1,700 mg/kg, cerca de 0,900 a cerca de 1,600 mg/kg, cerca de 0,900 a cerca de 1,500 mg/kg, cerca de 0,900 a cerca de 1,400 mg/kg, cerca de 0,900 a cerca de 1,400 mg/kg, cerca de 0,900 a cerca de 1,200 mg/kg, cerca de 0,900 a cerca de 1,100 mg/kg, cerca de 0,900 a cerca de 1,000 mg/kg, cerca de 0,925 a cerca de 1,825 mg/kg, cerca de 0,925 a cerca de 1,800 mg/kg, cerca de 0,925 a cerca de 1,700 mg/kg, cerca de 0,925 a cerca de 1,600 mg/kg, cerca de 0,925 a cerca de 1,500 mg/kg, cerca de 0,925 a cerca de 1,400 mg/kg, cerca de 0,925 a cerca de 1,400 mg/kg, cerca de 0,925 a cerca de 1,200 mg/kg, cerca de 0,925 a cerca de 1,100 mg/kg, ou cerca de 0,925 a cerca de 1,000 mg/kg. Os valores e as faixas intermediárias para os valores enunciados anteriormente mencionados também estão destinados a ser parte desta invenção, por exemplo, o agente de RNAi pode ser administrado a indivíduos a uma dose de cerca de 0,015 mg/kg a cerca de 0,45 mg/mg.

[00447] Por exemplo, o agente de RNAi, por exemplo, agente de RNAi em uma composição farmacêutica, pode ser administrado a uma dose de cerca de 0,2 mg/kg, 0,225 mg/kg, 0,25 mg/kg, 0,275 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,325 mg/kg, 0,35 mg/kg, 0,375 mg/kg, 0,4 mg/kg, 0,425 mg/kg, 0,45 mg/kg, 0,475 mg/kg, cerca de 0,5 mg/kg, 0,525 mg/kg, 0,55 mg/kg, 0,575 mg/kg, cerca de 0,6 mg/kg, 0,625 mg/kg, 0,65 mg/kg, 0,675 mg/kg, cerca de 0,7 mg/kg, 0,725 mg/kg, 0,75 mg/kg, 0,775 mg/kg, cerca de 0,8 mg/kg, 0,925 mg/kg, 0,95 mg/kg, 0,975 mg/kg, cerca de 1,0 mg/kg, 1,025 mg/kg, 1,05 mg / kg, 1,075 mg/kg,

cerca de 1,1 mg/kg, 1,125 mg/kg, 1,15 mg/kg, 1,175 mg/kg, cerca de 1,2 mg/kg, 1,225 mg/kg 1,25 mg / kg, 1,275 mg/kg, cerca de 1,3 mg/kg, 1,325 mg/kg, 1,35 mg/kg, 1,375 mg/kg, cerca de 1,4 mg/kg, 1,425 mg/kg, 1,45 mg/kg, 1,475 mg/kg cerca de 1,5 mg/kg, 1,525 mg/kg, 1,55 mg/kg, 1,575 mg/kg, cerca de 1,6 mg/kg, 1,625 mg/kg, 1,65 mg/kg, 1,675 mg/kg, cerca de 1,7 mg/kg, 1,725 mg/kg, 1,75 mg/kg, 1,775 mg/kg, ou cerca de 1,8 mg/kg. Os valores intermediários para os valores enumerados anteriormente mencionados também estão destinados a ser parte desta invenção.

[00448] Em algumas modalidades da invenção, por exemplo, quando uma agente de RNAi compreende uma fita senso e uma fita antissenso, a fita antissenso compreendendo uma região de complementaridade para um *Serpinc1* que codifica um mRNA1 que compreende pelo menos 15 nucleotídeos contíguos diferente em não mais de 3 nucleotídeos da sequência de nucleotídeos de 5' - UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG - 3' (SEQ ID NO: 15), onde praticamente todos os nucleotídeos da fita senso e substancialmente todos os nucleotídeos da fita antissenso são nucleotídeos modificados, e onde a fita senso está conjugada com um ligante fixado no 3'-terminal, tal agente é uma composição farmacêutica administrada em uma dose de cerca de 0,200 a cerca de 1,825 mg/kg, 0,200 a cerca de 1,800 mg/kg, cerca de 0,200 a cerca de 1,700 mg/kg, cerca de 0.200 a cerca de 1,600 mg/kg, cerca de 0,200 a cerca de 1,500 mg/kg, cerca de 0,200 a cerca de 1,400 mg/kg, cerca de 0,200 a cerca de 1,400 mg/kg, cerca de 0,200 a cerca de 1,200 mg/kg, cerca de 0,200 a cerca de 1,100 mg/kg, cerca de 0,200 a cerca de 1,000 mg/kg, cerca de 0,200 a cerca de 0,900 mg/kg, cerca de 0,200 a cerca de 0,800 mg/kg, cerca de 0,200 a cerca de 0,700 mg/kg, cerca de 0,200 a cerca de 0,600 mg/kg, cerca de 0,200 a cerca de 0,500 mg/kg, cerca de 0,200 a cerca de 0,400 mg/kg, cerca de 0,225 a cerca de 1,825 mg/kg, cerca

de 0,225 a cerca de 1,800 mg/kg, cerca de 0,225 a cerca de 1,700 mg/kg, cerca de 0,225 a cerca de 1,600 mg/kg, cerca de 0,225 a cerca de 1,500 mg/kg, cerca de 0,225 a cerca de 1,400 mg/kg, cerca de 0,225 a cerca de 1,400 mg/kg, cerca de 0,225 a cerca de 1,200 mg/kg, cerca de 0,225 a cerca de 1,100 mg/kg, cerca de 0,225 a cerca de 1,000 mg/kg, cerca de 0,225 a cerca de 0,900 mg/kg, cerca de 0,225 a cerca de 0,800 mg/kg, cerca de 0,225 a cerca de 0,700 mg/kg, cerca de 0,225 a cerca de 0,600 mg/kg, cerca de 0,225 a cerca de 0,500 mg/kg, cerca de 0,225 a cerca de 0,400 mg/kg, cerca de 0,250 a cerca de 1,825 mg/kg, cerca de 0,250 a cerca de 1,800 mg/kg, cerca de 0,250 a cerca de 1,700 mg/kg, cerca de 0,250 a cerca de 1,600 mg/kg, cerca de 0,250 a cerca de 1,500 mg/kg, cerca de 0,250 a cerca de 1,400 mg/kg, cerca de 0,250 a cerca de 1,400 mg/kg, cerca de 0,250 a cerca de 1,200 mg/kg, cerca de 0,250 a cerca de 1,100 mg/kg, cerca de 0,250 a cerca de 1,000 mg/kg, cerca de 0,250 a cerca de 0,900 mg/kg, cerca de 0,250 a cerca de 0,800 mg/kg, cerca de 0,250 a cerca de 0,700 mg/kg, cerca de 0,250 a cerca de 0,600 mg/kg, cerca de 0,250 a cerca de 0,500 mg/kg, cerca de 0,250 a cerca de 0,400 mg/kg, cerca de 0,425 a cerca de 1,825 mg/kg, cerca de 0,425 a cerca de 1,800 mg/kg, cerca de 0,425 a cerca de 1,700 mg/kg, cerca de 0,425 a cerca de 1,600 mg/kg, cerca de 0,425 a cerca de 1,500 mg/kg, cerca de 0,425 a cerca de 1,400 mg/kg, cerca de 0,425 a cerca de 1,400 mg/kg, cerca de 0,425 a cerca de 1,200 mg/kg, cerca de 0,425 a cerca de 1,100 mg/kg, cerca de 0,425 a cerca de 1,000 mg/kg, cerca de 0,425 a cerca de 0,900 mg/kg, cerca de 0,425 a cerca de 0,800 mg/kg, cerca de 0,425 a cerca de 0,700 mg/kg, cerca de 0,425 a cerca de 0,600 mg/kg, cerca de 0,425 a cerca de 0,500 mg/kg, cerca de 0,450 a cerca de 1,825 mg/kg, cerca de 0,450 a cerca de 1,800 mg/kg, cerca de 0,450 a cerca de 1,700 mg/kg, cerca de 0,450 a cerca de 1,600 mg/kg, cerca de 0,450 a cerca de 1,500 mg/kg, cerca de 0,450 a cerca

de 1,400 mg/kg, cerca de 0,450 a cerca de 1,400 mg/kg, cerca de 0,450 a cerca de 1,200 mg/kg, cerca de 0,450 a cerca de 1,100 mg/kg, cerca de 0,450 a cerca de 1,000 mg/kg, cerca de 0,450 a cerca de 0,900 mg/kg, cerca de 0,450 a cerca de 0,800 mg/kg, cerca de 0,450 a cerca de 0,700 mg/kg, cerca de 0,450 a cerca de 0,600 mg/kg, cerca de 0,450 a cerca de 0,500 mg/kg, cerca de 0,475 a cerca de 1,825 mg/kg, cerca de 0,475 a cerca de 1,800 mg/kg, cerca de 0,475 a cerca de 1,700 mg/kg, cerca de 0,475 a cerca de 1,600 mg/kg, cerca de 0,475 a cerca de 1,500 mg/kg, cerca de 0,475 a cerca de 1,400 mg/kg, cerca de 0,475 a cerca de 1,400 mg/kg, cerca de 0,475 a cerca de 1,200 mg/kg, cerca de 0,475 a cerca de 1,100 mg/kg, cerca de 0,475 a cerca de 1,000 mg/kg, cerca de 0,475 a cerca de 0,900 mg/kg, cerca de 0,475 a cerca de 0,800 mg/kg, cerca de 0,475 a cerca de 0,700 mg/kg, cerca de 0,475 a cerca de 0,600 mg/kg, cerca de 0,475 a cerca de 0,500 mg/kg, cerca de 0,875 a cerca de 1,825 mg/kg, cerca de 0,875 a cerca de 1,800 mg/kg, cerca de 0,875 a cerca de 1,700 mg/kg, cerca de 0,875 a cerca de 1,600 mg/kg, cerca de 0,875 a cerca de 1,500 mg/kg, cerca de 0,875 a cerca de 1,400 mg/kg, cerca de 0,875 a cerca de 1,400 mg/kg, cerca de 0,875 a cerca de 1,200 mg/kg, cerca de 0,875 a cerca de 1,100 mg/kg, cerca de 0,875 a cerca de 1,000 mg/kg, cerca de 0,875 a cerca de 0,900 mg/kg, cerca de 0,900 a cerca de 1,825 mg/kg, cerca de 0,900 a cerca de 1,800 mg/kg, cerca de 0,900 a cerca de 1,700 mg/kg, cerca de 0,900 a cerca de 1,600 mg/kg, cerca de 0,900 a cerca de 1,500 mg/kg, cerca de 0,900 a cerca de 1,400 mg/kg, cerca de 0,900 a cerca de 1,400 mg/kg, cerca de 0,900 a cerca de 1,200 mg/kg, cerca de 0,900 a cerca de 1,100 mg/kg, cerca de 0,900 a cerca de 1,000 mg/kg, cerca de 0,925 a cerca de 1,825 mg/kg, cerca de 0,925 a cerca de 1,800 mg/kg, cerca de 0,925 a cerca de 1,700 mg/kg, cerca de 0,925 a cerca de 1,600 mg/kg, cerca de 0,925 a cerca de 1,500 mg/kg, cerca de 0,925 a cerca de 1,400 mg/kg,

cerca de 0,925 a cerca de 1,400 mg/kg, cerca de 0,925 a cerca de 1,200 mg/kg, cerca de 0,925 a cerca de 1,100 mg/kg, ou cerca de 0,925 a cerca de 1,000 mg/kg. Os valores e as faixas intermediárias para os valores enunciados anteriormente mencionados também estão destinados a ser parte desta invenção, por exemplo, o agente de RNAi pode ser administrado a indivíduos a uma dose de cerca de 0,015 mg/kg a cerca de 0,45 mg/mg.

[00449] Por exemplo, o agente de RNAi, por exemplo, agente de RNAi em uma composição farmacêutica, pode ser administrado a uma dose de cerca de 0,2 mg/kg, 0,225 mg/kg, 0,25 mg/kg, 0,275 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,325 mg/kg, 0,35 mg/kg, 0,375 mg/kg, 0,4 mg/kg, 0,425 mg/kg, 0,45 mg/kg, 0,475 mg/kg, cerca de 0,5 mg/kg, 0,525 mg/kg, 0,55 mg/kg, 0,575 mg/kg, cerca de 0,6 mg/kg, 0,625 mg/kg, 0,65 mg/kg, 0,675 mg/kg, cerca de 0,7 mg/kg, 0,725 mg/kg, 0,75 mg/kg, 0,775 mg/kg, cerca de 0,8 mg/kg, 0,925 mg/kg, 0,95 mg/kg, 0,975 mg/kg, cerca de 1,0 mg/kg, 1,025 mg/kg, 1,05 mg / kg, 1,075 mg/kg, cerca de 1,1 mg/kg, 1,125 mg/kg, 1,15 mg/kg, 1,175 mg/kg, cerca de 1,2 mg/kg, 1,225 mg/kg, 1,25 mg/kg, 1,275 mg/kg, cerca de 1,3 mg/kg, 1,325 mg/kg, 1,35 mg/kg, 1,375 mg/kg, cerca de 1,4 mg/kg, 1,425 mg/kg, 1,45 mg/kg, 1,475 mg/kg, cerca de 1,5 mg/kg, 1,525 mg/kg, 1,55 mg/kg, 1,575 mg/kg, cerca de 1,6 mg/kg, 1,625 mg/kg, 1,65 mg/kg, 1,675 mg/kg, cerca de 1,7 mg/kg, 1,725 mg/kg, 1,75 mg/kg, 1,775 mg/kg, ou cerca de 1,8 mg/kg. Os valores intermediários para os valores enumerados anteriormente mencionados também estão destinados a ser parte desta invenção.

[00450] Em algumas modalidades, uma composição farmacêutica compreendendo o agente de iRNA é administrada a um indivíduo em uma dose fixa. Uma "dose fixa" (por exemplo, uma dose em mg), significa que uma dose de um agente de iRNA é usado para todos os indivíduos, independentemente de quaisquer factores relacionados

com indivíduos específicos, como o peso. Em uma determinada modalidade, uma dose fixa de um agente de iRNA da invenção é baseada em um peso ou idade pré-determinados.

[00451] Em algumas modalidades, a composição farmacêutica compreendendo o agente de RNAi é administrada a uma dose fixa de entre cerca de 25 mg a cerca de 100 mg, por exemplo, entre cerca de 25 mg a cerca de 95 mg, entre cerca de 25 mg a cerca de 90 mg, entre cerca de 25 mg a cerca de 85 mg, entre cerca de 25 mg a cerca de 80 mg, entre cerca de 25 mg a cerca de 75 mg, entre cerca de 25 mg a cerca de 70 mg, entre cerca de 25 mg a cerca de 65 mg, entre cerca de 25 mg a cerca de 60 mg, entre cerca de 25 mg a cerca de 50 mg, entre cerca de 50 a cerca de 100 mg, entre cerca de 50 mg a cerca de 95 mg, entre cerca de 50 mg a cerca de 90 mg, entre cerca de 50 mg a cerca de 85 mg, entre cerca de 50 mg a cerca de 80 mg, entre cerca de 30 a cerca de 100 mg, entre cerca de 30 mg a cerca de 90 mg, entre cerca de 30 mg a cerca de 80 mg, entre cerca de 40 a cerca de 100 mg, entre cerca de 40 mg a cerca de 90 mg, entre cerca de 40 mg a cerca de 80 mg, entre cerca de 60 a cerca de 100 mg, entre cerca de 60 mg a cerca de 90 mg, entre cerca de 25 mg a cerca de 55 mg, entre cerca de 30 mg a cerca de 95 mg, entre cerca de 30 mg a cerca de 85 mg, entre cerca de 30 mg a cerca de 75 mg, entre cerca de 30 mg a cerca de 65 mg, entre cerca de 30 mg a cerca de 55 mg, entre cerca de 40 mg a cerca de 95 mg, entre cerca de 40 mg a cerca de 85 mg, entre cerca de 40 mg a cerca de 75 mg, entre cerca de 40 mg a cerca de 65 mg, entre cerca de 40 mg a cerca de 55 mg, ou entre cerca de 45 mg a cerca de 95 mg.

[00452] Em algumas modalidades, a composição farmacêutica compreendendo o agente de RNAi é administrada em uma dose fixa de cerca de 25 mg, cerca de 30 mg, cerca de 35 mg, cerca de 40 mg, cerca de 45 mg, cerca de 50 mg, cerca de 55 mg, cerca de 60 mg,

cerca de 65 mg, cerca de 70 mg, cerca de 75 mg, cerca de 80 mg, cerca de 85 mg, cerca de 90 mg, cerca de 95 mg ou cerca de 100 mg.

[00453] A composição farmacêutica compreendendo o iRNA pode ser administrada ao indivíduo cerca de uma vez por mês, cerca de uma vez a cada cinco semanas, cerca de uma vez a cada dois meses ou uma vez a cada trimestre.

[00454] A composição farmacêutica compreendendo o agente de iRNA pode ser administrada ao indivíduo como uma ou mais doses. Em algumas modalidades, as composições farmacêuticas compreendendo o agente de iRNA de fita dupla pode ser administrado a um indivíduo como uma dose mensal de cerca de 0,200 mg/kg a cerca de 0,250 mg/kg, uma dose mensal de cerca de 0,425 mg/kg a cerca de 0,475 mg/kg, uma dose mensal de cerca de 0,875 mg/kg a cerca de 0,925 mg/kg, ou como uma dose mensal de cerca de 1,775 mg/kg a cerca de 1,825 mg/kg. Em algumas modalidades, as composições farmacêuticas compreendendo o agente de iRNA de fita dupla podem ser administradas para um indivíduo em uma dose fixa de cerca de 25 mg a cerca de 100 mg, por exemplo, cerca de 25 mg, 50 mg, cerca de 80 mg, ou seja, cerca de 100 mg.

[00455] A composição farmacêutica pode ser administrada por infusão intravenosa durante um período de tempo, como durante um período de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, ou cerca de 25 minutos. A administração pode ser repetida, por exemplo, em uma base regular, como, por exemplo, semanalmente, quinzenalmente (a cada duas semanas), mensalmente, a cada dois meses, a cada três meses, a cada quatro meses ou mais. Após um regime inicial de tratamento, o tratamento pode ser administrado em uma base menos frequente. Por exemplo, após a administração semanalmente ou quinzenalmente por três meses, a administração pode ser repetida uma vez por mês, por seis

meses ou por um ano ou mais.

[00456] A composição farmacêutica pode ser administrada uma vez ao dia, ou o iRNA pode ser administrado como dois, três, ou mais sub-doses a intervalos regulares ao longo do dia ou mesmo com o uso de infusão contínua ou aplicação através de uma formulação de liberação controlada. Nesse caso, o iRNA contido em cada sub-dose deve ser proporcionalmente menor para obter a dose diária total. A unidade de dosagem também pode formar composições para aplicação ao longo de vários dias, por exemplo, usando uma formulação de liberação sustentada convencional que prevê liberação sustentada do iRNA durante um período de vários dias. Formulações de liberação sustentada são bem conhecidas na técnica e são particularmente úteis para entrega de agentes em um determinado sítio, como, por exemplo, podem ser usados com os agentes da presente invenção. Nesta modalidade, a unidade de dosagem contém um múltiplo correspondente da dose diária.

[00457] Em outras modalidades, uma dose única de composições farmacêuticas pode ser de longa duração, de tal forma que doses subsequentes são administradas em não mais de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, ou 8 semana de intervalo. Em algumas modalidades da invenção, uma dose única de composições farmacêuticas da invenção é administrada uma vez por mês.

[00458] Os versados na técnica irão compreender que determinados fatores podem influenciar a dosagem e a temporização necessária para tratar efetivamente um indivíduo, incluindo, mas não se limitando a, gravidade da doença ou distúrbio, tratamentos anteriores, saúde geral e/ou idade do indivíduo e outras doenças presentes. Além disso, o tratamento de um indivíduo com uma quantidade terapêuticamente eficaz da composição pode incluir um único tratamento ou uma série de tratamentos. As estimativas de

doses eficazes e meias-vidas in vivo para os iRNAs individuais abrangidos pela invenção podem ser feitas usando metodologias convencionais ou com base em testes in vivo usando um modelo animal adequado, conforme já descrito neste documento.

[00459] Os avanços na genética do camundongo tem gerado uma série de modelos de camundongo para o estudo de diversas doenças humanas, como um distúrbio hemorrágico que se beneficiaria com a redução da expressão de *Serpinc1*. Tais modelos podem ser usados para testes in vivo de iRNA, bem como para a determinação de uma dose terapêutica eficaz. Modelos adequados de camundongo são conhecidos na técnica e incluem, por exemplo, modelos de camundongo de hemofilia A e modelos de camundongo de hemofilia B, por exemplo, camundongos contendo um nocaute de um gene de fator de coagulação, como os descritas em Bolliger, et al. (2010) *Thromb Haemost* 103:1233-1238, Bi L, et al. (1995) *Nat Genet* 10: 119-21, Lin et al. (1997) *Blood* 90: 3962-6, Kundu et al. (1998) *Blood* 92: 168-74, Wang et al. (1997) *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 11563-6, e Jin, et al. (2004) *Blood* 104:1733.

[00460] As composições farmacêuticas da presente invenção podem ser administradas em um número de maneiras, dependendo se o tratamento local ou sistêmico é desejado e sobre a área a ser tratada. A administração pode ser tópica (por exemplo, por um adesivo transdérmico), pulmonar, por exemplo, por inalação ou insuflação de pós ou aerossóis, incluindo por nebulizador; intratraqueal, intranasal, epidérmico e transdérmico, oral ou parenteral. A administração parenteral inclui injeção ou infusão venosa, intra-arterial, subcutânea, intraperitoneal ou intramuscular; subdérmica, por exemplo, através de um dispositivo implantado ou intracraniana, por exemplo, administração intraparenquimatosa, intratecal ou intraventricular.

[00461] A iRNA pode ser aplicado de forma a atingir um

determinado tecido, como o fígado (por exemplo, os hepatócitos do fígado).

[00462] Composições e formulações farmacêuticas para administração tópica podem incluir adesivos transdérmicos, pomadas, loções, cremes, géis, gotas, supositórios, sprays, líquidos e pós. Veículos farmacêuticos convencionais, aquosos, em pó ou em bases oleosas, espessantes e similares podem ser necessário ou desejáveis. Preservativos, luvas e similares revestidos também podem ser úteis. Formulações tópicas apropriadas incluem aquelas em que os iRNAs em destaque na invenção estão em mistura com um agente de aplicação tópica como lipídios, lipossomas, ácidos graxos, ésteres de ácidos graxos, esteroides, agentes quelantes e tensoativos. Formulações para uso tópico são descritas em detalhe na patente US 6.747.014, a qual é aqui incorporada por referência.

#### *A. Formulações adicionais*

##### *i. Emulsões*

[00463] As composições da presente invenção podem ser preparadas e formuladas como emulsões. Emulsões são tipicamente sistemas heterogêneos de um líquido disperso em outro sob a forma de gotas geralmente superiores a 0,1  $\mu$ m de diâmetro (ver, por exemplo, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., e Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199; Rosoff, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Volume 1, p. 245; Block in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 2, p. 335; Higuchi et al., in Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co.,

Easton, Pa., 1985, p. 301). Emulsões são muitas vezes sistemas bifásicos compreendendo duas fases líquidas imiscíveis intimamente misturadas e dispersas umas com as outras. Em geral, emulsões podem ser de água em óleo (w/o) ou o óleo em água (o/w). Quando uma fase aquosa é finamente dividida em e dispersada como minúsculas gotículas em uma fase oleosa volumosa, a composição resultante é chamada de emulsão água em óleo (w/o). Alternativamente, quando uma fase oleosa é finamente dividida em e dispersada como minúsculas gotículas em uma fase aquosa volumosa, a composição resultante é chamada de uma emulsão óleo em água (o/w). Emulsões podem conter componentes adicionais além das fases dispersas, e o fármaco ativo que pode estar presente como uma solução em fase aquosa, fase oleosa ou em si como uma fase separada. Excipientes farmacêuticos como emulsionantes, estabilizantes, corantes e antioxidantes também podem estar presentes em emulsões, conforme necessário. Emulsões farmacêutica também podem ser várias emulsões que são compostas por mais de duas fases, como, por exemplo, no caso de emulsões óleo-em-água-em-óleo (o/w/o) e água-em-óleo-em-água (w/o/w). Tais formulações complexas, muitas vezes, oferecem certas vantagens que emulsões binária simples não. Emulsões múltiplas em que as gotículas de óleo individuais de uma emulsão o/w contém pequenas gotículas de água constituem uma emulsão w/o/w. Da mesma forma um sistema de gotículas de óleo contido em glóbulos de água estabilizado em uma fase contínua oleosa fornece uma emulsão o/w/o.

[00464] Emulsões são caracterizadas por pouca ou nenhuma estabilidade termodinâmica. Muitas vezes, a fase dispersa ou descontínua da emulsão é bem dispersada na fase externa ou contínua e mantida sob esta forma através dos meios de emulsionantes ou a viscosidade da formulação. Uma das fases da

emulsão pode ser uma semi-sólida ou sólida, como é o caso de bases de pomadas e cremes de estilo emulsão. Outros meios de estabilizar emulsões implica o uso de emulsificantes que podem ser incorporados em cada fase da emulsão. Os emulsificantes podem ser amplamente classificados em quatro categorias: tensoativos sintéticos, emulsificantes de ocorrência natural, bases de absorção e sólidos finamente dispersos (ver, por exemplo, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199).

[00465] Tensoativos sintéticos, também conhecido como agentes ativos de superfície, encontraram uma ampla aplicabilidade na formulação de emulsões e foram revistos na literatura (ver, por exemplo, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rieger, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 285; Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, volume 1, p. 199). Os tensoativos são tipicamente anfifílicos e compreendem uma porção hidrofílica e hidrofóbica. A razão entre a natureza hidrofílica para hidrofóbica do tensoativo tem sido chamada de equilíbrio hidrófilo/lipófilo (HLB) e é uma ferramenta valiosa na classificação e seleção de tensoativos na preparação de formulações. Tensoativos podem ser classificados em diferentes classes com base na natureza do grupo hidrofílico: não iônico, aniônico e anfotérico (ver, por exemplo, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery

Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rieger, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 285).

[00466] Emulsionantes de ocorrência natural usados em formulações de emulsão incluem lanolina, cera de abelha, fosfatidos, lecitina e acácia. Bases de absorção possuem propriedades hidrofílicas de modo que possam absorver a água para formar emulsões de w/o, mas manter a sua consistência semi-sólida, como a lanolina anidra e petrolato hidrofílico. Sólidos finamente divididos também têm sido usados como emulsificantes bons especialmente em combinação com tensoativos e em preparações viscosas. Estes incluem sólidos inorgânicos polares, como hidróxidos de metais pesados, argilas não residentes como betoína, atapulgita, hectorita, caulim, montmorilonita, silicato de alumínio coloidal e silicato de alumínio magnésio coloidal, pigmentos e sólidos apolar, como carbono ou tristearato de glicerila.

[00467] Uma grande variedade de materiais não emulsificantes também estão incluídos em formulações de emulsão e contribuem para as propriedades das emulsões. Estes incluem gorduras, óleos, ceras, ácidos graxos, álcoois graxos, ésteres graxos, umectantes, coloides hidrofílicos, conservantes e antioxidantes (Block, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 335; Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199).

[00468] Os coloides hidrofílicos ou hidrocoloides incluem gomas de ocorrência natural e de polímeros sintéticos, como polissacarídeos (por exemplo, acácia, ágar-ágar, ácido algínico, carragena, goma guar, goma de caraia, tragacanto), derivados de celulose (por exemplo,

carboximetilcelulose e carboxipropilcelulose) e polímeros sintéticos (por exemplo, carbômeros, éteres de celulose e polímeros carboxivinil). Estes dispersam ou incham em água para formar soluções coloidais que estabilizam emulsões formando filmes interfaciais fortes em torno de gotículas da fase de dispersão e aumentando a viscosidade da fase externa.

[00469] Uma vez que emulsões frequentemente contêm um número de ingredientes, como carboidratos, proteínas, esteróis e fosfatidos que podem facilmente suportar o crescimento de micróbios, estas formulações frequentemente incorporam conservantes. Conservantes comumente usados incluídos em formulações de emulsão incluem metil parabeno, propil parabeno, sais de amônio quaternário, cloreto de benzalcônio, ésteres do ácido p-hidroxibenzóico e ácido bórico. Os antioxidantes são também comumente adicionados a formulações de emulsão para evitar a deterioração da formulação. Os antioxidantes usados podem ser os removedores de radicais livres, como tocoferóis, alquil galatos, butil-hidroxianisolo, hidroxitolueno butilado, ou agentes redutores, como o ácido ascórbico e metabissulfito de sódio, antioxidante sinérgicos, como ácido cítrico, ácido tartárico e lecitina.

[00470] A aplicação de formulações de emulsão através de via dermatológica, parenteral e oral e métodos para suas fabricações foram revistas na literatura (ver, por exemplo, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199). Formulações de emulsão para aplicação oral tem sido muito usada pela facilidade de formulação, bem como a eficácia de um ponto de vista da absorção e biodisponibilidade (ver, por exemplo, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV.,

Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245; Idson, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199). Laxantes a base de óleo mineral, vitaminas solúveis em óleo e preparações com alto teor de gordura nutritivas estão entre os materiais que têm sido comumente administrados por via oral como emulsões o/w.

#### *ii Microemulsões*

[00471] Em uma modalidade da presente invenção, as composições de iRNAs e ácidos nucleicos são formuladas como microemulsões. Uma microemulsão pode ser definida como um sistema de água, óleo e anfífilo que é um isotrópico opticamente único e solução líquida termodinamicamente estável (ver, por exemplo, Ansel's *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245). Microemulsões típicas são sistemas que são preparados pela primeira dispersão de um óleo em uma solução de tensoativo aquoso e, em seguida, adicionando uma quantidade suficiente de um quarto componente, geralmente um álcool de comprimento de cadeia intermediário para formar um sistema transparente. Portanto, microemulsões também têm sido descritas como dispersões claras isotropicamente termodinamicamente estável de dois líquidos imiscíveis que são estabilizados por filmes interfaciais de moléculas ativas de superfície (Leung e Shah, em: *Controlled Release of Drugs: Polymers and Aggregate Systems*, Rosoff, M., Ed., 1989, VCH Publishers, New York, pages 185-215). As microemulsões

são comumente preparadas através de uma combinação de três a cinco componentes que incluem o óleo, água, tensoativo, cotensoativo e eletrólito. Se a microemulsão for do tipo água em óleo (w/o) ou óleo em água (o/w) é dependente das propriedades do óleo e tensoativo usado e na estrutura e embalagem geométrica das cabeças polares e caudas de hidrocarbonetos das moléculas de tensoativo (Schott, in Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 271).

[00472] A abordagem fenomenológica que usa diagramas de fases foi extensivamente estudada e produziu um conhecimento abrangente, para um versado na técnica, de como formular microemulsões (ver, por exemplo, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245; Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 335). Em relação a emulsões convencionais, as microemulsões oferecem a vantagem de solubilizar fármacos insolúveis em água em uma formulação de gotículas termodinamicamente estáveis que são formados espontaneamente.

[00473] Os tensoativos usados na preparação de microemulsões incluem, mas não estão limitados a, tensoativos iônicos, tensoativos não iônicos, Brij 96, éteres oleícos de polioxietileno, ésteres de ácidos graxos de poliglicerol, monolaurato de tetraglicerol (ML310), monooleato de tetraglicerol (MO310), monooleato de hexaglicerol (PO310), pentaoleato de hexaglicerol (PO500), monocaprato de decaglicerol (MCA750), monooleato de decaglicerol (MO750), sequioleato de decaglicerol (SO750), decaoleato de decaglicerol

(DAO750), sozinho ou em combinação com cotensoativos. O cotensoativo, geralmente um álcool de cadeia curta, como o etanol, 1-propanol, 1-butanol, serve para aumentar a fluidez interfacial penetrando no filme de tensoativo e, conseqüentemente, criando um filme desordenado por causa do vazio gerado entre as moléculas do tensoativo. Microemulsões podem, entretanto, ser preparadas sem o uso de cotensoativos e sistemas de microemulsão livre de álcool e autoemulsionante são conhecidos na técnica. A fase aquosa pode ser normalmente, mas não está limitado a, água, uma solução aquosa do fármaco, glicerina, PEG300, PEG400, poliglicerois, propileno glicóis, e derivados de etileno glicol. A fase de óleo pode incluir, mas não está limitada a, materiais como Captex 300, Captex 355, Capmul MCM, ésteres de ácidos graxos, mono, di e tri-glicerídeos de cadeia média (C8-C12), ésteres de ácidos graxos de glicerila polioxetilado, álcoois de ácidos graxos, glicerídeos poliglicolizados, glicerídeos poliglicolizados saturados C8-C10, óleos vegetais e óleo de silicone.

[00474] As microemulsões são particularmente de interesse do ponto de vista da solubilização do fármaco e a absorção melhorada dos fármacos. As microemulsões a base lipídica (ambas o/w e w/o) têm sido propostas para melhorar a biodisponibilidade oral de fármacos, incluindo peptídeos (ver, por exemplo, patente US Nos. 6.191.105; 7.063.860; 7.070.802; 7.157.099; Constantinides et al., *Pharmaceutical Research*, 1994, 11, 1385-1390; Ritschel, *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, 1993, 13, 205). As microemulsões oferecem vantagens para melhor solubilização de fármacos, proteção de fármacos de hidrólise enzimática, possível reforço da absorção de fármacos devido a alterações induzidas por tensoativo na fluidez e permeabilidade da membrana, facilidade de preparação, facilidade da administração oral sobre formas farmacêuticas sólidas, maior potência clínica e menor toxicidade (ver, por exemplo, Patente US Nos.

6.191.105; 7.063.860; 7.070.802; 7.157.099; Constantinides et al., *Pharmaceutical Research*, 1994, 11, 1385; Ho et al., *J. Pharm. Sci.*, 1996, 85, 138-143). Muitas vezes, as microemulsões podem se formar espontaneamente quando seus componentes são reunidos em temperatura ambiente. Isto pode ser particularmente vantajoso na formulação de medicamentos, peptídeos ou iRNAs termolábilis. As microemulsões também têm sido eficazes na aplicação transdérmica de componentes ativos tanto em aplicações farmacêuticas como de cosméticos. Espera-se que as composições e formulações de microemulsão da presente invenção vai facilitar o aumento da absorção sistêmica de iRNAs e ácidos nucleicos a partir do trato gastrointestinal, bem como melhorar a absorção celular local de iRNAs e ácidos nucleicos.

[00475] As microemulsões da presente invenção também podem conter componentes adicionais e aditivos como monoestearato de sorbitano (Grade 3), Labrasol, e potenciadores de penetração para melhorar as propriedades da formulação e melhorar a absorção dos iRNAs e ácidos nucleicos da presente invenção. Potencializadores de penetração usados nas microemulsões da presente invenção podem ser classificados como pertencente a uma dos cinco grandes categorias--tensoativos, ácidos graxos, sais biliares, agentes quelantes e não tensoativos não quelantes (Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p. 92). Cada uma destas classes foi discutida acima.

### *iii. Micropartículas*

[00476] Um agente de RNAi da invenção pode ser incorporado em uma partícula, como, por exemplo, uma micropartícula. Micropartículas podem ser produzida por secagem por atomização, mas também podem ser produzidas por outros métodos, incluindo liofilização, evaporação, secagem por leito fluidizado, secagem a

vácuo ou uma combinação dessas técnicas.

*iv. Intensificadores de penetração*

[00477] Em uma modalidade, a presente invenção emprega vários efeitos potenciadores de penetração para realizar a aplicação eficiente de ácidos nucleicos, particularmente iRNAs, à pele de animais. A maioria dos fármacos estão presentes na solução em ambas as formas ionizadas e não ionizadas. No entanto, normalmente só fármacos de lípidos solúveis ou lipofílicos facilmente atravessam as membranas celulares. Descobriu-se que até mesmo os fármacos não lipofílicos podem atravessar as membranas celulares se a membrana a ser atravessada for tratada com um potencializador de penetração. Além da sua contribuição para a difusão de fármacos lipofílicos através das membranas celulares, intensificadores de penetração também aumentam a permeabilidade de fármacos lipofílicos.

[00478] Intensificadores de penetração podem ser classificados como pertencente a uma das cinco grandes categorias, ou seja, tensoativos, ácidos graxos, sais biliares, agentes quelantes e não tensoativos não quelante (ver, por exemplo, Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p.92). Cada uma das classes mencionadas acima são potenciadoras de penetração descritos abaixo em maior detalhe.

[00479] Tensoativos (ou "os agentes de superfície-ativa") são entidades químicas que, quando dissolvidos em uma solução aquosa, reduzem a tensão superficial da solução ou a tensão interfacial entre a solução aquosa e outro líquido, com o resultado de que a absorção de iRNAs através da mucosa é melhorada. Além de sais biliares e de ácidos graxos, estes potenciadores de penetração incluem, por exemplo, sulfato de lauril sódio, polioxietileno-9 lauril éter e éter cetílico polioxietileno-20) (ver, por exemplo, Malmsten, M. *Surfactants and*

polymers in drug delivery, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p.92); e emulsões perfluoroquímica, como FC-43. Takahashi et al., J. Pharm. Pharmacol., 1988, 40, 252).

[00480] Vários ácidos graxos e seus derivados que agem como intensificadores de penetração incluem, por exemplo, ácido oleico, ácido láurico, ácido cáprico (ácido n-decanóico), ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoléico, ácido linolênico, dicaprato, tricaprato, monooleína (1-monooleoil-rac-glicerol), dilaurina, ácido caprílico, ácido araquidônico, glicerol 1-monocaprato, 1-dodecilazacicloheptan-2-ona, acilcarnitinas, acilcolinas, C1-20 ésteres alquílicos do mesmo (por exemplo, metila, isopropil e t-butil) e mono e di-glicerídeos dos mesmos (ou seja, oleato, laurato, caprato, miristato, palmitato, estearato, linoleato, etc) (ver, por exemplo, Touitou, E., et al. Enhancement in Drug Delivery, CRC Press, Danvers, MA, 2006; Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p.92; Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33; El Hariri et al., J. Pharm. Pharmacol., 1992, 44, 651-654).

[00481] O papel fisiológico de bile inclui a facilitação da dispersão e absorção de lípidos e vitaminas solúveis em gordura (ver, por Malmsten, M. Surfactants and polymers in drug delivery, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Brunton, Chapter 38 in: Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9ªEd., Hardman et al. Eds., McGraw-Hill, New York, 1996, pp. 934-935). Vários sais biliares naturais e seus derivados sintéticos, agem como intensificadores de penetração. Assim, o termo "sais biliares" incluem qualquer um dos componentes de ocorrência natural de bile, bem como qualquer de seus derivados sintéticos. Sais biliares adequados incluem, por exemplo, ácido cólico (ou o seu sal de sódio farmaceuticamente aceitável, colato de sódio), ácido desidrocólico

(desidrocolato de sódio), ácido deoxicólico (deoxicolato de sódio), ácido glucólico (glucolato de sódio), ácido glicólico (glicocolato de sódio), ácido glicodeoxicólico (glicodeoxicolato de sódio), ácido taurocólico (taurocolato de sódio), ácido taurodeoxicólico (taurodeoxicholato de sódio), ácido ácido quenodesoxicólico (quenodeoxicolato de sódio), ácido ursodeoxicólico (UDCA), sódio tauro-24,25-dihidro-fusidato (STDHF), glicodi-hidrofusidato de sódio e polioxietileno-9-lauril éter (POE) (ver, por exemplo, Malmsten, M. Surfactants and polymers in drug delivery, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, page 92; Swinyard, Chapter 39 In: Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990, pages 782-783; Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33; Yamamoto et al., J. Pharm. Exp. Ther., 1992, 263, 25; Yamashita et al., J. Pharm. Sci., 1990, 79, 579-583).

[00482] Agentes quelantes, como usado em relação à presente invenção, podem ser definidos como compostos que removem íons metálicos da solução, formando complexos com eles, com o resultado de que a absorção de iRNAs através da mucosa é melhorado. No que diz respeito ao seu uso como potenciadores de penetração na presente invenção, agentes quelantes têm a vantagem adicionada de também servir como inibidores de DNase, pois a maioria das nucleases de DNA caracterizadas necessitam de um íon metálico divalente para catálise e portanto são inibidas por agentes quelantes (Jarrett, J. Chromatogr., 1993, 618, 315-339). Agentes quelantes adequados incluem, mas não estão limitados a, tetraacetato de etilenodiamino (EDTA), ácido cítrico, salicilatos (por exemplo, salicilato de sódio, 5-metoxisalicilato e homovanilatos), derivados de N-acil de colágeno, Lauril-9 e derivados de N-amino acil de  $\beta$ -dicetonas

(enaminas) (ver, por exemplo, Katdare, A. et al., Excipient development for pharmaceutical, biotechnology, and drug delivery, CRC Press, Danvers, MA, 2006; Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, página 92; Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33; Buur et al., J. Control Rel., 1990, 14, 43-51).

[00483] Conforme usado neste documento, compostos potencializadores de penetração não tensoativo não quelante podem ser definidos como compostos que demonstram atividade insignificante como agentes quelantes ou como tensoativos, mas que, no entanto, melhora a absorção de iRNAs através da mucosa alimentar (ver, por exemplo, Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33). Esta classe de potenciadores de penetração inclui, por exemplo, ureas cíclicas insaturadas, derivados 1-alkil- e 1-alcenilazaciclo-alcanona (Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, página 92); e agentes não esteroides anti-inflamatórios, como diclofenaco sódico, indometacina e fenilbutazona (Yamashita et al., J. Pharm. Pharmacol., 1987, 39, 621-626).

[00484] Os agentes que melhoram a absorção de iRNAs no nível celular também podem ser adicionados à composição farmacêutica e outras composições da presente invenção. Por exemplo, lipídios catiônicos, como uma lipofectina (JUNICHI et al, U.S. pat. N° 5.705.188), derivados de glicerol catiônico e moléculas, policatiônicas, como polilisina (LOLllo et al., Pedido PCT WO 97/30731), também são conhecidos para melhorar a absorção celular de dsRNAs. Exemplos de reagentes de transfecção comercialmente disponíveis incluem, por exemplo, Lipofectamine™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), Lipofectamine 2000™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), 293fectin™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), Cellfectin™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), DMRIE-C™ (Invitrogen;

Carlsbad, CA), FreeStyle™ MAX (Invitrogen; Carlsbad, CA), Lipofectamine™ 2000 CD (Invitrogen; Carlsbad, CA), Lipofectamine™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), RNAiMAX (Invitrogen; Carlsbad, CA), Oligofectamine™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), Optifect™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), X-tremeGENE Reagente de transfecção Q2 (Roche; Grenzacherstrasse, Switzerland), Reagente de transfecção DOTAP Liposomal (Grenzacherstrasse, Switzerland), Reagente de transfecção DOSPER Liposomal (Grenzacherstrasse, Switzerland), ou Fugene (Grenzacherstrasse, Switzerland), Reagente Transfectam® (Promega; Madison, WI), Reagente de transfecção TransFast™ (Promega; Madison, WI), Reagente Tfx™-20 (Promega; Madison, WI), Reagente Tfx™-50 (Promega; Madison, WI), DreamFect™ (OZ Biosciences; Marseille, France), EcoTransfect (OZ Biosciences; Marseille, France), Reagente de transfecção TransPass<sup>a</sup> D1 (New England Biolabs; Ipswich, MA, USA), LyoVec™/LipoGen™ (Invitrogen; San Diego, CA, USA), Reagente de transfecção PerFectin (Genlantis; San Diego, CA, USA), Reagente de transfecção NeuroPORTER (Genlantis; San Diego, CA, USA), Reagente de transfecção GenePORTER (Genlantis; San Diego, CA, USA), Reagente de transfecção GenePORTER 2 (Genlantis; San Diego, CA, USA), Reagente de transfecção Citofectina (Genlantis; San Diego, CA, USA), Reagente de transfecção BaculoPORTER (Genlantis; San Diego, CA, USA), Reagente de transfecção TroganPORTER™ (Genlantis; San Diego, CA, USA), RiboFect (Bioline; Taunton, MA, USA), PlasFect (Bioline; Taunton, MA, USA), UniFECTOR (B-Bridge International; Mountain View, CA, USA), SureFECTOR (B-Bridge International; Mountain View, CA, USA), ou HiFect™ (B-Bridge International, Mountain View, CA, USA), entre outros.

[00485] Outros agentes podem ser usados para melhorar a penetração dos ácidos nucleicos administrados, incluindo glicóis, como

etileno glicol e propileno glicol, pirróis como 2-pirrol, azonas, e terpenos como limoneno e mentona.

*v. Carreadores*

[00486] Algumas composições da presente invenção também incorporam na formulação compostos carreadores. Como usado neste documento, "composto carreador" ou "carreador" pode se referir a um ácido nucleico, ou seu análogo, que é inerte (ou seja, não possuem atividade biológica per se), mas é reconhecido como um ácido nucleico por processos in vivo que reduzem a biodisponibilidade de um ácido nucleico tendo atividade biológica, por exemplo, pela degradação do ácido nucleico biologicamente ativo ou promovendo a sua retirada de circulação. A co-administração de ácido nucleico e um composto carreador, geralmente com um excesso desta substância, pode resultar em uma redução significativa da quantidade de ácido nucleico recuperado no fígado, rins ou outros reservatórios extracirculatórios, presumivelmente devido à competição entre o composto carreador e o ácido nucleico para um receptor comum. Por exemplo, a recuperação de um dsRNA fosforotioato parcialmente no tecido hepático pode ser reduzido quando ele é co-administrado com o ácido poliinosínico, o sulfato de dextrano, ácido policitídico ou 4-acetamido-4'-isotiociano-estilbeno-2,2'-ácido disulfônico (Miyao et al., DsRNA Res. Dev., 1995, 5, 115-121; Takakura et al., DsRNA & Nucl. Acid Drug Dev., 1996, 6, 177-183).

*vi. Excipientes*

[00487] Em contraste a um composto carreador, um "carreador farmacêutico" ou "excipiente" é um solvente farmacologicamente aceitável, agente de suspensão ou qualquer outro veículo farmacologicamente inerte para a aplicação de um ou mais ácidos nucleicos a um animal. O excipiente pode ser líquido ou sólido, e é selecionado com a forma de administração planejada em mente, assim

como para fornecer o volume desejado, consistência, etc, quando combinado com um ácido nucleico e os outros componentes de uma dada composição farmacêutica. Carreadores farmacêuticos típicas incluem, mas não estão limitados a, ligantes (por exemplo, amido de milho pregelatinizado, polivinilpirrolidona ou hidroxipropil metilcelulose etc.); enchimentos (por ex., lactose e outros açúcares, celulose microcristalina, pectina, gelatina, sulfato de cálcio, etil celulose, poliacrilatos ou fosfato de cálcio, etc.); lubrificantes (por exemplo, estearato de magnésio, talco, sílica, dióxido de silício coloidal, ácido esteárico, estearatos metálicos, óleos vegetais hidrogenados, amido de milho, polietileno glicóis, benzoato de sódio, acetato de sódio, etc); disintegrantes (por exemplo, amido, amido de sódio glicolato, etc); e agentes umectantes (por exemplo, lauril sulfato de sódio, etc).

[00488] Excipientes orgânicos ou inorgânicos farmacêuticamente aceitáveis adequados para administração não parenteral que não reage deletariamente com ácidos nucleicos também podem ser usados para formular as composições da presente invenção. Carreadores farmacêuticamente aceitáveis adequados incluem, mas não estão limitados a, água, soluções salinas, álcoois, polietileno glicóis, gelatina, lactose, amilose, estearato de magnésio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, hidroximetilcelulose, polivinilpirrolidona e similares.

[00489] Formulações para administração tópica de ácidos nucleicos podem incluir soluções aquosas estéreis e não estéreis, soluções não aquosas em solventes comuns como, por exemplo, álcoois, ou soluções de ácidos nucleicos em bases de óleo líquido ou sólido. As soluções também podem conter tampões, diluentes e outros aditivos adequados. Excipientes orgânicos ou inorgânicos farmacêuticamente aceitáveis adequados para administração não parenteral que não reage deletariamente com ácidos nucleicos podem ser usados.

[00490] Excipientes farmacologicamente aceitáveis adequados incluem, mas não estão limitados a, água, soluções salinas, álcoois, polietileno glicóis, gelatina, lactose, amilose, estearato de magnésio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, hidroximetilcelulose, polivinilpirrolidona e similares.

*vii. Outros componentes*

[00491] As composições da presente invenção podem conter além disso outros componentes adjunto convencionalmente encontrados em composições farmacêuticas, em seus níveis de uso estabelecidos na técnica. Assim, por exemplo, as composições podem conter outros materiais farmacologicamente compatíveis ativos, como, por exemplo, antipuriginosos, adstringentes, anestésicos locais ou agentes anti-inflamatórios, ou podem conter outros materiais úteis na formulação física diferentes formas de dosagem das composições da presente invenção, como corantes, agentes aromatizantes, conservantes, antioxidantes, agentes opacificantes, espessantes e estabilizadores. No entanto, estes materiais, quando adicionados, não devem interferir indevidamente com as atividades biológicas dos componentes das composições da presente invenção. As formulações podem ser esterilizadas e, se desejado, misturadas com agentes auxiliares, por exemplo, lubrificantes, conservantes, estabilizantes, umectantes, emulsionantes, sais para influenciar a pressão osmótica, tampões, corantes, aromatizantes e/ou substâncias aromáticas e similares que não interagem deletariamente com o(s) ácido nucleico da formulação.

[00492] Suspensões aquosas podem conter substâncias que aumentam a viscosidade da suspensão, incluindo, por exemplo, carboximetilcelulose de sódio, sorbitol e/ou dextrano. A suspensão também pode conter estabilizadores.

[00493] Em algumas modalidades, as composições farmacêuticas em destaque na invenção incluem (a) um ou mais compostos de iRNA

e (b) um ou mais agentes que funcionam por um mecanismo de RNAi e que são úteis para o tratamento de um distúrbio hemolítico. Exemplos de tais agentes incluem, mas não são limitados a um agente anti-inflamatório, agente anti-esteatose, anti-viral e/ou agente anti-fibrose. Além disso, outras substâncias comumente usadas para proteger o fígado, como silimarina, também podem ser usadas em conjunto com os iRNAs descritos aqui. Outros agentes úteis no tratamento de doenças hepáticas incluem telbivudina, entecavir e proteases inibidoras como telaprevir e outros descritos, por exemplo, em Tung et al., Pedido US nº 2005/0148548, 2004/0167116 e 2003/0144217; e em Hale et al., Pedido US nº 2004/0127488.

[00494] Toxicidade e eficácia terapêutica de tais compostos podem ser determinadas por procedimentos farmacêuticos padrão em culturas de células ou animais experimentais, por exemplo, para a determinação de LD50 (dose letal para 50% da população) e a ED50 (a dose terapeuticamente eficaz em 50% da população). A razão da dose entre os efeitos tóxicos e terapêuticos é o índice terapêutico e pode ser expressado como a razão entre LD50/ED50. Os compostos que apresentam altos índices terapêuticos são os preferidos.

[00495] Os dados obtidos a partir de ensaios de cultura de células e de estudos com animais podem ser utilizados na formulação de uma gama de dosagem para uso em seres humanos. A dosagem das composições destacadas aqui na invenção reside geralmente dentro de uma gama de concentrações circulantes que incluem ao ED50 com pouca ou nenhuma toxicidade. A dosagem pode variar dentro dessa faixa dependendo da forma de dosagem utilizada e da via de administração utilizada. Para qualquer composto usado no método da invenção, a dose terapeuticamente eficaz pode ser estimada inicialmente a partir de ensaios de cultura de células. Uma dose pode ser formulada em modelos animais para atingir uma faixa de

concentração plasmática circulante do composto ou, quando apropriado, do produto de polipeptídeo da sequência-alvo (por exemplo, alcançando a concentração decrescente do polipeptídeo) que inclui o ISERPINC10 (ou seja, a concentração do composto de ensaio que atinge uma meia-inibição máxima dos sintomas) conforme determinado na cultura de células. Tais informações podem ser usadas para determinar com precisão as doses mais útil em humanos. Níveis no plasma podem ser medidos, por exemplo, por cromatografia líquida de alta eficiência.

[00496] Além de sua administração, como discutido acima, a iRNAs em destaque na invenção podem ser administrados em combinação com outros agentes conhecidos eficazes no tratamento de processos patológicos mediados pela expressão de SERPINC1. Em qualquer caso, o médico da administração pode ajustar a quantidade e a sincronização da administração de iRNA com base nos resultados observados usando medidas padrão de eficácia conhecidas na técnica ou descritas neste documento.

## **VI. Kits**

[00497] A presente invenção também fornece kits para realizar qualquer um dos métodos da invenção. Esses kits incluem um ou mais agente(s) de RNAi e as instruções de uso, por exemplo, instruções para a administração de uma quantidade eficaz de forma profilática ou terapêutica de um agente(s) de RNAi. Os kits podem opcionalmente incluir também meios para administrar o agente de RNAi (por exemplo, um dispositivo de injeção), ou meios para medir a inibição de Serpinc1 (por exemplo, meios para medir a inibição de mRNA de Serpinc1, proteína de Serpinc1, e/ou atividade de Serpinc1). Tais meios para medir a inibição de Serpinc1 podem incluir um meio para a obtenção de uma amostra de um indivíduo, como, por exemplo, uma amostra de plasma. Os kits da invenção podem opcionalmente

incluir outros meios para determinar a quantidade terapêuticamente ou profilaticamente eficaz.

[00498] A menos que definidos de outra forma, todos os termos técnicos e científicos utilizados aqui terão o mesmo significado que normalmente entendido pelo versado na técnica a que a presente invenção pertence. Embora métodos e materiais semelhantes ou equivalentes aos descritos neste documento possam ser utilizados na prática ou teste dos iRNAs e métodos da presente invenção, os métodos e os materiais adequados são descritos abaixo. Todas as publicações, pedidos de patentes, patentes e outras referências aqui mencionadas são incorporadas aqui por referência em sua totalidade. Além disso, os materiais, métodos e exemplos são apenas ilustrativos e não se destinam a ser limitantes.

## EXEMPLOS

[00499] **Tabela 1:** Abreviações de monômeros de nucleotídeo usadas na representação da sequência de ácido nucleico. Será entendido que esses monômeros, quando presentes em um oligonucleotídeo, são mutuamente ligados por ligações 5'-3'-fosfodiéster).

Abreviação	Nucleotídeo(s)
A	Adenosina-3'-fosfato
Af	2'-fluoroadenosina-3'-fosfato
Afs	2'-fluoroadenosina-3'-fosforotioato
As	Adenosina-3'-fosforotioato
C	Citidina-3'-fosfato
Cf	2'-fluorocitidina-3'-fosfato
Cfs	2'-fluorocitidina-3'-fosforotioato
Cs	Citidina-3'-fosforotioato
G	Guanosina-3'-fosfato
Gf	2'-fluoroguanosina-3'-fosfato

<b>Abreviação</b>	<b>Nucleotídeo(s)</b>
Gfs	2'-fluoroguanosina-3'-fosforotioato
Gs	Guanosina-3'-fosforotioato
T	5'-metiluridina-3'-fosfato
Tf	2'-fluoro-5-metiluridina-3'-fosfato
Tfs	2'-fluoro-5-metiluridina-3'-fosforotioato
Ts	5'-metiluridina-3'-fosforotioato
U	Uridina-3'-fosfato
Uf	2'-fluorouridina-3'-fosfato
Ufs	2'-fluorouridina -3'-fosforotioato
Us	uridina-3'-fosforotioato
N	Qualquer nucleotídeo (G, A, C, T ou U)
a	2'-O-metilaadenosina-3'-fosfato
as	2'-O-metilaadenosina-3'-fosforotioato
c	2'-O-metilacitidina-3'-fosfato
cs	2'-O-metilacitidina-3'-fosforotioato
g	2'-O-metilaguanosina-3'-fosfato
gs	2'-O-metilaguanosina-3'-fosforotioato
t	2'-O-metila-5-metiluridina-3'-fosfato
ts	2'-O-metila-5-metiluridina-3'-fosforotioato
u	2'-O-metilauridina-3'-fosfato
us	2'-O-metilauridina-3'-fosforotioato
s	Acoplamento fosforotioato
L96	N-[tris(GalNAc-alkuil)-amidodecanoil]-4-hidroxi-prolinol Hyp-(GalNAc-alkuil) <sub>3</sub>

**Exemplo 1: Administração de uma dose única de AT3SC-001 para indivíduos humanos saudáveis**

[00500] Vinte e quatro voluntários humanos sadios, em coortes de

3:1 (ativo:placebo), foram administrados com uma dose única de 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,6 mg/kg ou 1,0 mg/kg de AT3SC-001 (Senso (5' a 3'): GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAfL96 (SEQ ID NO:13); Antissenso (5' a 3'): usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg (SEQ ID NO:14)). As amostras de plasma foram coletadas nos dias 0, 1, 2, 3, 7, 10, 14, 21, 28, 42, 56 e 70 após a administração para monitorar os níveis de proteína AT, atividade AT, e duração do silenciamento de proteínas AT. Os níveis de proteína AT foram monitorados usando ELISA e níveis de atividade AT foram monitorados pela geração de curvas de geração da trombina usando Trombinoscópio automático calibrado (fator tecidual = 1pM). Mudança da dobra no pico de trombina foi calculado em relação ao valor do pico médio de trombina para dois pré-valores de dose para cada indivíduo.

[00501] Não houve eventos adversos graves, 3 eventos adversos leves que não foram provavelmente relacionados com a administração do agente, e 1 evento adverso leve (dor de cabeça) que era potencialmente relacionado com a administração do agente. Também não houve reações no local de injeção e o exame físico, sinais vitais, e eletrocardiogramas de todos os indivíduos estavam dentro dos limites normais. Além disso, todos os testes de função do fígado, níveis de bilirrubina total, razão normalizada internacional do tempo de protrombina (PT/INR), contagem de plaquetas, níveis de hemoglobina, e testes de coagulação (ou seja, tempos de tromboplastina parcial ativada (APTT), tempos de protrombina (PT), níveis de fibrinogênio, e níveis de D-dímero de fibrina) de todos os indivíduos não se alteraram durante o curso do estudo e estavam dentro dos limites normais.

[00502] As Figuras 1A - D e 2A- B mostram que uma dose única de 0,03 mg/kg de AT3SC-001 resulta em aproximadamente 20% e até 33% de redução nos níveis de proteína AT (Figuras 2A e 2B) e uma redução correspondente na atividade AT (Figuras 1A - D) com uma

durabilidade de redução de mais de 60 dias.

[00503] A Figura 3 demonstra ainda que existe uma associação significativa entre a nocaute de AT e geração do pico de trombina. Especificamente, até 152% de aumento no pico de geração de trombina foi observado, com uma média de aumento máximo do pico de trombina  $138\% \pm 8,9\%$  (média  $\pm$  EPM). Além disso, e consistente com um aumento da geração de trombina com aumento de nocaute, os níveis do Fator VIII ou IX foram normais.

### **Exemplo 2: Administração de doses múltiplas de AT3SC-001 para os pacientes humanos com hemofilia A ou B**

#### Fase I - Partes B, C, e D do estudo clínico

[00504] Na parte B de um estudo clínico de Fase I de AT3SC-001 (Senso (5' a 3'): GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAfL96 (SEQ ID NO:13); Antissenso (5' to 3'): usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg (SEQ ID NO:14)), três pacientes com hemofilia A (n=2) ou B (n=1) foram administrados por via subcutânea, 0,015 mg/kg por semana durante três semanas (15 microgramas/kg uma vez por semana x 3; 15 mcg/kg) de AT3SC-001; seis pacientes com hemofilia A foram administrados por via subcutânea, 0,045 mg/kg por semana durante três semanas (45 microgramas/kg uma vez por semana x 3; 45 mcg/kg) de AT3SC-001; e três pacientes com hemofilia A (n=2) ou B (n=1) foram administrados por via subcutânea, 0,075 mg/kg por semana durante três semanas (75 microgramas/kg uma vez por semana x 3; 75 mcg/kg) de AT3SC-001.

[00505] Na parte C de um estudo clínico de Fase I de AT3SC-001 (Senso (5' to 3'): GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAfL96 (SEQ ID NO:13); Antissenso (5' a 3'): usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg (SEQ ID NO:14)), três pacientes com hemofilia A (n=2) ou B (n=1) foram administrados por via subcutânea, uma dose mensal de 0,225

mg/kg de AT3SC-001 por três meses (225 microgramas/kg qm x 3; 225 mcg/kg); três pacientes com hemofilia A (n=2) ou B (n=1) foram administrados por via subcutânea, uma dose mensal de 0,450 mg/kg de AT3SC-001 por três meses (450 microgramas/kg qm x 3; 450 mcg/kg); três pacientes com hemofilia A foram administrados por via subcutânea, uma dose mensal de 0,900 mg/kg de AT3SC-001 por três meses (900 microgramas/kg qm x 3; 900 mcg/kg); três pacientes com hemofilia A foram administrados por via subcutânea, uma dose mensal de 1,800 mg/kg de AT3SC-001 por três meses (1800 microgramas/kg x 3; 1800 qm mcg/kg); e seis pacientes com hemofilia A (n=3) ou B (n=3) foram administrados por via subcutânea uma dose fixa mensal de 80 mg de AT3SC-001 por três meses (80 mg qM x 3).

[00506] Na parte D de um estudo clínico de Fase I de AT3SC-001 (Senso (5' a 3'): GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAfL96 (SEQ ID NO:13); Antissenso (5' to 3'): usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg (SEQ ID NO:14)), seis pacientes com hemofilia A (n=5) ou B (n=1) e usando os agentes de desvio (BPAs) para gerenciamento de hemorragia foram administrados com uma dose fixa de 50 mg de AT3SC-001 mensalmente por três meses (50 mg qM x 3); e 10 pacientes com hemofilia A e usando agentes de desvio (BPAs) para gerenciamento de hemorragia foram administrados com uma dose fixa de 80 mg de AT3SC-001 mensalmente por três meses (80 mg qM x 3).

[00507] As amostras de plasma foram coletadas após administração de AT3SC-001 para monitorar os níveis de proteína AT, atividade AT, e a duração da proteína AT. Os níveis de proteína AT foram monitorados usando ELISA e níveis de atividade AT foram monitorados pela geração de curvas de geração da trombina usando Trombinoscópio automático calibrado (fator tecidual = 1pM). Mudança da dobra no pico de trombina foi calculado em relação ao valor do pico

médio de trombina para dois pré-valores de dose para cada indivíduo.

[00508] Os dados demográficos e as características basais dos pacientes que participam nas partes B, C, e D do estudo são fornecidos na Tabela 2.

**Tabela 2. Características demográficas e de nível basal dos participantes do estudo**

	Parte B subcutânea Semanalmente x 3			Parte C subcutânea Mensalmente x 3					Parte D subcutânea Mensalmente x 3	
	15 mcg/kg N = 3	45 mcg/kg N = 6	75 mcg/kg N = 3	225 mcg/kg N = 3	450 mcg/kg N = 3	900 mcg/kg N = 3	1800 mcg/kg N = 3	80 mg N = 6	50 mg N = 6	80 mg N = 10
Idade, média (DP)	28 (9)	42 (14)	40 (4)	37 (21)	37 (15)	38 (16)	46 (12)	32 (12)	32 (7)	37
Hemofilia A Hemofilia B	2 1	6 0	2 1	2 1	2 1	3 0	3 0	3 3	5 1	10 0
Grave Moderada	3 0	6 0	3 0	2 1	3 0	2 1	3 0	5 1	6 0	10 0
Peso (kg), média (DP)	76 (10)	80 (22)	82 (8)	85 (12)	76 (16)	76 (2)	71 (12)	74 (10)	73 (17)	73
Histórico médico para hepatite C									3	9

197/216

[00509] Para as partes B, C, e D do estudo, não houve eventos adversos sérios, nenhuma descontinuação, sem reações do local de injeção e o exame físico, sinais vitais, e eletrocardiograma de todos os pacientes estavam dentro dos limites normais. Além disso, todos os testes de função hepática e hemograma completo de todos os pacientes não mudaram durante o curso do estudo e estavam dentro dos limites normais. Também não tiveram eventos tromboembólicos durante o curso do estudo e nenhum aumento clinicamente significativo do nível do D-dímero de fibrina em nenhum dos pacientes. Quaisquer casos hemorrágicos foram administrados com sucesso com o fator de substituição padrão ou administração do agente de desvio. Além disso, não havia casos de formação de anticorpo antifármaco (ADA).

[00510] O nocaute em níveis AT nas coortes 15 mcg/kg, 45 mcg/kg e 75 mcg/kg, mostrado como um nocaute de AT médio em relação à linha de base, está representado na Figura 4. A Figura 4 demonstra que doses semanais de 0,015 mg/kg por três semanas no AT3SC-001 resulta em um nocaute de AT máximo médio de  $29\% \pm 12\%$  (média  $\pm$  EPM). O nocaute de AT máximo foi de até 53%. A Figura 4 também mostra que doses semanais de 0,045 mg/kg por três semanas de AT3SC-001 resulta em um nocaute de AT máximo médio de  $55 \pm 9\%$  (média  $\pm$  EPM) e um nocaute de AT máximo de 86%. Além disso, a Figura 4 também demonstra que doses semanais de 0,075 mg/kg por três semanas no AT3SC-001 resulta em um nocaute de AT máximo médio de  $61 \pm 8\%$  (média  $\pm$  EPM) e um nocaute de AT máximo de 74%.

[00511] O nocaute em níveis AT nas coortes 225 mcg/kg, 450 mcg/kg, 900 mcg/kg, 1800 mcg/kg e 80 mg, mostrado como um nocaute de AT médio em relação à linha de base, está representado na Figura 5A. A Figura 5A demonstra que doses

mensais de 0,225 mg/kg por três meses no AT3SC-001 resulta em um nocaute de AT máximo médio de  $70\% \pm 9\%$  (média  $\pm$  EPM). O nocaute de AT máximo foi de até 80%. A Figura 5A também mostra que doses mensais de 0,450 mg/kg por três meses de AT3SC-001 resulta em um nocaute de AT máximo médio de  $77 \pm 5\%$  (média  $\pm$  EPM) e um nocaute de AT máximo de 85%. Além disso, a Figura 5A também demonstra que doses mensais de 0,900 mg/kg por três meses no AT3SC-001 resulta em um nocaute de AT máximo médio de  $78 \pm 7\%$  (média  $\pm$  EPM) e um nocaute de AT máximo de 88%. Além disso, a Figura 5A também demonstra que doses mensais de 1,800 mg/kg por três meses no AT3SC-001 resulta em um nocaute de AT máximo médio de  $79 \pm 3\%$  (média  $\pm$  EPM) e um nocaute de AT máximo de 84%. A Figura 5A também demonstra que doses mensais de 80 mg por três meses no AT3SC-001 resulta em um nocaute de AT máximo médio de  $87\% \pm 1\%$  (média  $\pm$  EPM).

[00512] Como demonstrado na Figura 5B, que faz o gráfico da dose de AT3SC-001 versus o nadir relativo de níveis de proteína AT, a administração da AT3SC-001 para pacientes humanos reduz os níveis de proteína AT de modo dose dependente.

[00513] A avaliação da geração de trombina em voluntários humanos sadios (Exemplo 1) e pacientes com hemofilia A ou B demonstraram que doses semanais de AT3SC-001 resultou em até 334% de aumento (em relação à avaliação inicial) na geração de trombina em pacientes hemofílicos com um aumento médio na geração de trombina  $112 \pm 38\%$  ( $p < 0,05$ ), em relação à avaliação inicial quando foi nocauteado por  $\geq 50\%$  (Figura 6B). A Figura 6A demonstra que o pico máximo de trombina alcançado em pacientes com hemofilia A ou B, administrado em doses semanais de AT3SC-001 estava na faixa baixa de geração de trombina em indivíduos normais.

[00514] Análise Tromboelastometria ROTEM® (ver, por exemplo, Young, et al. (2013) Blood 121:1944) do sangue total de um indivíduo (indivíduo 101-009) demonstra que a administração de AT3SC-001 a 0,045 mg/kg semanalmente durante três semanas não só resulta em um aumento no pico de geração de trombina, mas também resulta em uma acentuada e duradoura melhoria na formação de coágulos de sangue, como demonstrado por uma diminuição do tempo de formação do coágulo e tempo de coagulação (Figura 7). O indivíduo 101-009 não teve nenhum evento hemorrágico desde o dia 2 e está atualmente 47 dias sem hemorragias.

[00515] Uma análise post-hoc de geração da trombina para reduzir os quartis de AT (Partes B e C) demonstra que, com no quartil com a maior redução de AT (> 75% de redução AT), há um aumento de 289% na geração da trombina média em relação à avaliação inicial (Figura 9). O nível da geração de trombina está dentro da faixa da geração de trombina observada em voluntários saudáveis.

[00516] Um sub-estudo de três pacientes explorou a equivalência da administração de AT3SC-001 e a administração do Fator VIII. Brevemente, o Fator VIII foi administrado a cada um dos três pacientes e o plasma foi coletado dos pacientes a -0,5, 1, 2, 6, 24 e 48 horas após a administração. As amostras de cada um dos indivíduos foram analisadas os níveis de Fator VIII e níveis de geração de trombina e usadas para estabelecer relacionamentos individualizados do pico de geração de Fator VIII- trombina. Estes dados foram então usados para comparação com os níveis do pico de geração de trombina alcançados com a administração de AT3SC-001. Como mostrado nas Figuras 10A-10C, a administração de AT3SC-001 é suficiente para alcançar níveis do pico de geração de trombina no indivíduo para cerca do mesmo nível alcançado pela administração ao indivíduo do Fator VIII e suficiente para alcançar níveis de pico de geração de trombina maior

que cerca de 40% no indivíduo.

[00517] Uma análise post-hoc dos eventos hemorrágicos pela redução de AT em quartis (Partes B e C) demonstra que existe uma tendência de hemorragia reduzida com o aumento dos níveis da redução de AT, com uma taxa de hemorragia média anual estimada (ABR) de  $5 \pm 2$  (média = 1) no quartil de maior redução de AT (Figura 11). Esta análise inclui mais de 1100 dias acumulados com a redução de AT >75% em 16 pacientes.

[00518] Uma análise post-hoc de eventos hemorrágicos na coorte da Parte C também foi realizada. A Figura 12 apresenta os dados do paciente usados para esta análise. Como demonstrado na Figura 13A, a média histórica ABR para todos os pacientes inscritos na coorte C e recebendo fatores de substituição profiláticos (PPx) foi de 2 e a média histórica ABR para todos os pacientes inscritos na coorte C e recebendo fatores de substituição em demanda (OD) foi de 28. A administração de AT3SC-001 a estes pacientes resultou em uma redução significativa na ABR média. Em específico, a administração de AT3SC-001 resultou em uma média de 53% dos pacientes não relataram sangramento durante o período de observação (dia 29 para a última visita de estudo ou a última dose + 56 dias, qual for mais cedo) e uma média de 82% dos pacientes não relataram sangramento espontâneo durante o período de observação. A Figura 13B mostra que, para os pacientes que receberam doses de 80 mg mensal de AT3SC-001 na coorte C e receberam fatores de substituição profiláticos (PPx), o ABR histórico médio foi de 6. Após a administração de AT3SC-001, no entanto, o ABR médio durante o período de observação foi de 0.

[00519] A parte D do estudo de Fase I avaliou o efeito da administração de AT3SC-001 em pacientes com hemofilia A ou B que desenvolveram anticorpos (inibidores) contra os fatores de substituição

dados a eles e, assim, tornam-se refratários à substituição de fatores de coagulação. Conseqüentemente, a fim de avaliar o pico de resposta de trombina destes pacientes, antes da administração de AT3SC-001, os pacientes inscritos na coorte de 50 mg foram administrados com seu agente de desvio padrão (BPA) (por exemplo, concentrado de complexo de protrombina ativada (APCC) e/ou FVII ativado recombinante (rFVIIa)), as amostras de plasma foram coletadas em 1, 2, 6 e 24 horas após a administração do BPA, e as amostras foram analisadas para a geração da trombina. Como mostrado nas Figuras 14A-14F, a redução de AT e a geração da trombina em pacientes inibidores administrados com AT3SC-001 são comparáveis à redução de AT e à geração da trombina observada após a administração de AT3SC-001 com doses semelhantes em pacientes não inibidores. Além disso, as Figuras 14A-14F demonstram que a geração da trombina após administração de AT3SC-001 consistentemente excede níveis temporários alcançados com a administração de BPA.

[00520] Como demonstrado na Figura 15, a dosagem subcutânea uma vez por mês de AT3SC-001 a 50 mg e 80 mg alcança a redução de AT dose-dependente de cerca de 80% em pacientes hemofílicos com inibidores. Além disso, como demonstrado na Figura 16, o efeito de redução de AT alcançado em pacientes administrados com AT3SC-001 está associado com aumento da geração de trombina.

[00521] Uma análise post-hoc exploratória de eventos hemorrágicos em pacientes na Parte D do estudo também foi realizada. A Figura 17A mostra que a administração da AT3SC-001 para pacientes inibidores com hemofilia A ou B uma vez por mês na dose de 50 mg ou 80 mg resulta em uma redução significativa no pré-estudo do ABR. Além disso, como demonstrado na Figura 17B, a taxa de hemorragia anual média (ABR) é zero para todos os pacientes inibidores

administrados com AT3SC-001 na parte D desse estudo de Fase I, e 56% dos pacientes estão livres de hemorragia, e 69% dos pacientes experimentaram zero hemorragia espontânea.

[00522] Em resumo, AT3SC-001 é bem tolerado em pacientes com hemofilia A e B com e sem inibidores. Não houve SAEs relacionados com o medicamento em estudo e sem eventos tromboembólicos. Os dados demonstram que há atividade clínica e correção do fenótipo de hemofilia em pacientes não inibidores. Os dados demonstram ainda que há redução de AT dose-dependente e aumento da geração de trombina, com regime posológico subcutâneo uma vez por mês e que a administração de uma dose fixa de 50 mg ou 80 mg de AT3SC-001 fornece redução de AT consistente de aproximadamente 80%.

[00523] Além disso, os dados mostram que a administração da AT3SC-001 para pacientes inibidores resulta na redução de AT e aumento da geração de trombina consistente com pacientes não inibidores e que a geração da trombina aumenta consistentemente ultrapassa os alcançados temporariamente com a administração de BPA.

**[00524] Exemplo 3: Administração de doses múltiplas de AT3SC-001 para os pacientes humanos com hemofilia A ou B**

Estudo clínico de extensão aberto (OLE) de Fase II

[00525] No estudo OLE de Fase II de AT3SC-001 (Senso (5' a 3'): GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAfL96 (SEQ ID NO:13); Antissenso (5' a 3'): usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg (SEQ ID NO:14)), pacientes com ou sem inibidores anteriormente administrados AT3SC-001 em ensaios clínicos de Fase I, Parte B e C descritos acima, foram elegíveis para ser inscritos em um estudo de extensão aberto (OLE) de Fase II. Quinze pacientes do estudo de Fase I Parte B com hemofilia A ou B sem inibidores que foram administrados subcutaneamente com 0,015 mg/kg por semana

durante três semanas (15 microgramas/kg uma vez por semana x 3; 15 mcg/kg) de AT3SC-001; ou foi administrado com 0,045 mg/kg por semana durante três semanas (45 microgramas/kg uma vez por semana x 3; 45 mcg/kg) de AT3SC-001; ou foi administrado com 0,075 mg/kg por semana durante três semanas (75 microgramas/kg uma vez por semana x 3; 75 mcg/kg) de A3SC-001; e 18 pacientes do estudo de Fase I Parte C com hemofilia A ou B sem inibidores foram administrados subcutaneamente com uma dose mensal de 0,225 mg/kg de AT3SC-001 por três meses (225 microgramas/kg qm x 3; 225 mcg/kg), ou foram administrados subcutaneamente com uma dose mensal de 0,450 mg/kg de AT3SC-001 por três meses (450 microgramas/kg qm x 3; 450 mcg/kg); ou foram administrados subcutaneamente com uma dose mensal de 0,900 mg/kg de AT3SC-001 por três meses (900 microgramas/kg qm x 3; 900 mcg/kg); ou foram administrados subcutaneamente com uma dose mensal de 1,800 mg/kg de AT3SC-001 por três meses (1800 microgramas/kg qm x 3; 1800 mcg/kg); ou foram administrados com uma dose fixa mensal de 80 mg de AT3SC-001 por três meses (80 mg 3 x qM); e 16 pacientes do estudo de Fase I Parte D tendo hemofilia A ou B com inibidores que foram administrados subcutaneamente com uma dose fixa mensal de 50 mg de AT3SC-001 por três meses (50 mg qM x 3); ou foram administrados subcutaneamente com uma dose fixa mensal de 80 mg de AT3SC-001 por três meses (80 mg qM x 3) eram elegíveis para ser inscritos no presente estudo.

[00526] Trinta e três pacientes foram incluídos neste estudo com 29 pacientes continuando o estudo e 5 pacientes em descontinuação (4 devido à retirada do consentimento e 1 devido a AE). Dez pacientes com hemofilia A (n=7) ou hemofilia B (n=3) sem inibidores foram administrados subcutaneamente com uma dose fixa de 50 mg de AT3SC-001 mensalmente por três meses (50 mg qM x 3); e 9

pacientes com hemofilia A (n=7) ou hemofilia B (n=2) sem inibidores foram administrados com uma dose fixa de 80 mg de AT3SC-001 mensalmente por três meses (50 mg qM x 3). Da mesma forma, 3 pacientes com hemofilia A (n=3) com inibidores foram administrados subcutaneamente a uma dose fixa de 50 mg de NAT3SC-001 mensalmente por três meses (50 mg qM x 3); e 11 pacientes com hemofilia A (n=11) ou hemofilia B (n=1) com inibidores foram administrados subcutaneamente com uma dose fixa de 80 mg de AT3SC-001 mensalmente por três meses (50 mg qM x 3). Os dados demográficos, características basais e a duração da exposição ao AT3SC-001 dos pacientes incluídos neste estudo estão apresentados na Tabela 3 abaixo.

**Tabela 3. Características demográficas e de nível basal dos participantes do estudo**

	Pacientes sem inibidores		Pacientes com inibidores	
	50 mg <sup>†</sup> N = 10	80 mg <sup>†</sup> N = 9	50 mg <sup>†</sup> N = 3	80 mg <sup>†</sup> N = 11
Idade, anos; média (intervalo)	36 (19 – 61)	40 (24 – 58)	31 (22 – 36)	34 (21 – 41)
Peso, kg; média (intervalo)	78 (58 – 94)	73 (58 – 80)	82 (70 – 100)	72 (52 – 108)
Hemofilia A	7	7	3	10
Hemofilia B	3	2	-	1
Grave	9	7	3	11
Moderada	1	2	-	-
Histórico médico positivo para hepatite C	8	8	2	9
Exposição, meses; média (intervalo)	13 (5 – 20)	14 (3 – 18)	11 (5 – 12)	6 (0 – 12)

[00527] AT3SC-001 foi geralmente bem tolerado em pacientes sem inibidores no OLE de Fase II. Seis pacientes relataram efeitos adversos sérios (EASs) com 2 EASs considerados possivelmente relacionados com a administração da AT3SC-001; um indivíduo com infecção pelo HCV crônica experimentou elevação de ALT e AST e posteriormente descontinuou o estudo, e um indivíduo com uma história de distúrbio de epilepsia sofreu uma convulsão com confusão no paciente. Não houve eventos tromboembólicos ou evidência laboratorial de formação de coágulo patológico. A maioria dos eventos adversos (EAs) foram de gravidade leve ou moderada, e não relacionados à administração de AT3SC-001. Aumentos de alanina aminotransferase (ALT) assintomática mais que 3 vezes o limite superior da normalidade (ULN), sem elevações simultâneas de bilirrubina maior que  $2 \times$  ULN, foram observados em 11 pacientes, todos os quais têm uma história médica de infecção por hepatite C. Todos os casos hemorrágicos foram administrados com sucesso com o fator de substituição ou o agente de desvio. Além disso, não havia casos de formação de anticorpo antifármaco (ADA).

[00528] As Figuras 18, 19A e 19B demonstram ainda a atividade clínica da administração de AT3SC-001. Especificamente, como demonstrado na Figura 18, dosagem subcutânea uma vez por mês de AT3SC-001 a 80 mg consistentemente alcançou a redução de AT. Como demonstrado na Figura 19A, dosagem subcutânea uma vez por mês de AT3SC-001 a 50 mg ou 80 mg alcançou a redução dose-dependente de AT de ~80% com baixa variabilidade inter-paciente e, como demonstrado na Figura 19B, dosagem subcutânea uma vez por mês de AT3SC-001 a 50 mg ou 80 mg alcançou os níveis de geração de trombina próximos da extremidade inferior da faixa normal.

[00529] Uma análise post-hoc exploratória de eventos hemorrágicos em pacientes inibidores e não inibidores no estudo OLE de Fase II

também foi realizada. A Figura 20A mostra que a administração de AT3SC-001 para pacientes com hemofilia A ou B, sem inibidores uma vez por mês na dose de 50 mg ou 80 mg resulta em uma redução significativa no pré-estudo do ABR e a Figura 20B mostra que a administração de AT3SC-001 para pacientes com hemofilia A ou B com inibidores uma vez por mês na dose de 50 mg ou 80 mg resulta em uma redução significativa no pré-estudo do ABR. Resumindo os ABRs médios em todos os pacientes que participam no estudo de OLE, 48% (16/33) dos pacientes não estavam sangrando durante o período de observação e o ABR médio durante o período de observação foi de 1. Além disso, 67% dos pacientes não relataram sangramentos espontâneos durante o período de observação e, de um modo geral, os ABRs durante o período de observação foi de 0. As características dos eventos hemorrágicos experimentados por pacientes com e sem inibidores durante o estudo OLE são mostradas na Figura 21. Os eventos hemorrágicos nos indivíduos foram avaliados quando a redução de antitrombina foi  $\geq 75\%$ .

[00530] A Figura 22 apresenta os detalhes da gestão dos eventos hemorrágicos experimentados por pacientes com hemofilia A ou B sem inibidores e a Figura 23 apresenta os detalhes da gestão dos eventos hemorrágicos experimentado por pacientes com hemofilia A ou B com inibidor. Surpreendentemente, indivíduos com hemofilia tipo A ou B sem inibidores e pacientes com hemofilia A ou B com inibidores administrados com AT3SC-001 uma vez mensalmente na dose de 50 mg ou 80 mg e que experimentaram um evento hemorrágico necessitaram de doses significativamente menores de fatores de substituição ou de agente de desvio em comparação com a dose recomendada para tratar a hemorragia, por exemplo, uma dose menor de Fator VIII ou uma dose menor de aPCC.

[00531] Em resumo, AT3SC-001 foi geralmente bem tolerado em

pacientes com hemofilia A e B com e sem inibidores. Além disso, os dados mostram que AT3SC-001 tem atividade clínica em que a dosagem subcutânea uma vez por mês a 50 mg e 80 mg alcança a redução de AT dose-dependente de ~80% com baixa variabilidade inter-paciente e os níveis de geração da trombina próximos da extremidade inferior da faixa normal. Além disso, análise post-hoc exploratória de eventos hemorrágicos em pacientes com hemofilia A ou B com ou sem inibidores demonstra que a administração de AT3SC-001 reduziu o ABR médio de 1 e a taxa de hemorragia anual média (ABR) média para zero. Dezesesseis dos trinta e três (48%) pacientes estavam livres de sangramento e vinte e dois dos trinta e três (67%) pacientes apresentaram zero sangramentos espontâneos durante o período de observação. Todos os casos hemorrágicos foram administrados com sucesso com o fator de substituição ou o agente de desvio.

**Exemplo 4: Diretrizes de dosagem de gerenciamento hemorrágico atualizadas: Redução da dose do fator de substituição/agente de desvio**

[00532] Os dados obtidos a partir dos estudos de OLE de Fase I e Fase I/II, apresentados acima, demonstram que, uma vez que a dosagem de subcutânea mensal de uma dose fixa de 50 mg ou 80 mg de AT3SC-001 fornece redução consistente de aproximadamente 80% e que há redução de AT dose-dependente e aumento da geração da trombina em indivíduos com hemofilia tipo A ou B, com e sem inibidores.

[00533] Dados modelagem in silico suportam estas observações, prevendo que há a geração da trombina reforçada em resposta à redução em níveis de AT, incluindo, em algumas modalidades, a diminuição nos níveis de AT de cerca de 75% ou menos. Os dados obtidos a partir de amostras de plasma de pacientes com hemofilia A e

B, com e sem inibidores, mostra respostas de geração da trombina aprimorada para fatores de substituição e agentes de desvio seguido de dosagem a pacientes com AT3SC-001. Além disso, os dados clínicos demonstram que os pacientes com hemofilia A ou B sem inibidores (Figura 22) e pacientes com hemofilia A ou B com inibidores (Figura 23) administrados com AT3SC-001 uma vez mensalmente na dose de 50 mg ou 80 mg e que apresentaram um caso de hemorragia usando doses menores de fatores de substituição ou agente de desvio em comparação com a dose recomendada para o tratamento de uma sangramento, por exemplo, uma dose menor de Fator VIII, ou uma dose menor de Fator IX, ou uma dose menor de Fator IX de meia-vida prolongada, ou uma dose menor do Fator VII recombinante, ou uma dose menor de aPCC.

[00534] Os dados adicionais de gerenciamento hemorrágico clínico apresentados nas Figuras 24A-24D demonstram ainda sucesso no tratamento das hemorragias em indivíduos administrados com AT3SC-001 com menores quantidades de fator de substituição ou agente de desvio.

[00535] Assim, os dados apresentados aqui suportam a administração de doses menores de fator de substituição ou agente de desvio para indivíduos administrados com AT3SC-001, ou seja, administrados com uma dose subcutânea fixa mensal de 50 mg ou 80 mg, por exemplo, onde a administração do agente dsRNA para o indivíduo reduz a atividade de Serpinc1 por cerca de 75% ou mais. Portanto, conforme estabelecido na Tabela 4, as orientações para o gerenciamento de hemorragia em indivíduos recebendo uma dose subcutânea mensal de 50 mg ou 80 mg de NAT3SC-001 foram atualizadas e tal sangramento será gerida usando doses menores de fator de substituição ou agente de desvio.

[00536] Por exemplo, a quantidade eficaz recomendada do fator de

substituição (Fator VIII) para tratar uma hemorragia, por exemplo, uma hemorragia moderada ou uma grande hemorragia, em um indivíduo com hemofilia A, sem inibidores, é de cerca de 30 a 50 UI/kg. No entanto, uma hemorragia, por exemplo, uma hemorragia moderada ou uma grande hemorragia, em um indivíduo com hemofilia tipo A e administrado com uma dose subcutânea fixa mensal de 50 mg ou 80 mg de AT3SC-001, por exemplo, onde a administração do agente de dsRNA para o indivíduo reduz a atividade de Serpinc1 por cerca de 75% ou mais, podem ser tratados com uma dose de cerca de 5 a cerca de 20 UI/kg de fator VIII. Para os indivíduos com hemofilia B, sem inibidores, a quantidade eficaz recomendada do fator de substituição (fator IX ou fator IX de meia-vida prolongada) para tratar uma hemorragia, por exemplo, uma grande hemorragia, é de cerca de 65-130 UI/kg. No entanto, uma hemorragia, por exemplo, uma grande hemorragia, em um indivíduo com hemofilia B e administrado com uma dose subcutânea fixa mensal de 50 mg ou 80 mg de NAT3SC-001, por exemplo, onde a administração do agente dsRNA para o indivíduo reduz a atividade de Serpinc1 por cerca de 75% ou mais, podem ser tratados com uma dose de cerca de 10 a cerca de 30 UI/kg de fator IX ou fator IX de meia-vida prolongada. Para os indivíduos com hemofilia A ou B com inibidores, a quantidade eficaz recomendada do agente de desvio (concentrado de complexo de protrombina ativado; aPCC) para tratar uma hemorragia, por exemplo, uma hemorragia moderada ou uma grande hemorragia, é de cerca de 100 U/kg. No entanto, uma hemorragia, por exemplo, uma hemorragia moderada ou uma grande hemorragia, em um indivíduo com hemofilia tipo A ou B, com inibidores, e administrado com uma dose subcutânea fixa mensal de 50 mg ou 80 mg de AT3SC-001, por exemplo, onde a administração do agente de dsRNA para o indivíduo reduz a atividade de Serpinc1 por cerca de 75% ou mais, podem ser tratados com uma dose de

cerca de 30 a cerca de 50 UI/kg de aPCC. Para os indivíduos com hemofilia A ou B, com inibidores, a quantidade eficaz recomendada do agente de desvio (fator VIIa recombinante; rFVIIa); para tratar, por exemplo, uma hemorragia moderada ou uma grande hemorragia, é de aproximadamente 90 microgramas/kg. No entanto, uma hemorragia, por exemplo, uma hemorragia moderada ou uma grande hemorragia, em um indivíduo com hemofilia tipo A ou B, com inibidores, e administrado com uma dose subcutânea fixa mensal de 50 mg ou 80 mg de AT3SC-001, por exemplo, onde a administração do agente de dsRNA para o indivíduo reduz a atividade de Serpinc1 por cerca de 75% ou mais, podem ser tratados com uma dose de rFVIIa de cerca de 10 a cerca de 45 UI/kg.

**Tabela 4.** Diretrizes de gerenciamento hemorrágico atualizadas:

	Fator VIII	Meia-vida padrão do Fator IX	Meia-vida prolongada do Fator IX	aPCC	Fator VIIa recombinante
Dose única recomendada de	10 UI/kg	20 UI/kg	20 UI/kg	30 U/kg	≤45 µg/kg
Dose única não deve exceder	20 UI/kg	30 UI/kg	30 UI/kg	50 U/kg	45 µg/kg
Instruções para repetir a dose	Obrigatório ligar para o centro de estudo clínico antes da segunda dose Considerar avaliação e tratamento no centro de estudo clínico (ver seção 5.4)				Obrigatório ligar para o centro antes da terceira dose
	Não deve repetir em menos de 24 horas	Não deve repetir em menos de 24 horas	Não deve repetir em menos de 5-7 dias	Não deve repetir em menos de 24 horas	Não deve repetir em menos de 2 horas

	Deve ser visto no centro dentro de 48-72 horas se mais de 2 doses forem necessárias (ver SOA para avaliações)	Deve ser visto no centro dentro de 48-72 horas se mais de 3 doses forem necessárias
<p>Para situações necessitando de doses maiores, administração mais frequente, doses múltiplas repetidas, discussão com o monitor médico do estudo e consultor clínico é recomendado, e a substituição de AT deve ser considerada.</p> <p>Não usar antifibrinolíticos em combinação com o fator de BPA.</p>		

Observação: Doses de rFVIIa e aPCC são incluídas para completude.

Gestão adjunta de episódios de hemorragia deve ser realizada por cuidado padrão. É esperado que esses pacientes não inibidores serão rotineiramente administrados com FVIII e FIX.

**Exemplo 5: Resposta da geração da trombina com a adição de agentes de desvio no plasma dos pacientes humanos tratados com AT3SC-001, para o tratamento de hemofilia A**

[00537] Conforme indicado no Exemplo 4, os dados obtidos a partir de amostras de plasma de pacientes com hemofilia A, com e sem inibidores, mostra respostas de geração da trombina aprimorada para fatores de substituição e agentes de desvio (BPAs) seguido de dosagem a pacientes com AT3SC-001. Em específico, os dados obtidos do estudo de OLE da Fase II, demonstram a dosagem subcutânea em AT3SC-001 proporciona uma melhor geração de trombina em amostras de plasma pós-dose em relação a amostras de plasma pré-dose com a adição de BPAs; sugerindo que doses mais baixas de BPA podem potencialmente ser usadas para obter um efeito hemostático similar.

[00538] Para investigar a resposta à geração de trombina para os BPAs em amostras de plasma selecionadas de pacientes com redução de AT mediada por AT3SC-001, plasma pobre em plaquetas foi coletado de 8 pacientes com hemofilia A (7 sem inibidores, 1 com inibidores), antes e após tratamento com AT3SC-001. A atividade de

AT no plasma do paciente foi medida e normalizada para o pool de plasma normal pelo ensaio cromogênico baseado na atividade de FXa (antitrombina SIEMENS INNOVANCE®). O plasma foi concentrado ex vivo com diferentes doses de BPAs: aPCC (0,5 ou 1 U/mL, correspondente às doses de 37,5 e 75 U/kg, respectivamente) ou rFVIIa (0,75, 1,75 ou 2,5 µg/mL, correspondente às doses de 27, 63 e 90 µg/kg). A resposta de geração de trombina e os níveis de proteína AT foram monitorados usando ELISA e níveis de atividade AT foram monitorados pela geração de curvas de geração da trombina usando Trombinoscópio automático calibrado (fator tecidual = 1pM). Todos os reagentes incluindo o calibrador de trombina, kit FluCa e baixo reagente PPP (1pM de fator tecidual [TF] e 4 µM fosfolipídeos) foram obtidos a partir de Trombinoscópio BV.

[00539] Os dados apresentados nas Figuras 25A-26N demonstram a geração da trombina reforçada nas amostras de plasma obtidas de indivíduos após a redução de AT ser obtida pela administração de AT3SC-001. Com efeito, a redução de AT sozinha resultou no aumento do pico da geração de trombina. Tanto aPCC como rFVIIa produziram aumentos lineares no pico de geração de trombina quando adicionados ao plasma do paciente tratado com AT3SC-001. Doses menores de aPCC foram suficientes para produzir níveis de pico de geração de trombina equivalentes aos obtidos com a dosagem total de aPCC no pré-AT3SC-001 plasmático em pacientes com hemofilia A com inibidores (Figuras 25A e 25B) ou sem inibidores (Figuras 26A-26N). Em todos os plasma dos paciente, a geração da trombina se aproximou, mas manteve-se abaixo, do limite inferior do intervalo normal (LLN) com a adição de todas as quantidades do rFVIIa para plasma reduzido de AT.

[00540] Em resumo, maior geração de trombina foi obtida com a administração de AT3SC-001 em amostras de plasma pós-dose em

relação às as amostras de plasma pré-dose com a adição de agentes de desvio. Esses resultados suportam ainda o uso de baixas doses de agentes de desvio, em comparação com as doses recomendadas para alcançar a hemostasia nos pacientes que apresentam avanço de hemorragia durante tratamento com AT3SC-001 como descrito no Exemplo 4, acima, incluindo, por exemplo, as doses iniciais reduzidas do fator de substituição ou agente de desvio e uma dose máxima reduzida de fator de substituição ou agente de desvio, um intervalo mínimo entre as doses, e nenhuma repetição de dosagem do fator de substituição ou agente de desvio em um intervalo de menos de 24 horas (com exceção de rFVIIa).

**Exemplo 6: Farmacologia dos sistemas quantitativos (QSP) para prever a geração da trombina com substituição concomitante de redução e de Fator**

[00541] Hemofilia A e B são distúrbios hemorrágicos caracterizados pela geração de trombina insuficiente devido às deficiências nos fatores VIII e IX, respectivamente. Como descrito acima, AT3SC-001 é um terapêutico de RNAi investigativo administrado por via subcutânea uma vez por mês de direcionamento de antitrombina (AT) como um meio para melhorar a geração da trombina e promover a hemostasia em pacientes com hemofilia A e hemofilia B com ou sem inibidores. Pacientes recebendo AT3SC-001 podem, no entanto, experimentar avanço hemorrágico que pode exigir tratamento com fator de substituição. Como descrito acima, os dados clínicos e os dados de reforço ex vivo apóiam o uso de baixas doses de agentes de desvio e fatores de substituição, em comparação com as doses recomendadas para alcançar a hemostasia nos pacientes que apresentam avanço hemorrágico durante o tratamento com AT3SC-001.

[00542] A fim de apoiar ainda mais o uso de doses menores de

agentes de desvio e fatores de substituição, em comparação com as doses recomendadas para alcançar a hemostasia nos pacientes que apresentam avanço hemorrágico durante o tratamento com AT3SC-001, bem como fornecer uma compreensão mais profunda da relação entre o nível de AT, o fator de dosagem e a geração da trombina (TG), um modelo cinético de Farmacologia dos sistemas quantitativos (QSP) in silico descrevendo a cascata da coagulação (Nayak, et al. (2015) CPT: pharmacometrics & systems pharmacology 4.7: 396-405) foi usado para simular uma geração da trombina (TG) ex vivo. Em específico, o modelo foi descrito por 66 reações e 106 parâmetros, e as concentrações do fator plasmático inicial foram variadas para simular a hemofilia e distúrbios hemorrágicos. Além disso, uma vez que as concentrações de fator de plasma variam  $\pm 50\%$  através de indivíduos, foram aplicados métodos de Monte Carlo para simular a razão normal de TG: Média - 140 nM; variação de 50-250 nM.

[00543] A tabela abaixo fornece as concentrações do fator de entrada usadas para o modelo sob várias condições da doença.

ATIII	3400	No Fitusiran	1-100
VIII	0,7 (100 UI/dL)	Hemofilia A	0,1,0,5,1,2,5,10,100
IX	90 (100 UI/dL)	Hemofilia B	0,1,0,5,1,2,5,10,100
V	20 (100 U/dL)	Deficiência do Fator V	0,1,0,5,1,2,5,10,100
VII	10 (100 U/dL)	Deficiência do Fator VII	0,1,0,5,1,2,5,10,100
X	160 (100 U/dL)	Deficiência do Fator X	0,1,0,5,1,2,5,10,100

[00544] Como representado nas Figuras 27A-27C, os dados gerados usando o modelo QSP foi preditivo de geração de trombina (TG) com redução de AT. Especificamente, a faixa clínica normal para o TG alinhado com as previsões QSP e a correlação foi observada entre TG clinicamente medida e modelo previsto para pacientes com redução de AT. A Figura 27A representa a TG medida dos resultados da Fase 1 interina (Partes A-C) e a Figura 27B representa a TG simulada (baseada em AT), cada uma armazenada por quartis de redução de AT. A Figura 27C é um gráfico de dispersão representando a forte correlação entre os dados de TG simulados e dados de TG medidos.

[00545] O modelo QSP in silico também foi aplicado para quantificar a relação não linear entre o TG, a redução de AT, e a dose do Fator VIII para a hemofilia A grave (Figura 28A). A representação do mapa de calor do TG com a redução de AT e dosagem do Fator VIII demonstra que entre 5 e 10 UI/kg do fator VIII nos níveis AT observados com AT3SC-001 (10-25%) pode ser suficiente para normalizar o TG (Figura 28B). Do mesmo modo, a representação do mapa de calor do TG com a redução de AT e a dosagem do Fator IX demonstra que de 10 a 20 UI/kg do Fator IX em 10-25%, pode ser suficiente para normalizar o TG (Figura 28C).

[00546] Farmacocinéticas do fator (um modelo de compartimento) e o modelo QSP foram integrados para simular o potencial de pico de trombina (PTP) como uma função do tempo após a dose de fator. A Figura 29B (20% AT na avaliação inicial) em relação à Figura 29A (100% AT) retratam o impacto do curso do tempo da dosagem do fator em pacientes com hemofilia A grave e demonstra que a redução de AT aumenta a geração da trombina tanto no pico como através de pontos no tempo após a administração de FVIII para episódios de avanço hemorrágico.

## REIVINDICAÇÕES

1. Método de tratamento de um caso de hemorragia em um indivíduo com hemofilia sem inibidores, caracterizado pelo fato de que compreende

a administração ao indivíduo com uma dose fixa de cerca de 30 mg a cerca de 90 mg de um agente de ácido ribonucléico (RNAi) de fita dupla que inibe a expressão de um Serpinc1,

em que um agente de RNAi compreende uma fita dupla compreendendo uma fita senso e uma fita antissenso, a fita antissenso compreendendo uma região de complementaridade para um Serpinc1 que codifica um mRNA1 que compreende pelo menos 15 nucleotídeos contíguos diferente em não mais de 3 nucleotídeos da sequência de nucleotídeos 5' - UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG – 3' (SEQ ID NO: 15), em que praticamente todos os nucleotídeos da fita senso e substancialmente todos os nucleotídeos da fita antissenso são nucleotídeos modificados, e em que a fita senso está conjugada com um ligante fixado no 3'-terminal; e

a administração ao indivíduo de uma quantidade terapêuticamente eficaz de um fator de substituição, em que a quantidade eficaz do fator de substituição é reduzida em comparação com a quantidade eficaz recomendada do fator de substituição,

de modo a tratar um caso de hemorragia no indivíduo tendo uma hemofilia sem inibidores.

2. Método de tratamento de um caso de hemorragia em um indivíduo com hemofilia com inibidores, caracterizado pelo fato de que compreende

a administração ao indivíduo com uma dose fixa de cerca de 30 mg a cerca de 90 mg de um agente de ácido ribonucléico (RNAi) de fita dupla que inibe a expressão de um Serpinc1,

em que um agente de RNAi compreende uma fita dupla

compreendendo uma fita senso e uma fita antissenso, a fita antissenso compreendendo uma região de complementaridade de um mRNA que codifica Serpinc1 que compreende pelo menos 15 nucleotídeos contíguos diferente em não mais de 3 nucleotídeos da sequência de nucleotídeos 5' - UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG – 3' (SEQ ID NO: 15), em que praticamente todos os nucleotídeos da fita senso e substancialmente todos os nucleotídeos da fita antissenso são nucleotídeos modificados, e em que a fita senso está conjugada com um ligante fixado no 3'-terminal; e

a administração ao indivíduo de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um agente de desvio, em que a quantidade eficaz do agente de desvio é reduzida em comparação com a quantidade eficaz recomendada do agente de desvio,

de modo a tratar um caso de hemorragia no indivíduo tendo uma hemofilia com inibidores.

3. Método de tratamento de um caso de hemorragia em um indivíduo com hemofilia sem inibidores, caracterizado pelo fato de que compreende

a administração ao indivíduo com uma dose fixa de cerca de 40 mg a cerca de 90 mg de um agente de ácido ribonucléico (RNAi) de fita dupla que inibe a expressão de um Serpinc1,

em que um agente de RNAi compreende uma fita dupla compreendendo uma fita senso e uma fita antissenso, a fita antissenso compreendendo uma região de complementaridade de um mRNA que codifica Serpinc1 que compreende pelo menos 15 nucleotídeos contíguos diferente em não mais de 3 nucleotídeos da sequência de nucleotídeos 5' - UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG – 3' (SEQ ID NO: 15), em que praticamente todos os nucleotídeos da fita senso e substancialmente todos os nucleotídeos da fita antissenso são nucleotídeos modificados, e em que a fita senso está conjugada com

um ligante fixado no 3'-terminal; e

a administração ao indivíduo de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um fator de substituição, em que a quantidade eficaz do fator de substituição é reduzida em comparação com a quantidade eficaz recomendada do fator de substituição,

de modo a tratar um caso de hemorragia no indivíduo tendo uma hemofilia sem inibidores.

4. Método de tratamento de um caso de hemorragia em um indivíduo com hemofilia com inibidores, caracterizado pelo fato de que compreende

a administração ao indivíduo com uma dose fixa de cerca de 40 mg a cerca de 90 mg de um agente de ácido ribonucléico (RNAi) de fita dupla que inibe a expressão de um *Serpinc1*,

em que um agente de RNAi compreende uma fita dupla compreendendo uma fita senso e uma fita antissenso, a fita antissenso compreendendo uma região de complementaridade para um *Serpinc1* que codifica um mRNA1 que compreende pelo menos 15 nucleotídeos contíguos diferente em não mais de 3 nucleotídeos da sequência de nucleotídeos 5' - UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG – 3' (SEQ ID NO: 15), em que praticamente todos os nucleotídeos da fita senso e substancialmente todos os nucleotídeos da fita antissenso são nucleotídeos modificados, e em que a fita senso está conjugada com um ligante fixado no 3'-terminal; e

a administração ao indivíduo de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um agente de desvio, em que a quantidade eficaz do agente de desvio é reduzida em comparação com a quantidade eficaz recomendada do agente de desvio,

de modo a tratar um caso de hemorragia no indivíduo tendo uma hemofilia com inibidores.

5. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações

1 a 4, caracterizado pelo fato de que a dose fixa do agente de RNAi de fita dupla é administrada ao indivíduo uma vez por mês, uma vez a cada seis semanas, uma vez a cada dois meses, ou trimestralmente.

6. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que o agente de RNAi de fita dupla é administrado ao indivíduo em uma dose fixa de cerca de 50 mg.

7. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que o agente de RNAi de fita dupla é administrado ao indivíduo em uma dose fixa de cerca de 80 mg.

8. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que o agente de RNAi de fita dupla é administrado ao indivíduo subcutaneamente.

9. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que o indivíduo é um ser humano.

10. Método, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que a hemofilia é hemofilia A, hemofilia B e hemofilia C.

11. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo fato de que todos os nucleotídeos da fita senso e todos os nucleotídeos da fita antissenso são nucleotídeos modificados.

12. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizado pelo fato de que os nucleotídeos modificados são selecionados de forma independente do grupo consistindo em nucleotídeo modificado 2'-desóxi-2'-fluoro, nucleotídeo modificado 2'-desóxi, um nucleotídeo bloqueado, um nucleotídeo abásico, um nucleotídeo 2'-amino-modificado, um nucleotídeo 2'-alquil-modificado, um nucleotídeo morfolino, um fosforamidato, e uma base não natural compreendendo nucleotídeo.

13. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, caracterizado pelo fato de que a região de

complementaridade é de pelo menos 17 nucleotídeos de comprimento.

14. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, caracterizado pelo fato de que a região de complementaridade tem entre 19 e 21 nucleotídeos de comprimento.

15. Método, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que a região de complementaridade é de 19 nucleotídeos de comprimento.

16. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15, caracterizado pelo fato de que cada fita não tem mais de 30 nucleotídeos de comprimento.

17. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 16, caracterizado pelo fato de que a fita senso e a fita antissenso tem independentemente 19 a 25 nucleotídeos de comprimento.

18. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, caracterizado pelo fato de que cada uma fita senso e fita antissenso tem independentemente 21 e 23 nucleotídeos de comprimento.

19. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 18, caracterizado pelo fato de que a fita senso tem 21 nucleotídeos em comprimento e a fita antissenso tem 23 nucleotídeos de comprimento.

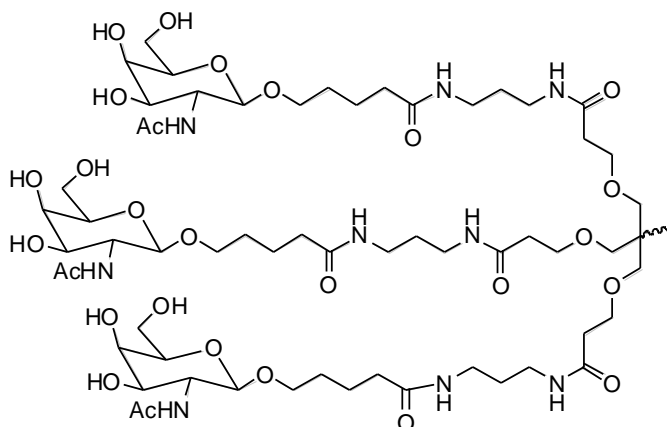
20. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 19, caracterizado pelo fato de que pelo menos uma fita compreende uma saliência 3' de pelo menos 1 nucleotídeo.

21. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 19, caracterizado pelo fato de que pelo menos uma fita compreende uma saliência 3' de pelo menos 2 nucleotídeos.

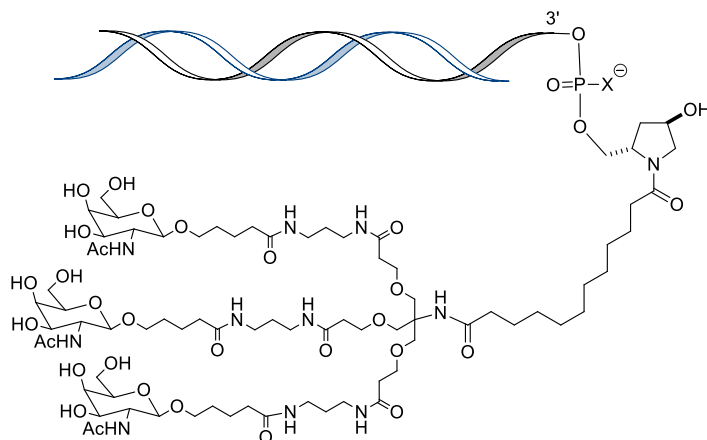
22. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 21, caracterizado pelo fato de que o ligante é um

derivado de N-acetilglicosamina (GalNAc).

23. Método, de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que o ligante é



24. Método, de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que o agente de RNAi de fita dupla é conjugado com o ligante, como mostrado no seguinte esquema



e, em que X é O ou S.

25. Método, de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que X é O.

26. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 25, caracterizado pelo fato de que a região de complementaridade consiste na sequência de nucleotídeos de 5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCCAG-3'(SEQ ID NO: 15).

27. Método, de acordo com qualquer uma das

reivindicações 1 a 26, caracterizado pelo fato de que o agente de RNAi de fita dupla compreende uma fita senso compreendendo a sequência de nucleotídeos de 5'- GGUU AACACCAUUUACUUC AA -3'(SEQ ID NO: 16), e uma fita antissenso compreendendo a sequência de nucleotídeos de 5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3'(SEQ ID NO: 15).

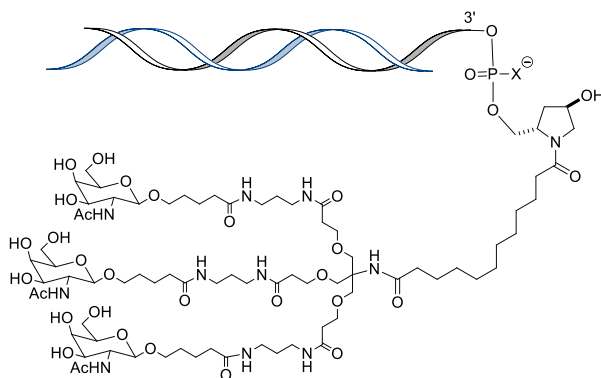
28. Método, de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que a fita senso compreende 5'- GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf – 3' (SEQ ID NO:13) e a fita antissenso compreende 5'- usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg – 3' (SEQ ID NO:14),

em que a, c, g e u são 2'-O-metila (2'-OMe) A, C, G, ou U; Af, Cf, Gf ou Uf são 2'-fluoro A, C, G ou U; e s é um acoplamento fosforotioato.

29. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 28, caracterizado pelo fato de que a fita senso compreende 5'- GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf – 3' (SEQ ID NO:13) e a fita antissenso compreende 5'- usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg – 3' (SEQ ID NO:14),

em que a, c, g e u são 2'-O-metila (2'-OMe) A, C, G, ou U; Af, Cf, Gf ou Uf são 2'-fluoro A, C, G ou U; e s é um acoplamento fosforotioato; e

em que a fita senso é conjugado com o ligante, como mostrado no seguinte esquema



, em que X é O ou S.

30. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 29, caracterizado pelo fato de que o agente de RNAi de fita dupla é administrado ao indivíduo como uma composição farmacêutica.

31. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 30, caracterizado pelo fato de que a administração do agente dsRNA ao indivíduo diminui a atividade da Serpinc1 por cerca de 75% ou mais.

32. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 3 e 5 a 31, caracterizado pelo fato de que o fator de substituição é o Fator VIII.

33. Método, de acordo com a reivindicação 32, caracterizado pelo fato de que a quantidade terapeuticamente eficaz do Fator VIII administrada ao indivíduo é menor que 200 UI/kg, ou menos que cerca de 190 UI/kg, ou menos que cerca de 180 UI/kg, ou menos que cerca de 170 UI/kg, ou menos que cerca de 160 UI/kg, ou menos que cerca de 150 UI/kg, ou menos que cerca de 140 UI/kg, ou menos que cerca de 130 UI/kg, ou menos que cerca de 120 UI/kg, ou menos que cerca de 110 UI/kg, ou menos que cerca de 100 UI/kg, ou menos que cerca de 90 UI/kg, ou menos que cerca de 80 UI/kg, ou menos que cerca de 70 UI/kg, ou menos que cerca de 60 UI/kg, ou menos que cerca de 50 UI/kg, ou menos que cerca de 40 UI/kg, ou menos que 30 UI/kg, ou menos que cerca de 20 UI/kg, ou menos que cerca de 10 UI/kg.

34. Método, de acordo com a reivindicação 32, caracterizado pelo fato de que a quantidade terapeuticamente eficaz do Fator VIII administrado ao indivíduo é de cerca de uma vez e meia a cerca de cinco vezes menos eficaz do que a quantidade eficaz recomendada do Fator VIII.

35. Método, de acordo com a reivindicação 34,

caracterizado pelo fato de que a quantidade terapêuticamente eficaz do Fator VIII administrada ao indivíduo é uma dose de cerca de 10 a cerca de 20 UI/kg.

36. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 3 e 5 a 28, caracterizado pelo fato de que o fator de substituição é o Fator IX.

37. Método, de acordo com a reivindicação 36, caracterizado pelo fato de que a quantidade terapêuticamente eficaz do Fator IX administrada ao indivíduo é menor que 200 UI/kg, ou menos que cerca de 190 UI/kg, ou menos que cerca de 180 UI/kg, ou menos que cerca de 170 UI/kg, ou menos que cerca de 160 UI/kg, ou menos que cerca de 150 UI/kg, ou menos que cerca de 140 UI/kg, ou menos que cerca de 130 UI/kg, ou menos que cerca de 120 UI/kg, ou menos que cerca de 110 UI/kg, ou menos que cerca de 100 UI/kg, ou menos que cerca de 90 UI/kg, ou menos que cerca de 80 UI/kg, ou menos que cerca de 70 UI/kg, ou menos que cerca de 60 UI/kg, ou menos que cerca de 50 UI/kg, ou menos que cerca de 40 UI/kg, ou menos que 30 UI/kg, ou menos que cerca de 20 UI/kg, ou menos que cerca de 10 UI/kg.

38. Método, de acordo com a reivindicação 36, caracterizado pelo fato de que a quantidade terapêuticamente eficaz do Fator IX administrado ao indivíduo é de cerca de duas vezes a cerca de seis vezes menos eficaz do que a quantidade eficaz recomendada do Fator IX.

39. Método, de acordo com a reivindicação 38, caracterizado pelo fato de que a quantidade terapêuticamente eficaz do Fator IX administrada ao indivíduo é uma dose de cerca de 20 a cerca de 30 UI/kg.

40. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 e 4 a 31, caracterizado pelo fato de que o agente de

desvio é concentrado de complexo de protrombina ativado (aPCC).

41. Método, de acordo com a reivindicação 40, caracterizado pelo fato de que a quantidade terapeuticamente eficaz do aPCC administrado ao sujeito é menor que cerca de 100 U/kg, ou menos que cerca de 90 U/kg, ou menos que cerca de 80 U/kg, ou menos que cerca de 70 U/kg, ou menos que cerca de 60 U/kg, ou menos que cerca de 50 U/kg, ou menos que cerca de 40 U/kg, ou menos que cerca de 30 U/kg, ou menos que cerca de 20 U/kg ou menos que cerca de 10 U/kg.

42. Método, de acordo com a reivindicação 40, caracterizado pelo fato de que a quantidade terapeuticamente eficaz de aPCC administrado ao indivíduo é de cerca de duas vezes a cerca de três vezes menos eficaz do que a quantidade eficaz recomendada do aPCC.

43. Método, de acordo com a reivindicação 42, caracterizado pelo fato de que a quantidade terapeuticamente eficaz do aPCC administrada ao indivíduo é uma dose de cerca de 30 a cerca de 50 U/kg.

44. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 e 4 a 31, caracterizado pelo fato de que o agente de desvio é o Fator VIIa (rFVIIa) recombinante.

45. Método, de acordo com a reivindicação 44, caracterizado pelo fato de que a quantidade terapeuticamente eficaz do rFVIIa administrado ao indivíduo é menos que cerca de 120 µg/kg, ou menos que cerca de 110 µg/kg, ou menos que cerca de 100 µg/kg, ou menos que cerca de 90 µg/kg, ou menos que cerca de 80 µg/kg, ou menos que cerca de 70 µg/kg, ou menos que cerca de 60 µg/kg, ou menos que cerca de 50 µg/kg, ou menos que cerca de 40 µg/kg, ou menos que cerca de 30 µg/kg ou menos que cerca de 20 µg/kg.

46. Método, de acordo com a reivindicação 45,

caracterizado pelo fato de que a quantidade terapêuticamente eficaz de rFVIIa administrado ao indivíduo é de cerca de duas vezes menos eficaz do que a quantidade eficaz recomendada do rFVIIa.

47. Método, de acordo com a reivindicação 46, caracterizado pelo fato de que a quantidade terapêuticamente eficaz do rFVIIa administrada ao indivíduo é uma dose de cerca de 45 µg/kg.

48. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 47, caracterizado pelo fato de que compreende ainda a medição de níveis de trombina no indivíduo.

49. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 48, caracterizado pelo fato de que compreende ainda a medição dos níveis do fator de substituição no indivíduo.

50. Método de tratamento de um caso de hemorragia em um indivíduo com hemofilia sem inibidores, caracterizado pelo fato de que compreende

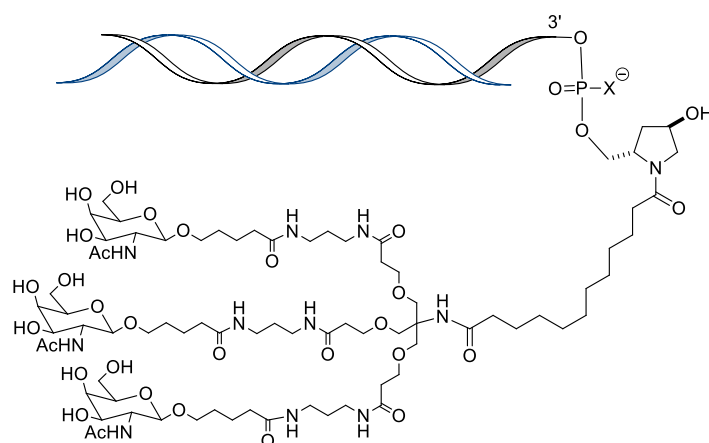
a administração ao indivíduo com uma dose fixa de cerca de 80 mg de um agente de ácido ribonucleico (RNAi) de fita dupla que inibe a expressão de um Serpinc1,

em que o agente de RNAi de fita dupla compreende uma fita senso e uma fita antissenso,

em que a fita senso compreende 5'-GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf – 3' (SEQ ID NO:13) e a fita antissenso compreende 5'- usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg – 3' (SEQ ID NO:14),

em que a, c, g e u são 2'-O-metila (2'-OMe) A, C, G, ou U; Af, Cf, Gf ou Uf são 2'-fluoro A, C, G ou U; e s é um acoplamento fosforotioato; e

em que a extremidade 3' da fita senso é conjugado com o ligante, como mostrado no seguinte esquema



, em que X é

O ou S; e

a administração ao indivíduo de uma quantidade terapêuticamente eficaz de um fator de substituição, em que a quantidade eficaz do fator de substituição é reduzida em comparação com a quantidade eficaz recomendada do fator de substituição,

de modo a tratar um caso de hemorragia no indivíduo tendo uma hemofilia sem inibidores.

51. Método de tratamento de um caso de hemorragia em um indivíduo com hemofilia com inibidores, caracterizado pelo fato de que compreende

a administração ao indivíduo com uma dose fixa de cerca de 80 mg de um agente de ácido ribonucleico (RNAi) de fita dupla que inibe a expressão de Serpinc1,

em que o agente de RNAi de fita dupla compreende uma fita senso e uma fita antissenso, em que a fita senso compreende 5'-GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf – 3' (SEQ ID NO:13) e a fita antissenso compreende 5'-usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg – 3' (SEQ ID NO:14),

em que a, c, g e u são 2'-O-metila (2'-OMe) A, C, G, ou U; Af, Cf, Gf ou Uf são 2'-fluoro A, C, G ou U; e s é um acoplamento fosforotioato; e

em que a extremidade 3' da fita senso é conjugado com o ligante, como mostrado no seguinte esquema



ALN-AT3SC-001

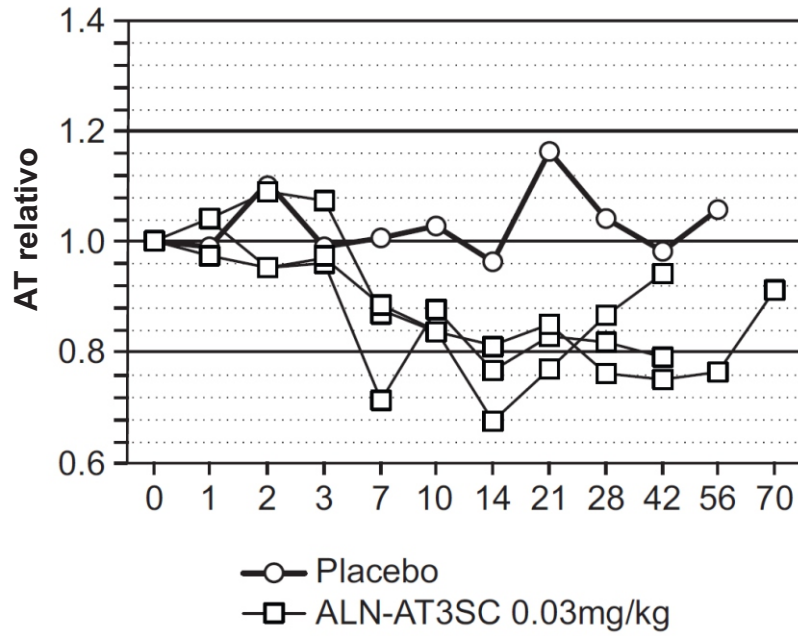


FIG. 1A

ALN-AT3SC-001

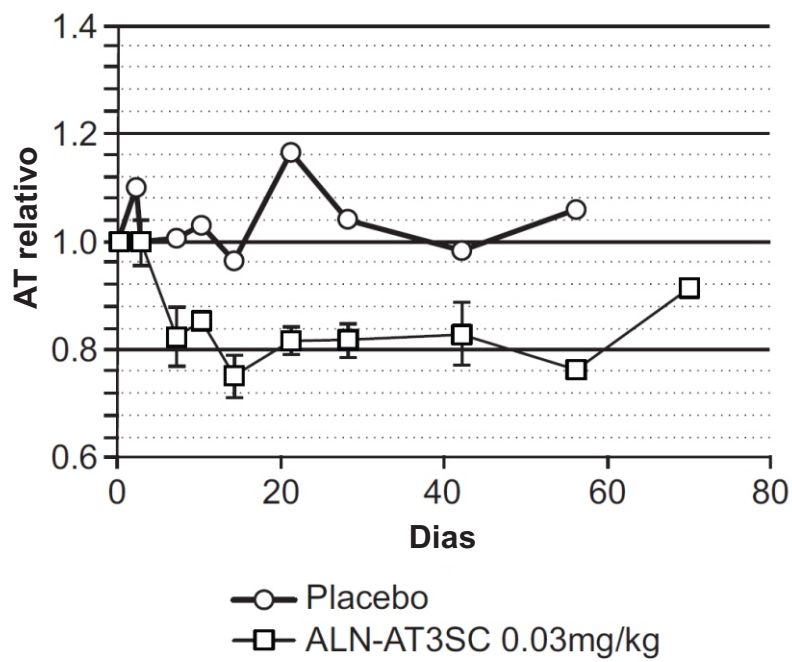


FIG. 1B

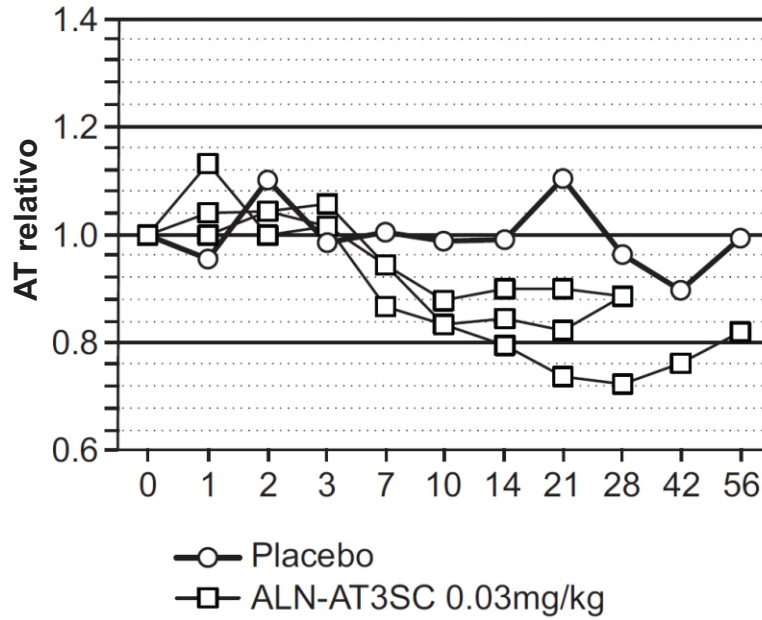


FIG. 1C

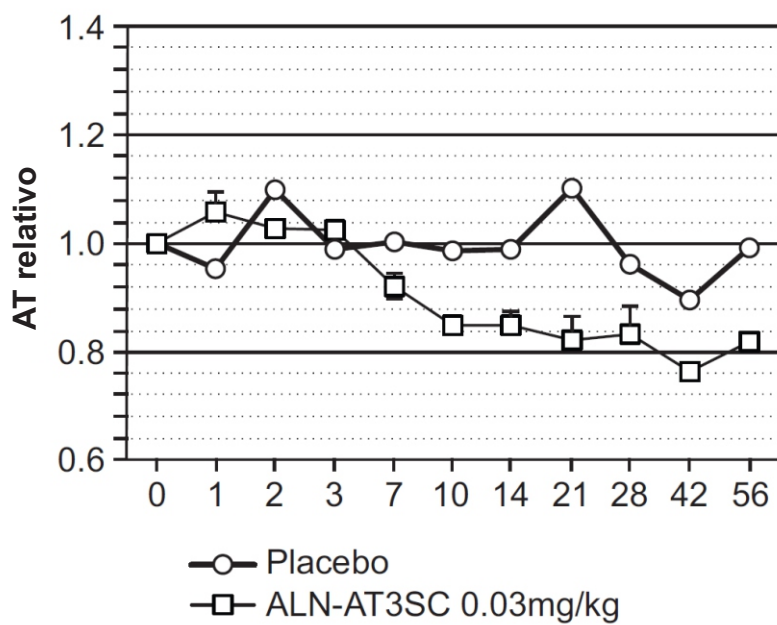


FIG. 1D

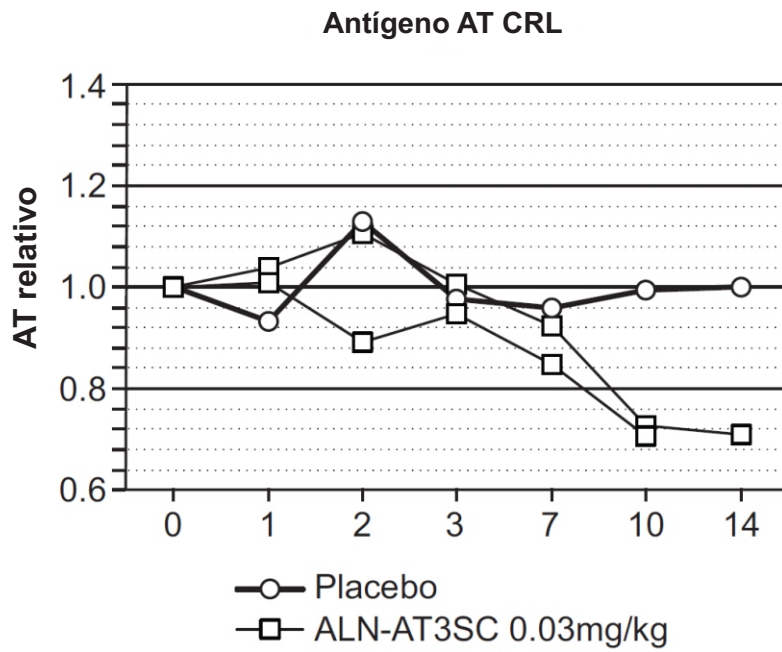


FIG. 2A

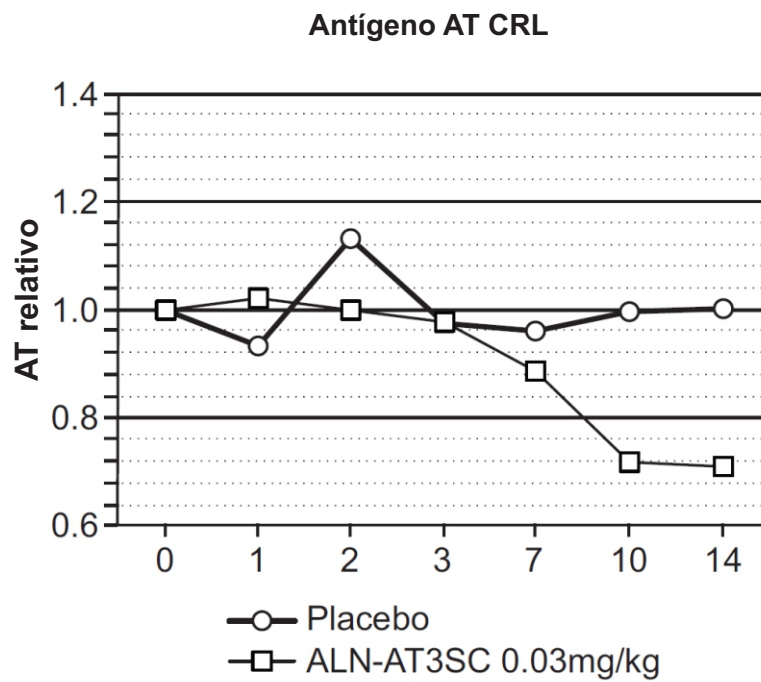


FIG. 2B

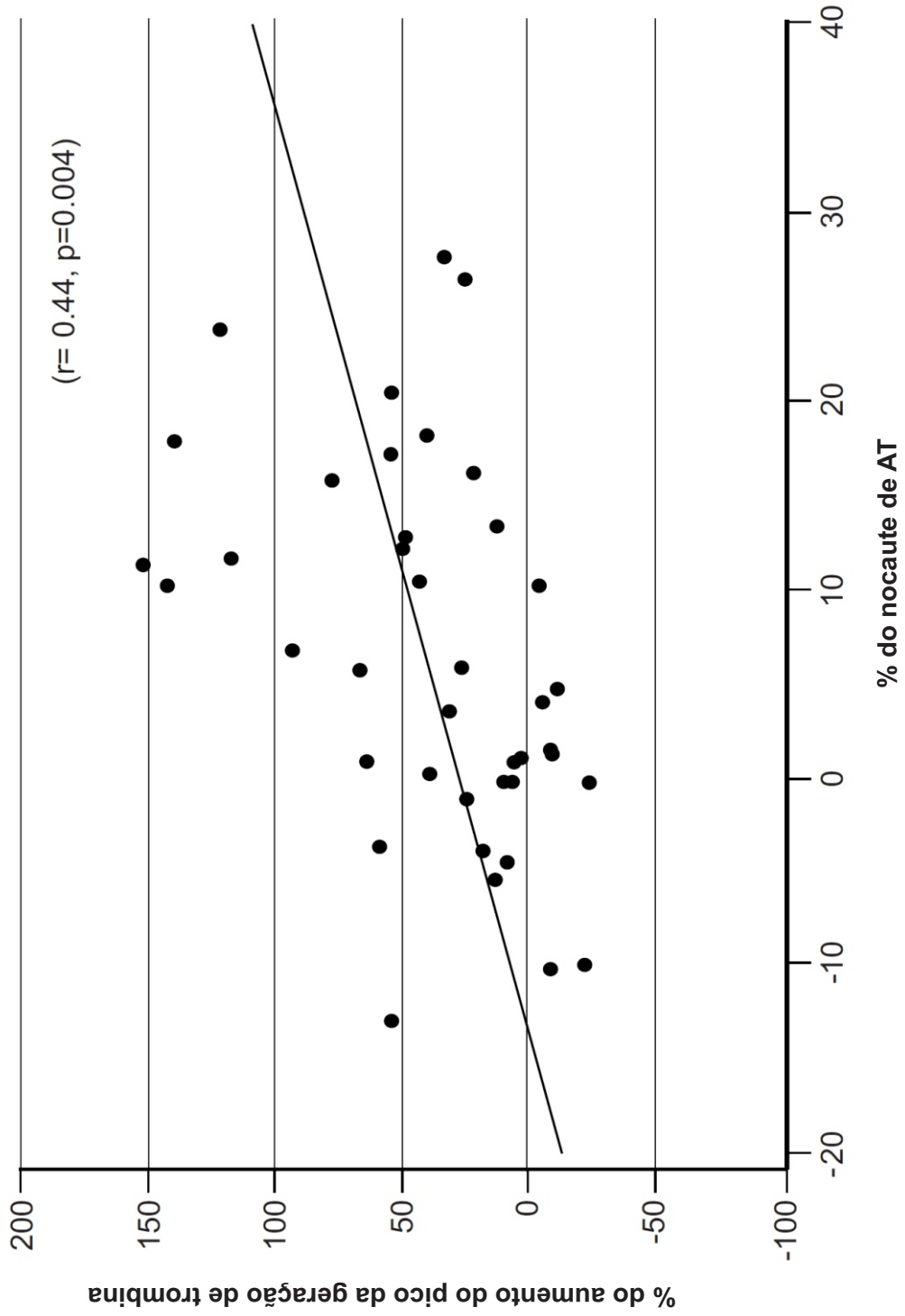


FIG. 3

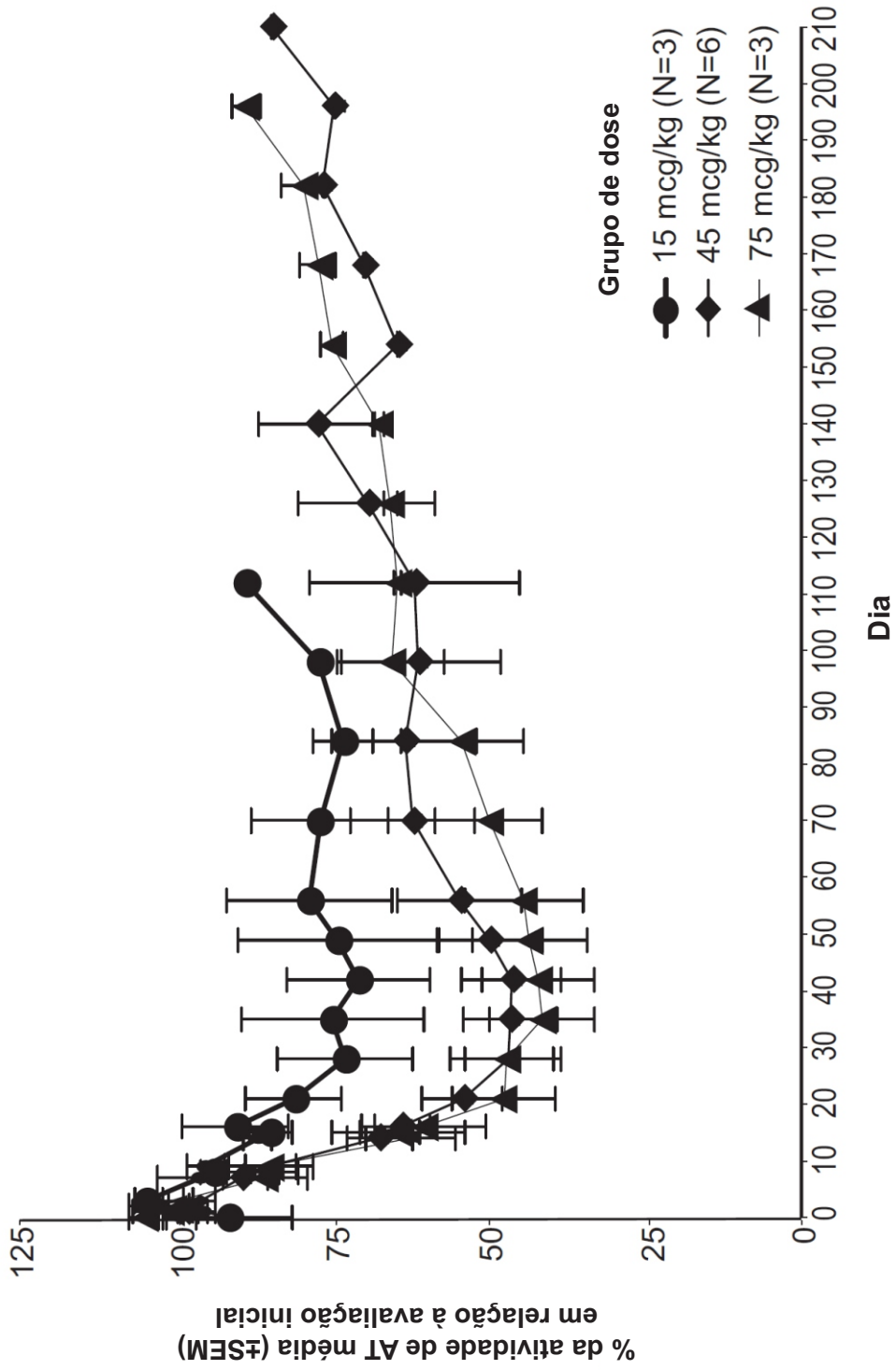


FIG. 4

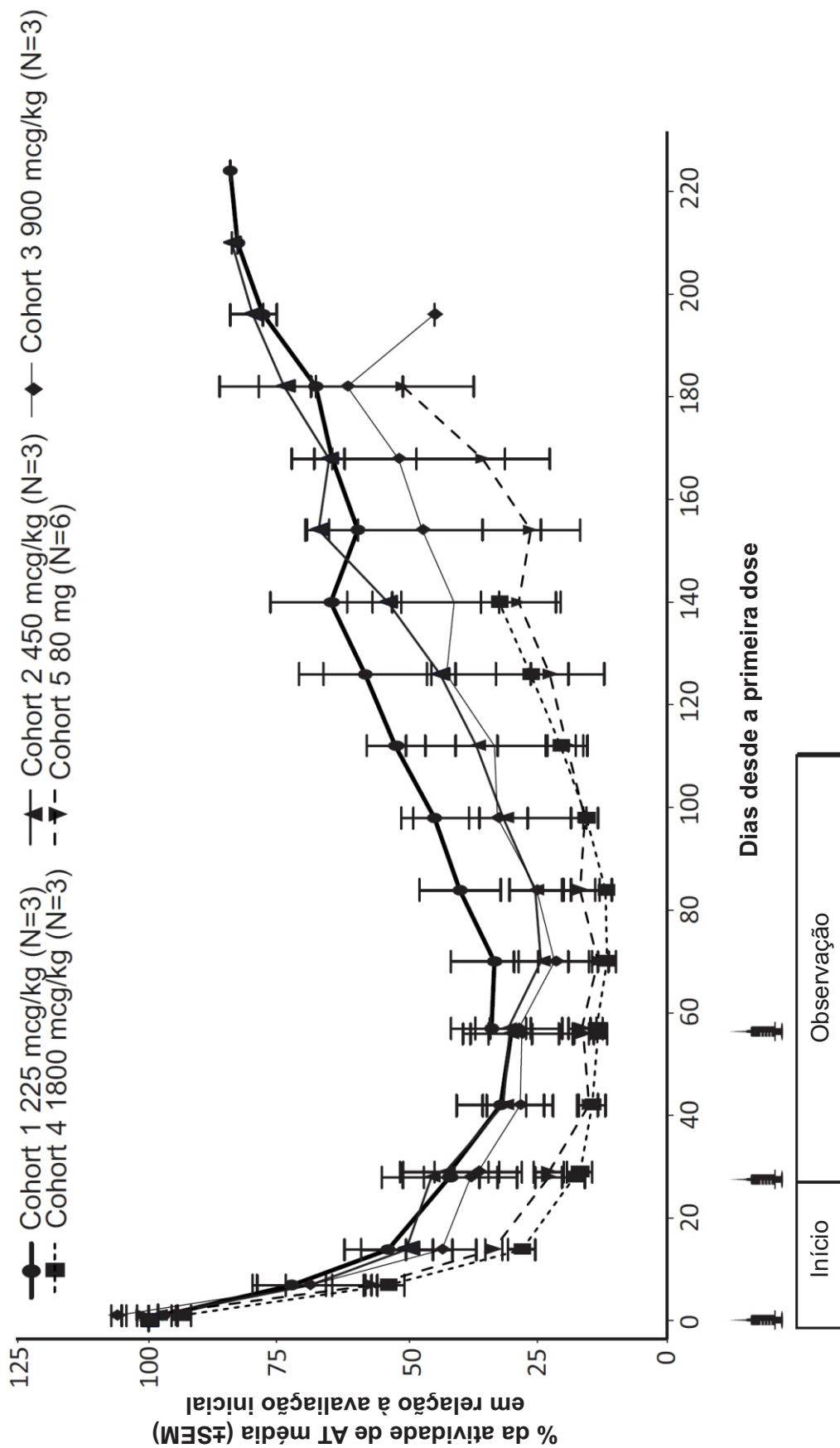


FIG. 5A

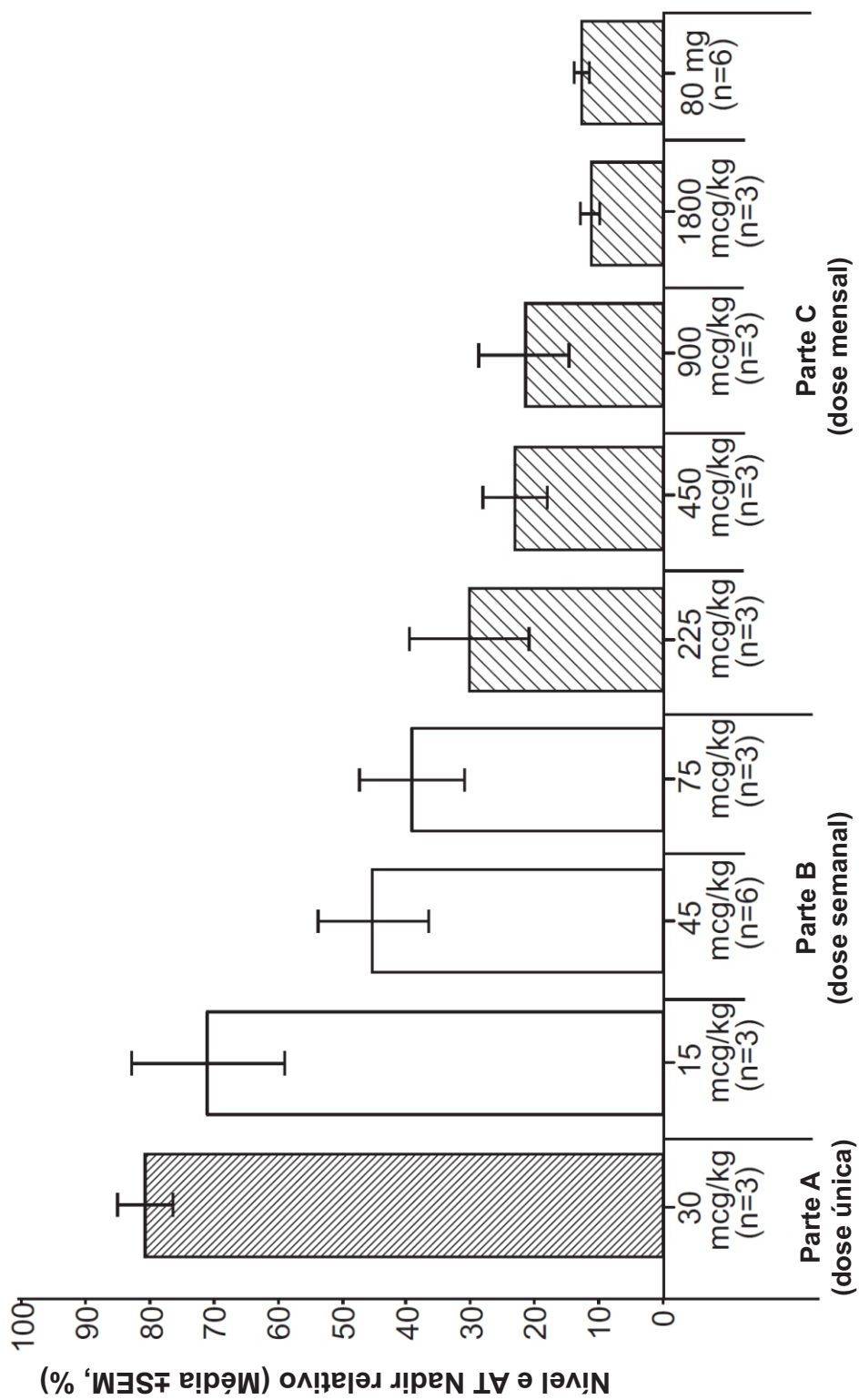


FIG. 5B

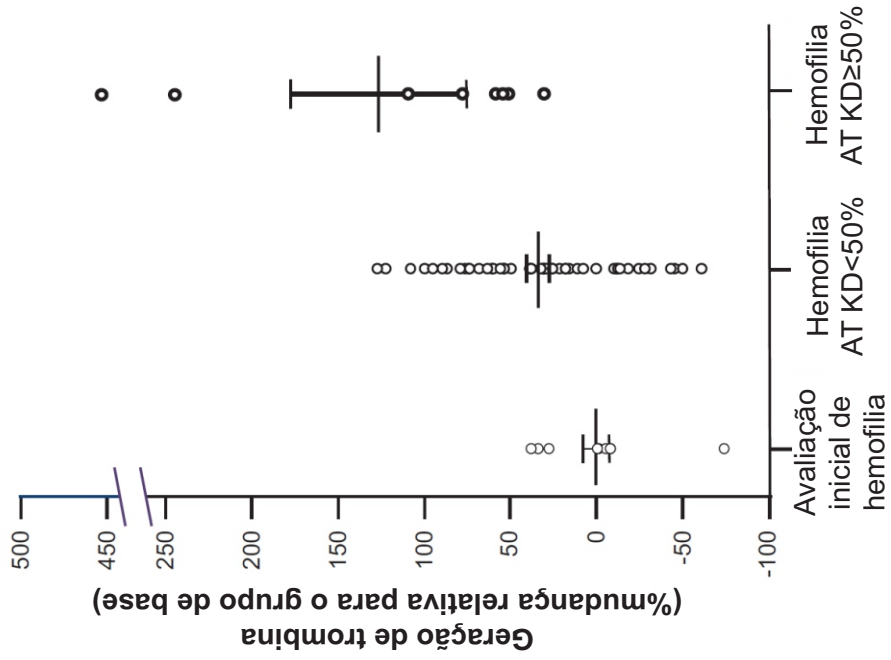


FIG. 6B

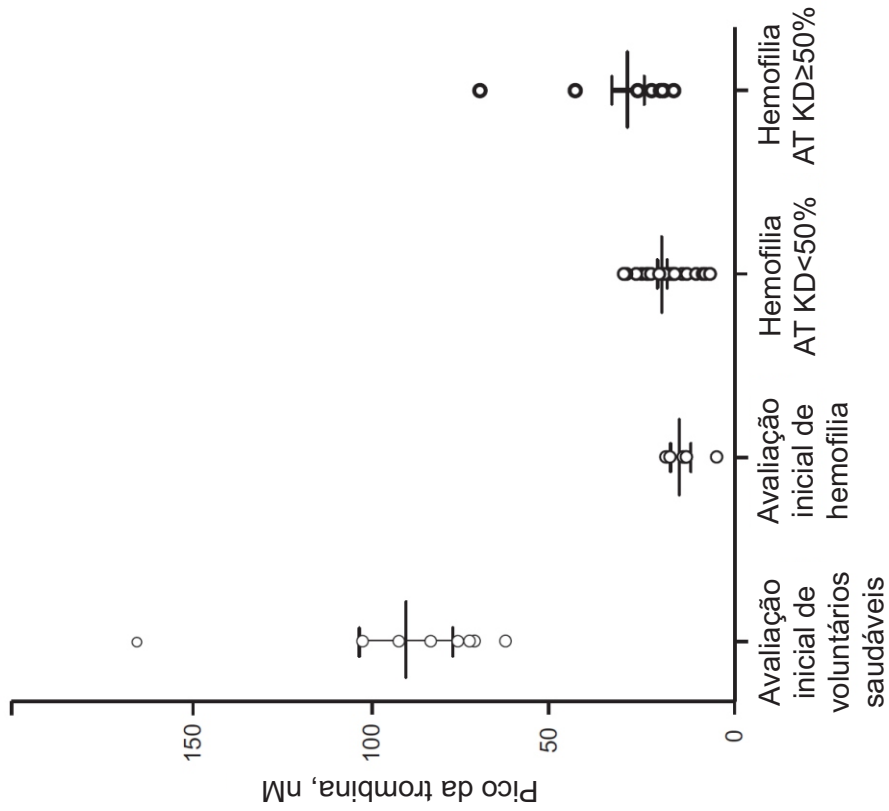


FIG. 6A

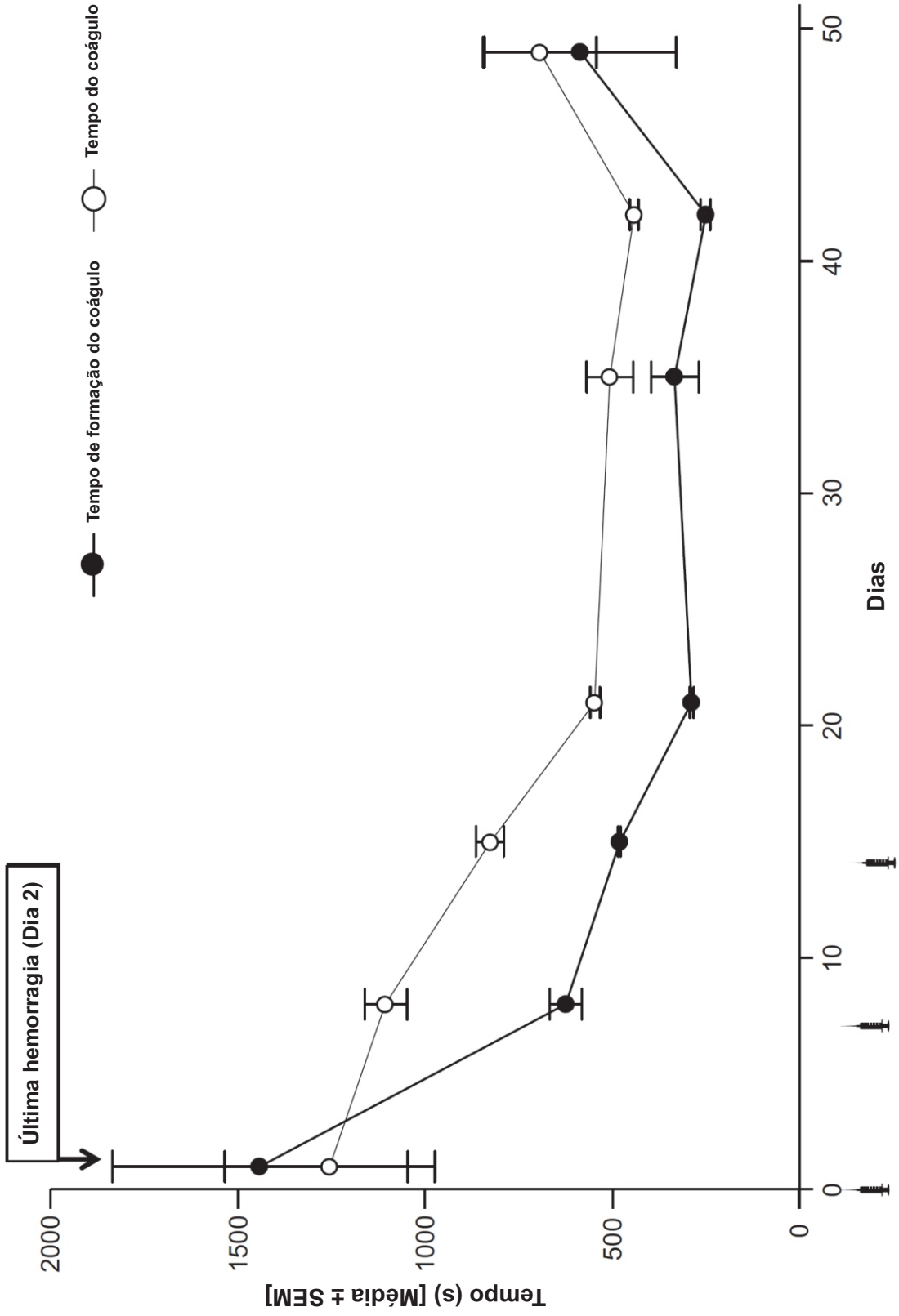


FIG. 7

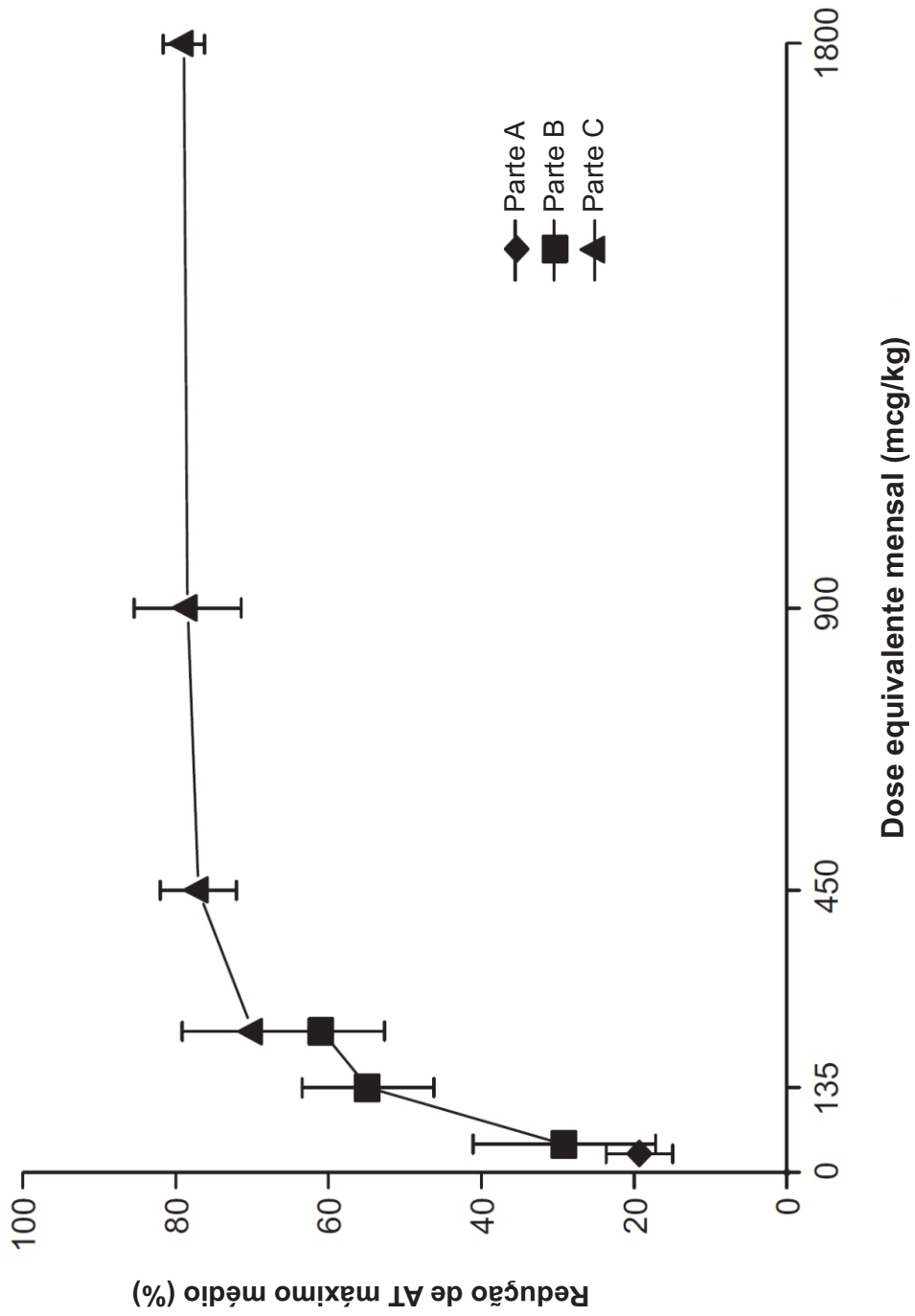
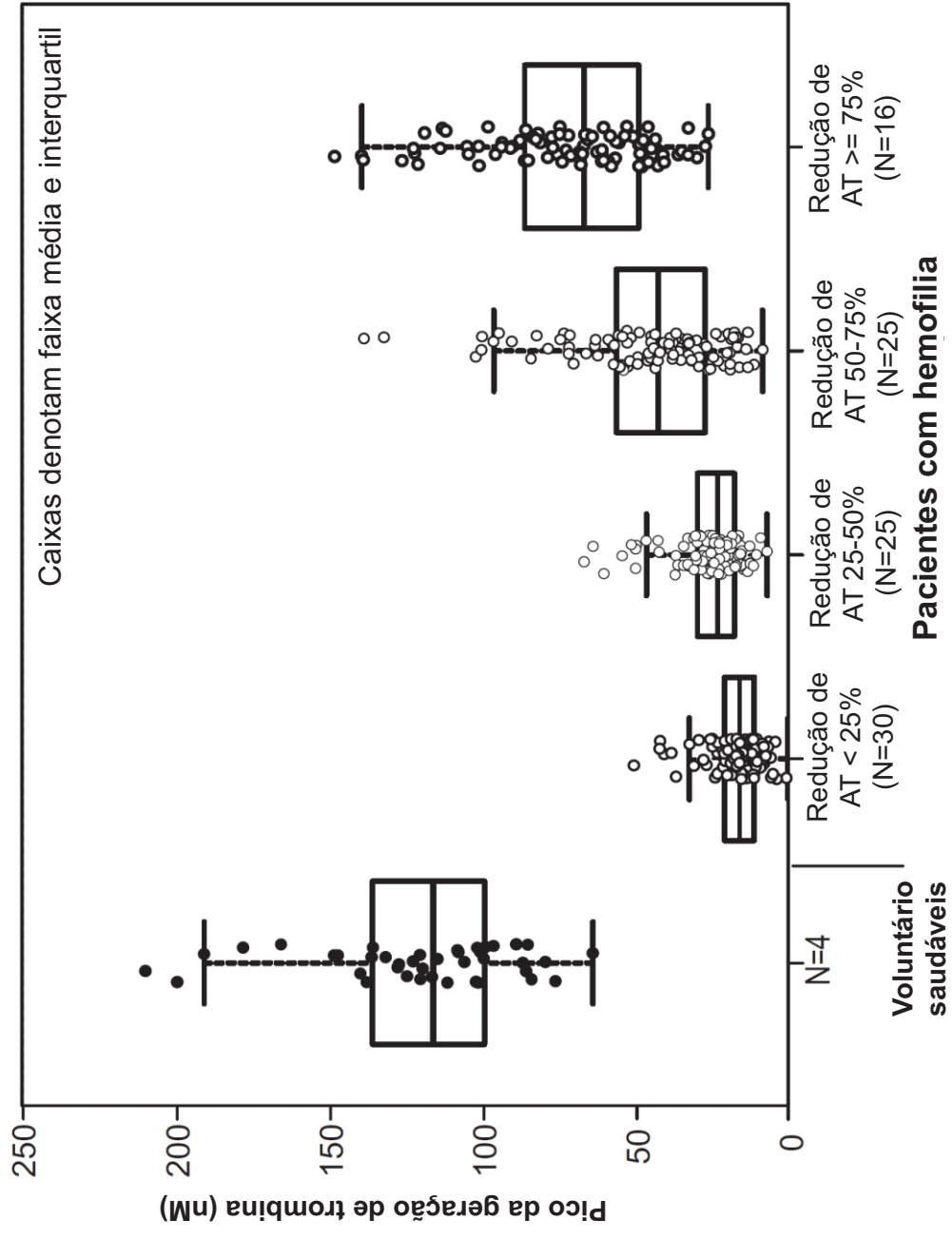


FIG. 8



† % Mudança no pico TG:  $p < 0,001$  pelo teste Mann-Whitney, quando comparado com a redução de AT do que o grupo <25%

**FIG. 9**

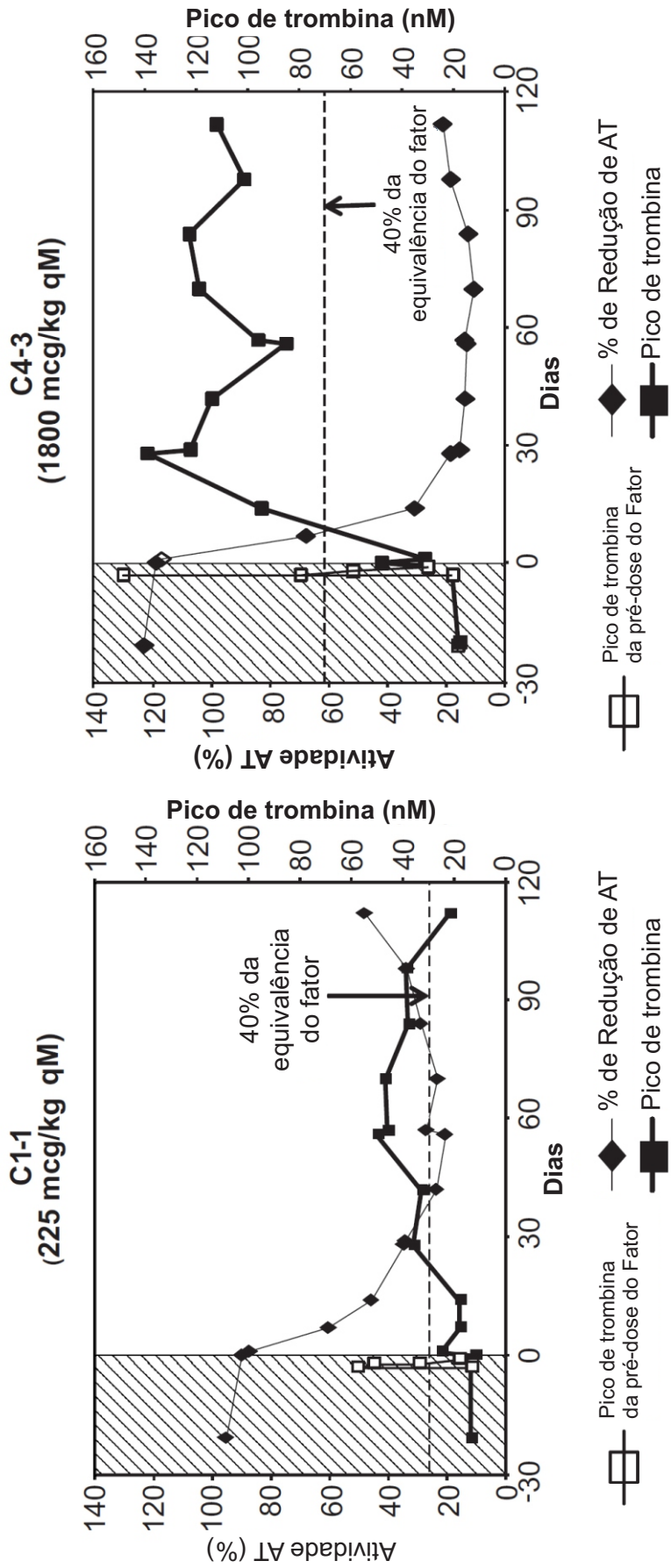
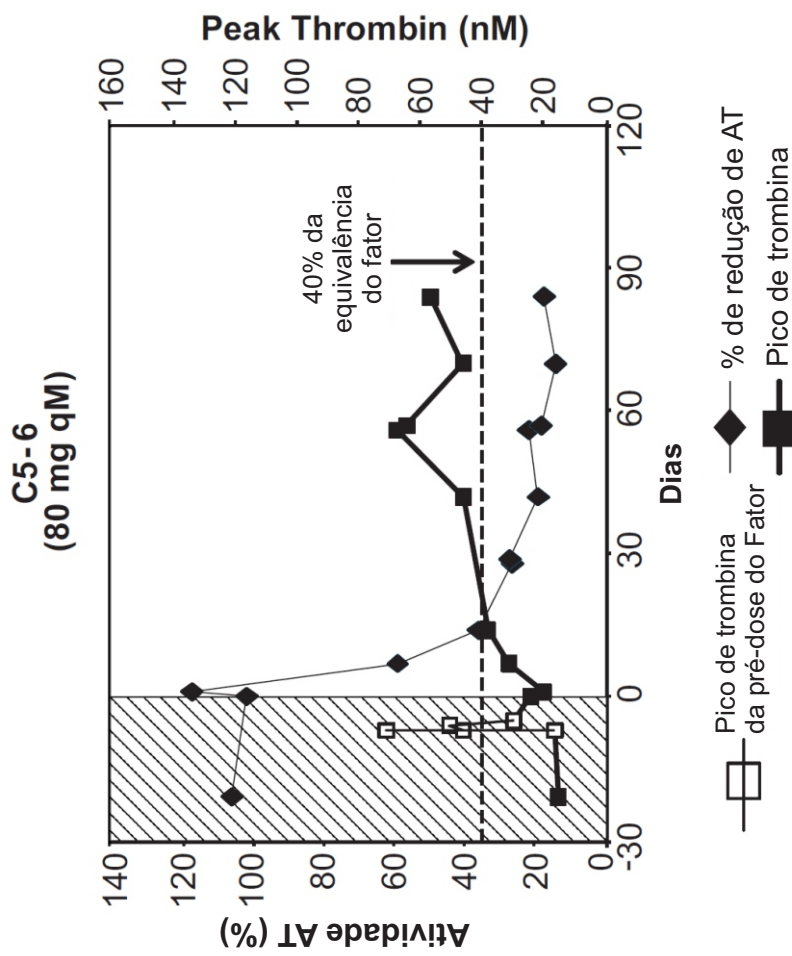
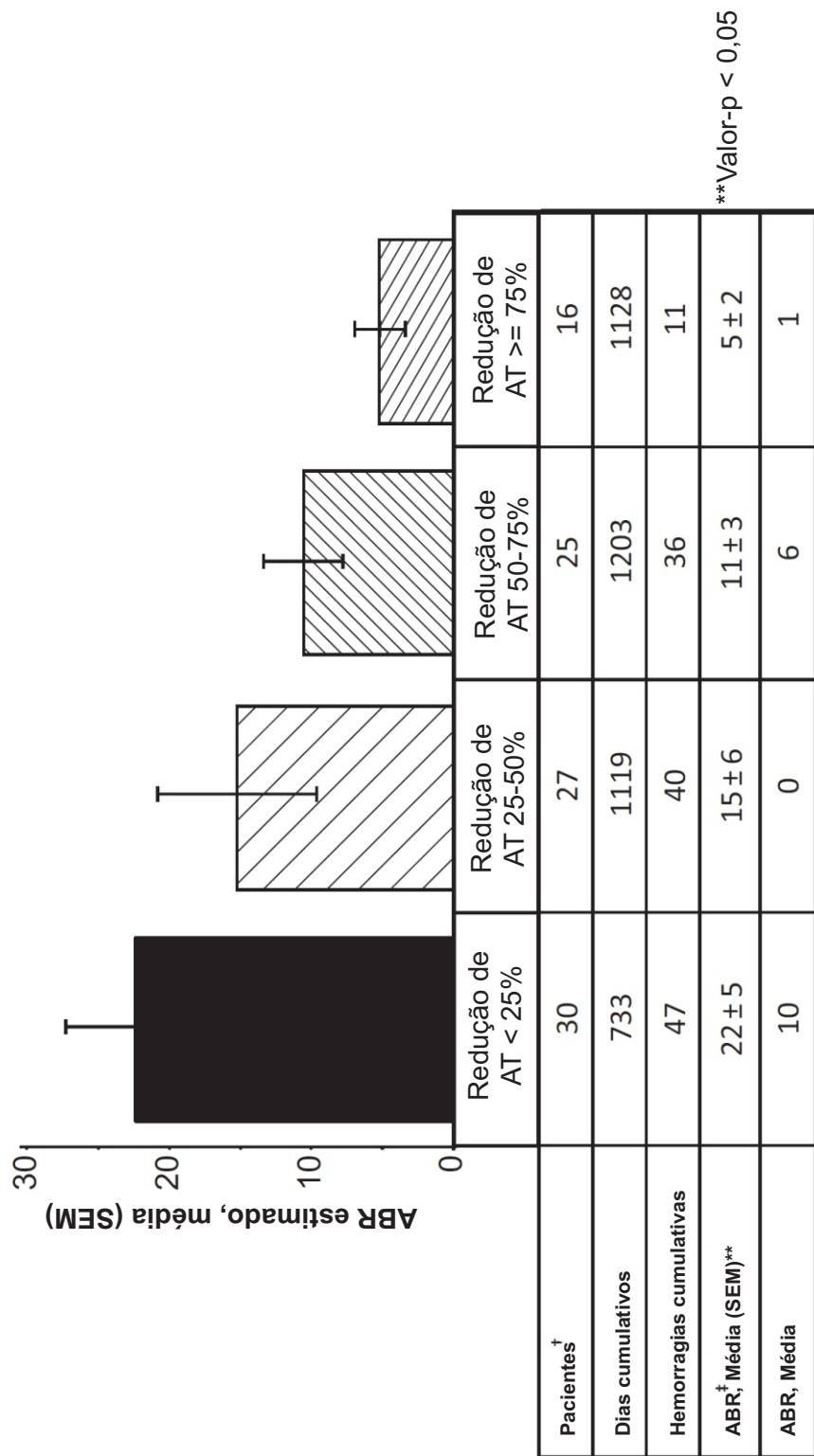


FIG. 10B

FIG. 10A



**FIG. 10C**



ABR, taxa de hemorragia anual; SEM, erro padrão da média

<sup>†</sup> Número de pacientes com tempo gasto no quartil; <sup>‡</sup> Para cada paciente, a ABR em cada quartil é calculada por 365,24\* (número de eventos hemorrágicos/ número de dias no quartil)

**FIG. 11**

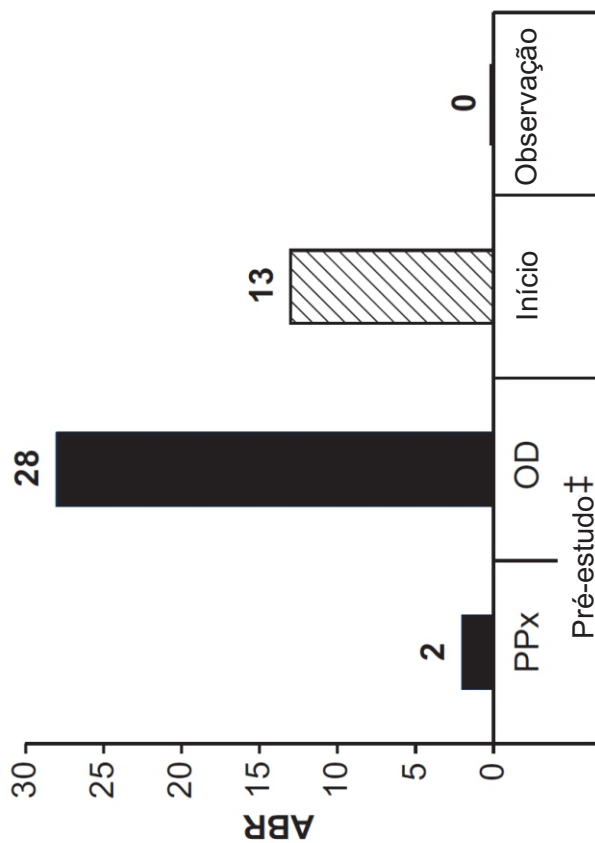
Dose	Paciente	Antes Tx	ABR pré-estudo †	Início ABR	Período de observação			
					Todas as hemorragias, n	ABR	Hemorragia anual espontânea, n	ASBR
225 mcg/kg	C1-1	PPX	2	13	1	4	1	4
	C1-2	PPX	0	0	1	4	0	0
	C1-3	PPX	0	50	4	17	0	0
450 mcg/kg	C2-1	PPX	4	25	4	17	3	13
	C2-2	OD	38	13	0	0	0	0
	C2-3	PPX	4	0	1	4	0	0
900 mcg/kg	C3-1	PPX	0	0	0	0	0	0
	C3-2	OD	20	25	3	13	0	0
	C3-3	OD	32	25	0	0	0	0
1800 mcg/kg	C4-1	PPX	0	25	0	0	0	0
	C4-2	OD	24	0	0	0	0	0
	C4-3	PPX	0	25	0	0	0	0
80 mg**	C5-1	PPX	12	13	2	9	1	4
	C5-2	PPX	16	0	0	0	0	0
	C5-3	PPX	6	13	2	9	0	0
	C5-5	PPX	6	13	0	0	0	0
	C5-6	PPX	0	13	0	0	0	0

Ppx: Profilaxia, OD: Em demanda; ABR, taxa hemorrágica anual, ASBR, taxa hemorrágica anual espontânea

† Análise post-hoc de eventos hemorrágicos tratados durante o Início (Dia 0-28) e períodos de observação (Dia 29) para última visita do estudo ou última dose +56 dias, o que for mais cedo, ‡Pré-estudo ABR derivado de históricos médicos. \*\*Paciente C5-4 retirado, excluído da análise

**FIG. 12**

Resumo de ABR média (todos os coortes)

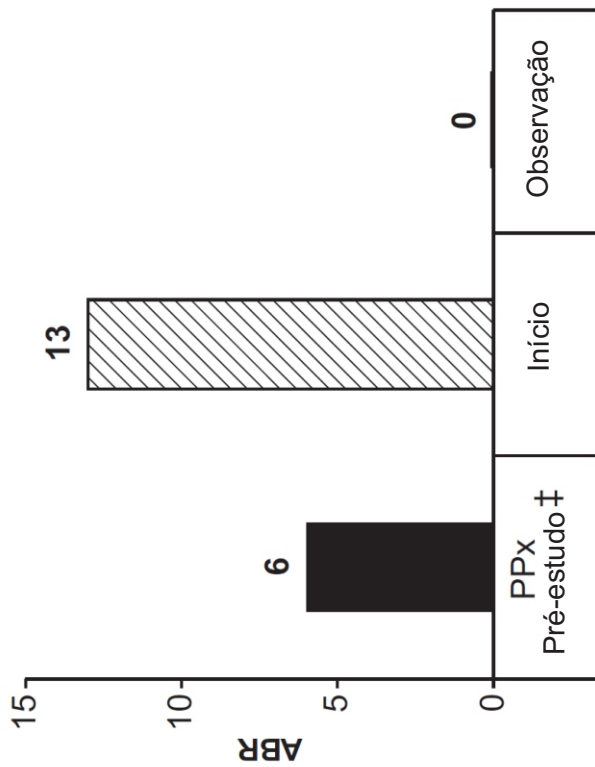


Ppx: Profilaxia, OD: Em demanda; ABR, taxa hemorrágica anual,  
 †Análise post-hoc de eventos hemorrágicos tratados durante o início (Dia 0  
 períodos de observação (Dia 29) para última visita do estudo ou última  
 dose +56 dias, o que for mais cedo, ‡ pré-estudo ABR derivado de  
 históricos médicos.

\*\*Paciente C5-4 retirado, excluído da análise

FIG. 13A

Resumo de ABR média (80 mg)



Ppx: Profilaxia, OD: Em demanda; ABR, taxa hemorrágica anual,  
 †Análise post-hoc de eventos hemorrágicos tratados durante o início (Dia 0  
 -28) e períodos de observação (Dia 29) para última visita do estudo ou última  
 dose +56 dias, o que for mais cedo, ‡ Pré-estudo ABR derivado de

\*\*Paciente C5-4 retirado, excluído da análise

FIG. 13B

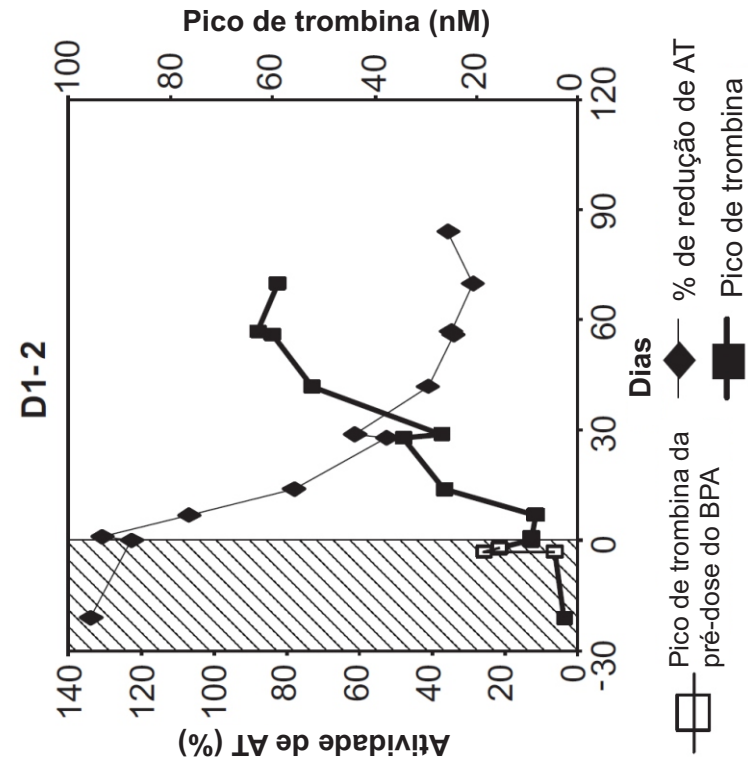


FIG. 14B

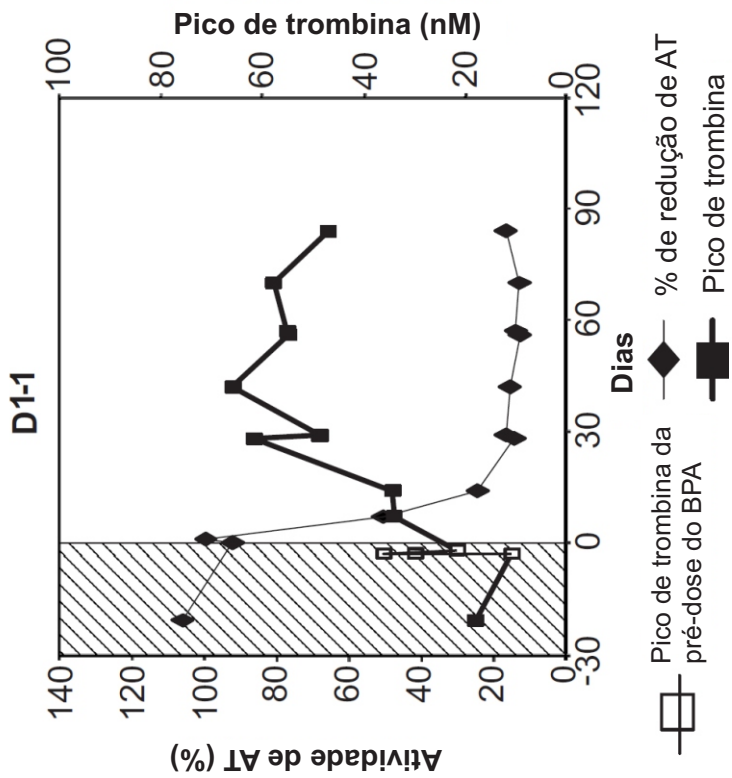


FIG. 14A

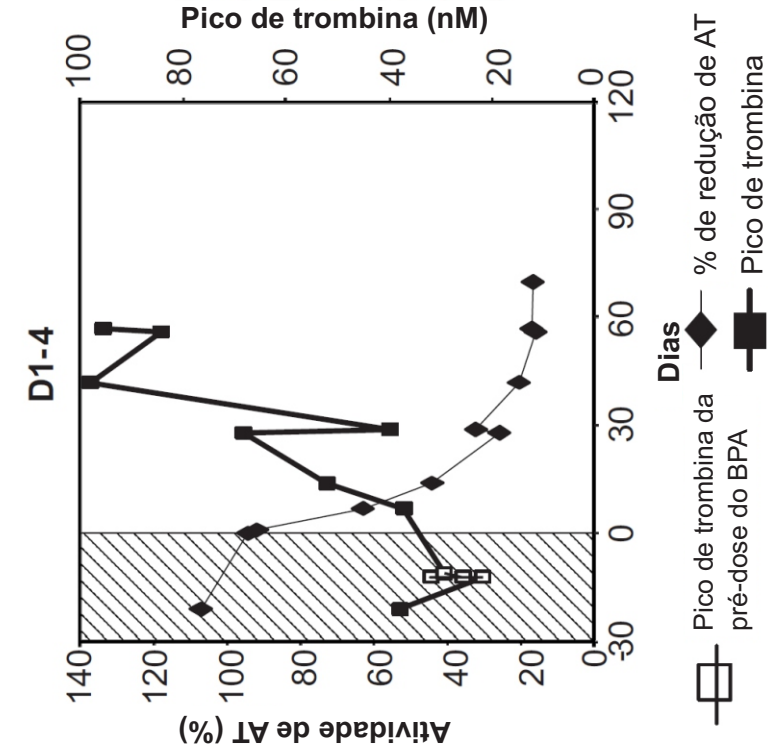


FIG. 14C

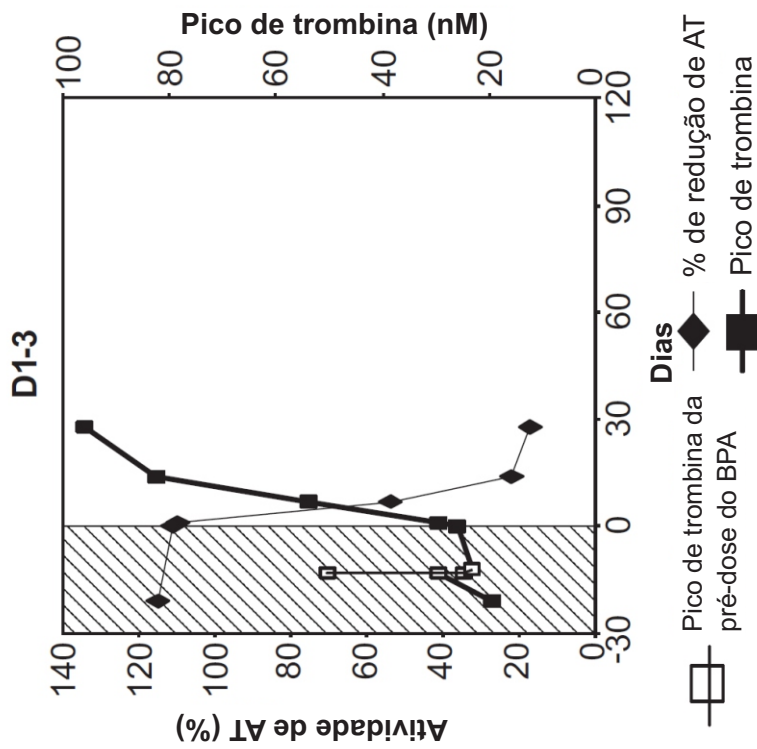


FIG. 14D

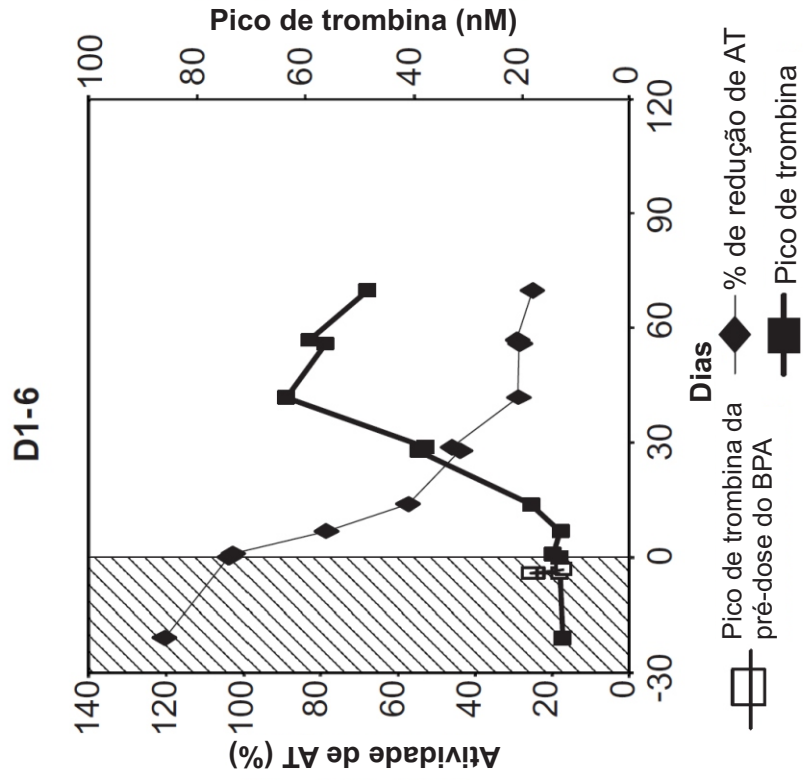


FIG. 14F

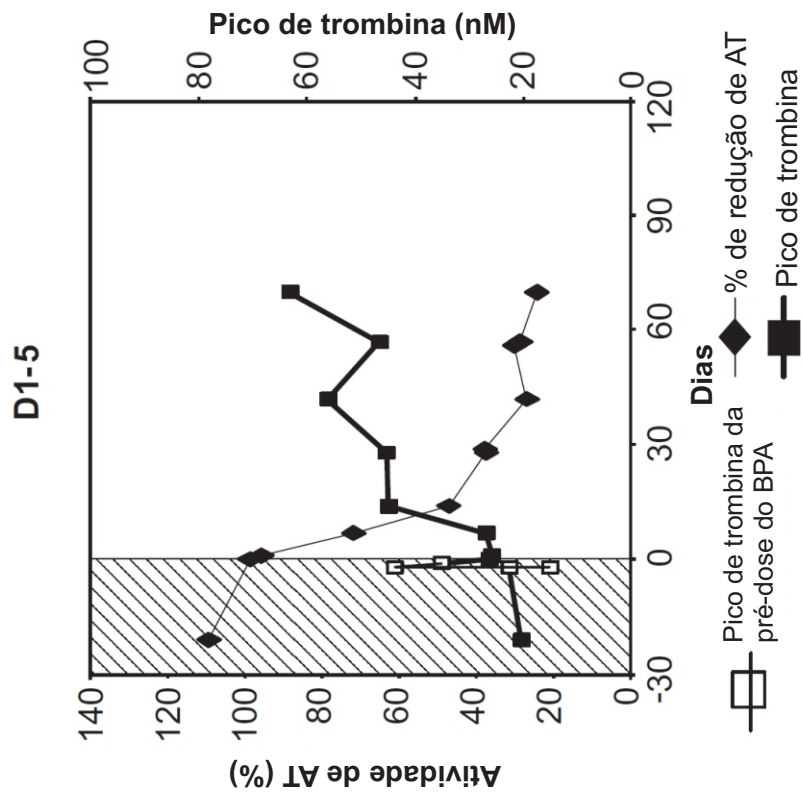


FIG. 14E

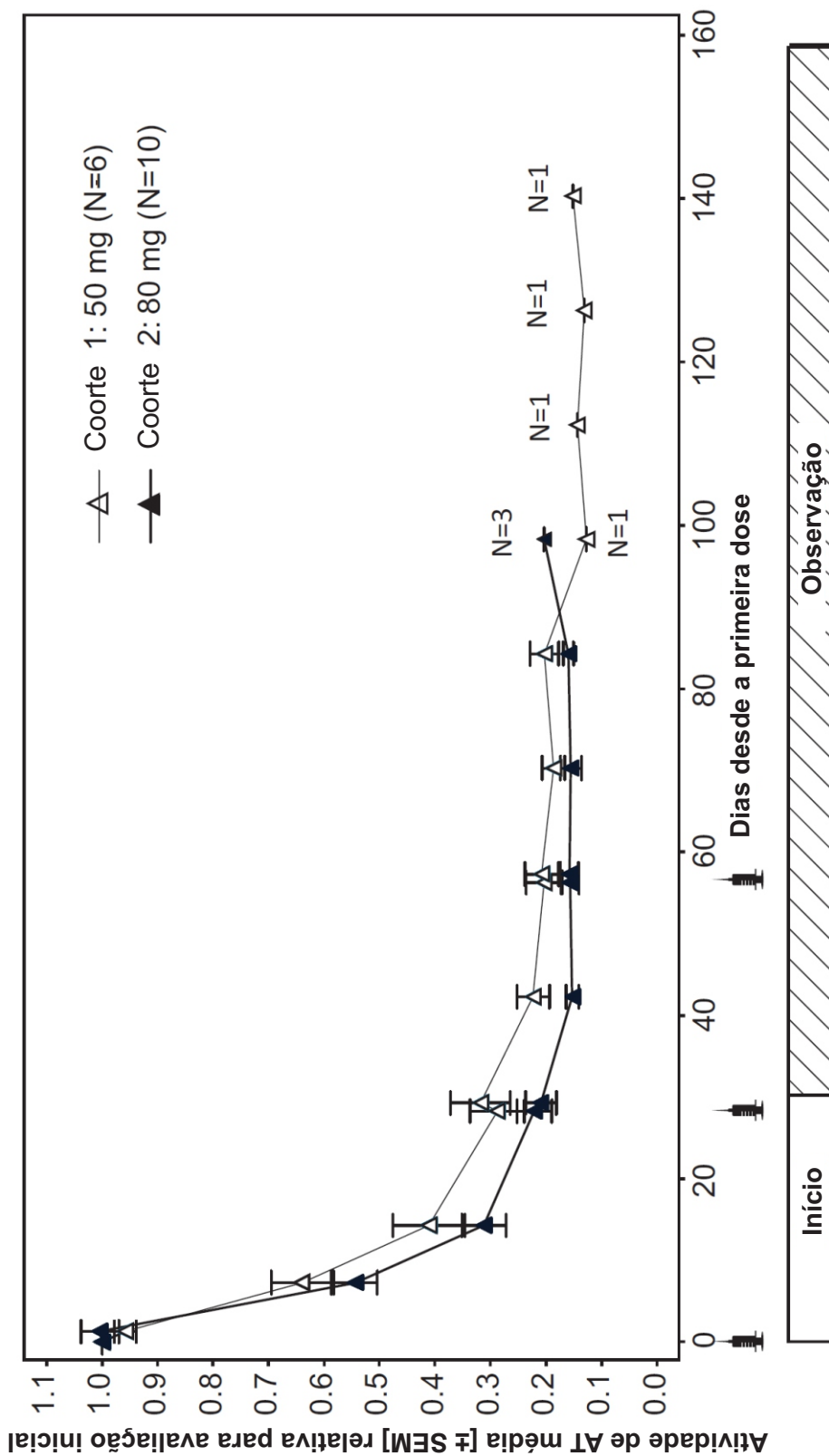


FIG. 15

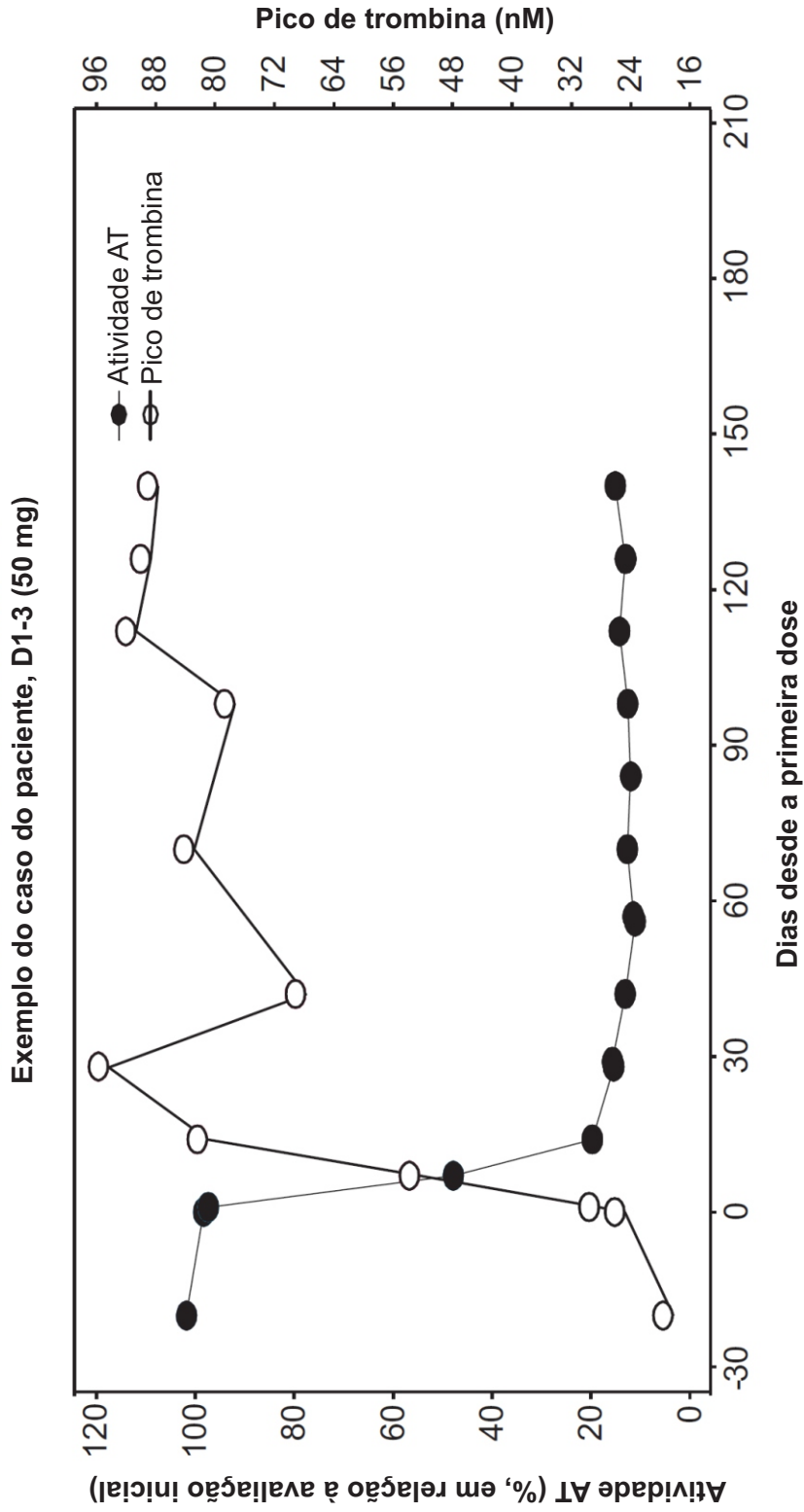
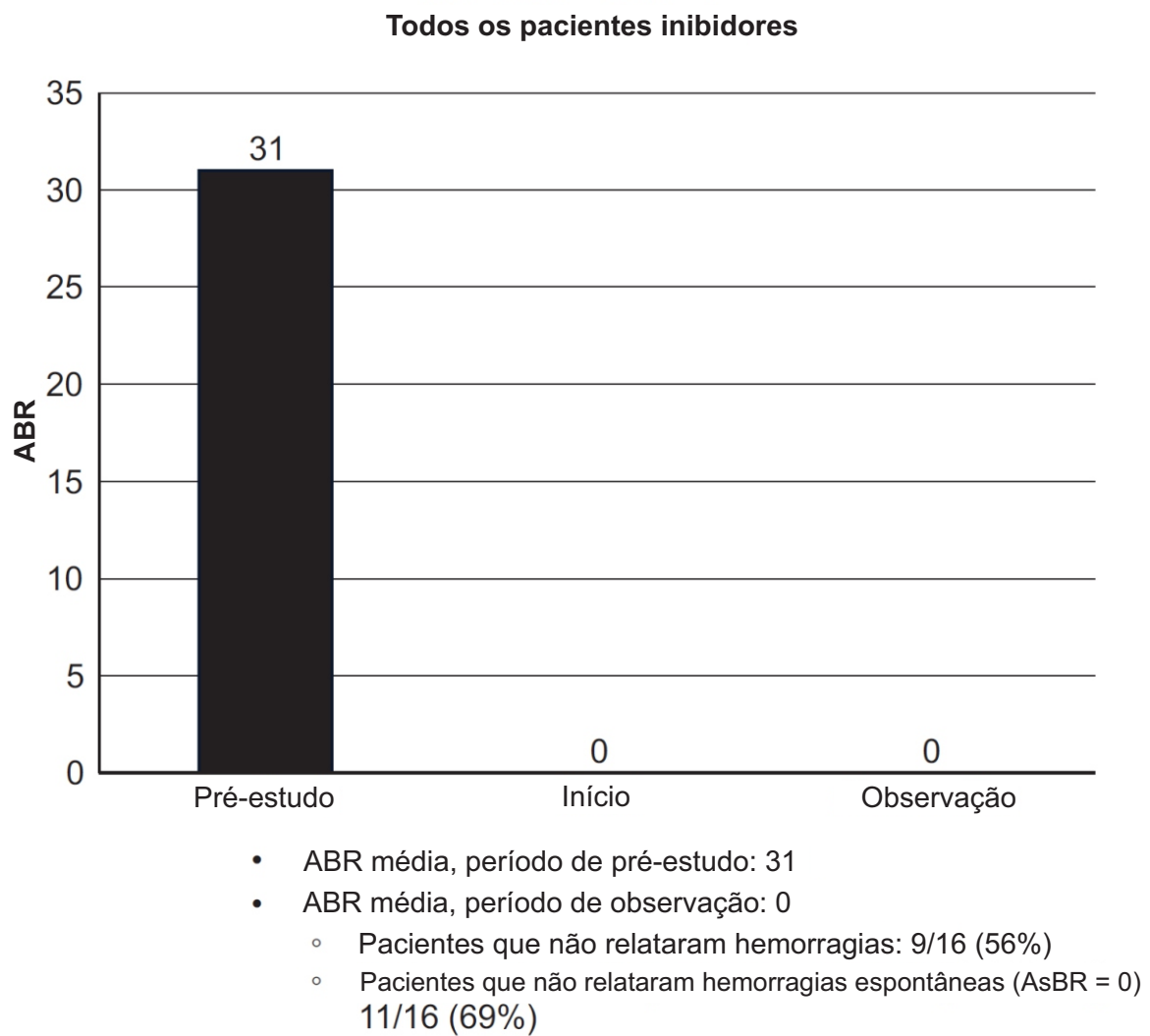


FIG. 16

Paciente	Dose	ABR pré-estudo	Início ABR	Período de observação					AsBR
				Dias em período de observação	Todas as hemorragias, n	ABR	Hemorragias espontâneas, n	AsBR	
D1-1 <sup>^</sup>	50 mg	40	13	191	3	5.7	2	3.8	
D1-2 <sup>^</sup>	50 mg	26	13	180	5	10.1	3	6.1	
D1-3	50 mg	0	0	84	0	0	0	0	
D1-4 <sup>^</sup>	50 mg	52	38	162	11	25	9	20	
D1-5 <sup>^</sup>	50 mg	80	38	160	20	46	12	27	
D1-6 <sup>^</sup>	50 mg	16	13	156	0	0	0	0	
D2-1	80 mg	48	0	48	1	7.6	0	0	
D2-2	80 mg	48	0	41	0	0	0	0	
D2-3	80 mg	8	0	72	0	0	0	0	
D2-4 <sup>^</sup>	80 mg	48	13	56	0	0	0	0	
D2-5	80 mg	36	0	69	0	0	0	0	
D2-6	80 mg	20	0	69	1	5.3	0	0	
D2-7 <sup>^</sup>	80 mg	14	0	55	0	0	0	0	
D2-8	80 mg	20	13	55	2	13.3	2	13.3	
D2-9	80 mg	12	0	13	0	0	0	0	
D2-10	80 mg	44	0	13	0	0	0	0	

OLE, extensão aberta; ABR, taxa hemorrágica anual, AsBR, taxa hemorrágica anual espontânea  
† Análise post-hoc de eventos hemorrágicos tratados durante o início (Dia 0-28) e períodos de observação (Dia 29) para última visita do estudo ou última dose +56 dias, o que for mais cedo; ‡ Pré-estudo ABR derivado de históricos médicos. <sup>^</sup>Pacientes transferidos para Fase 2 OLE como data de corte

**FIG. 17A**



OLE, extensão aberta; ABR taxa hemorrágica anual, AsBR, taxa hemorrágica anual espontânea

**FIG. 17B**

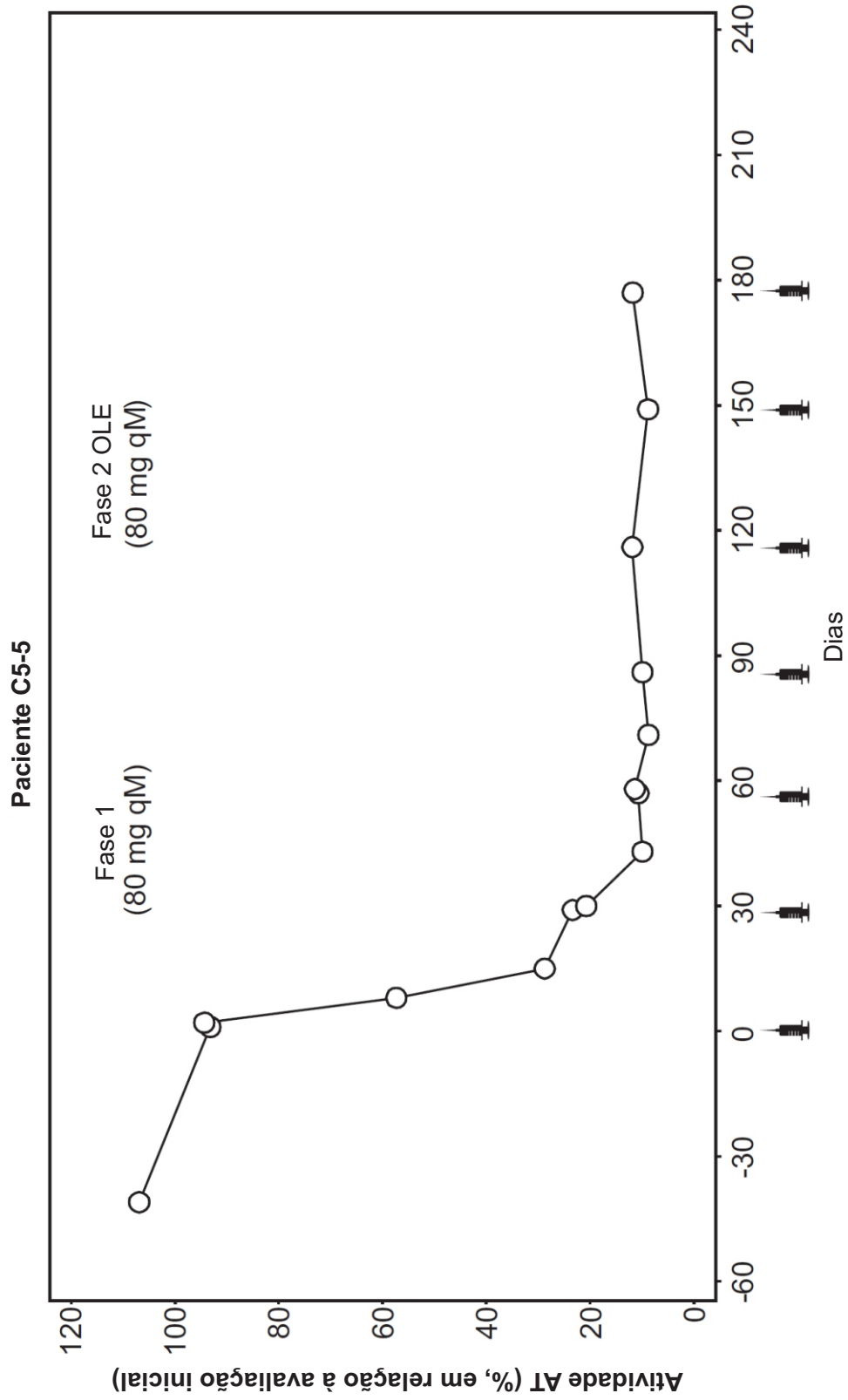


FIG. 18

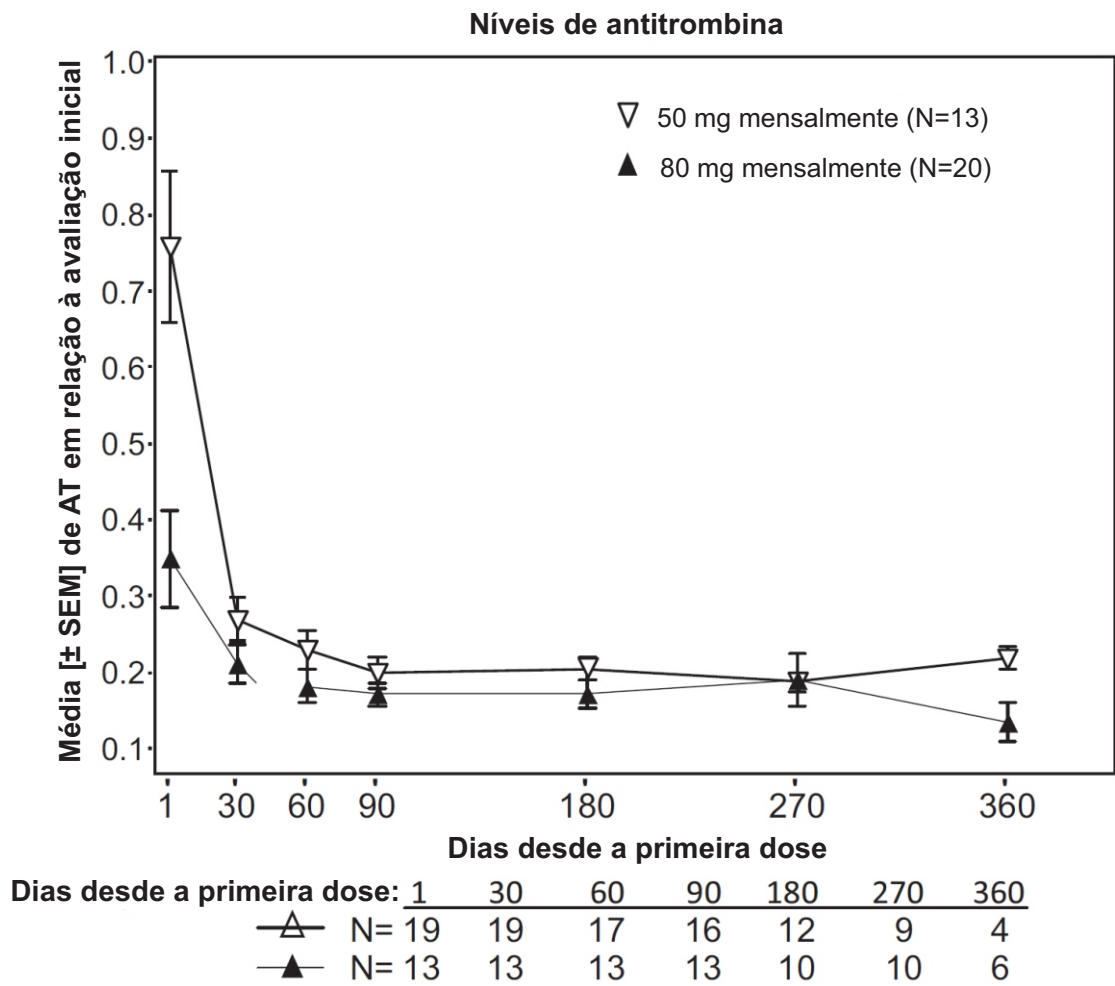
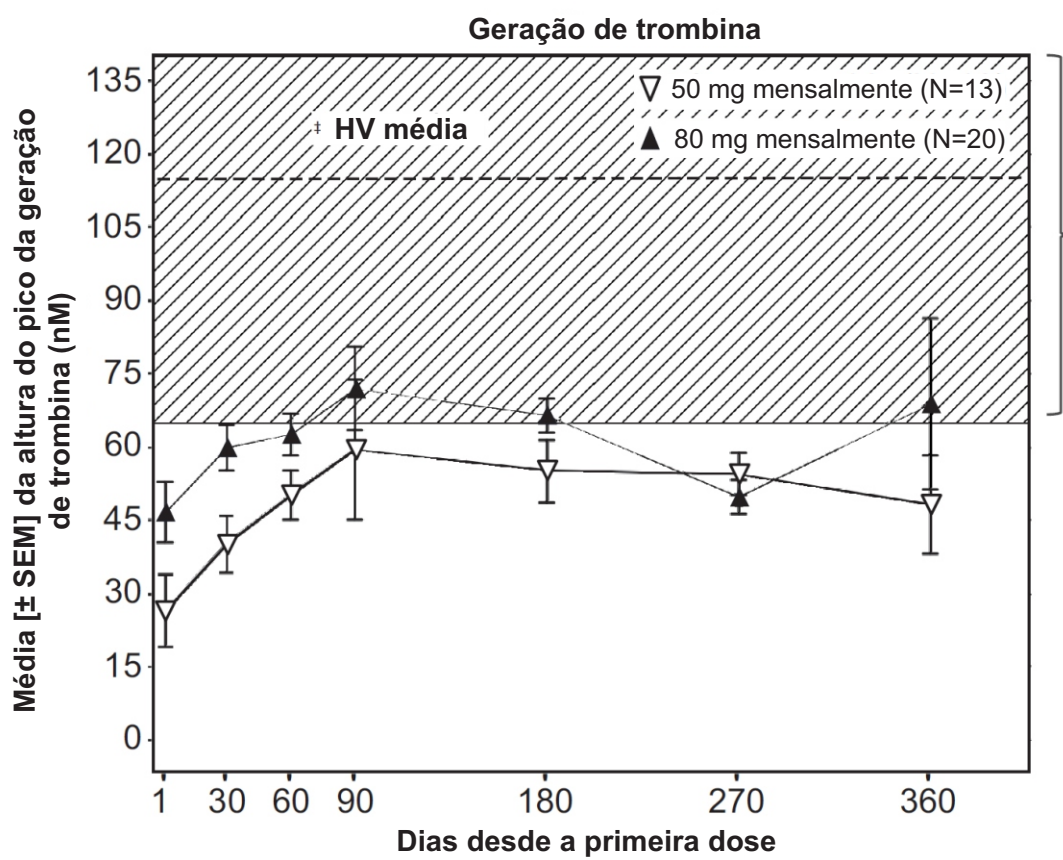


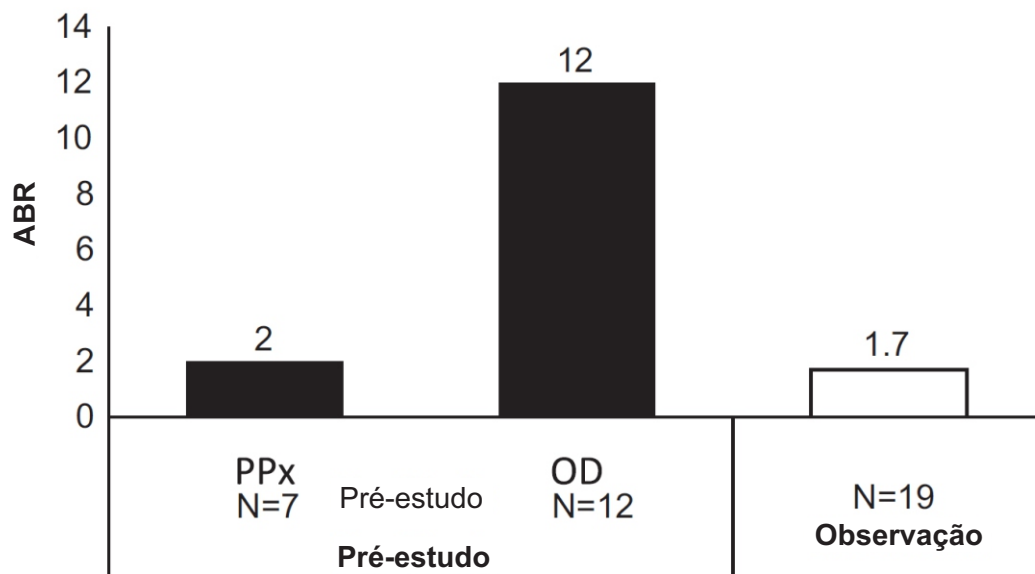
FIG. 19A



Dias desde a primeira dose :	1	30	60	90	180	270	360
—△— N=	17	17	15	13	12	7	4
—▲— N=	12	10	11	11	9	8	5

FIG. 19B

• **Resumo das médias de ABRs em pacientes sem inibidores**

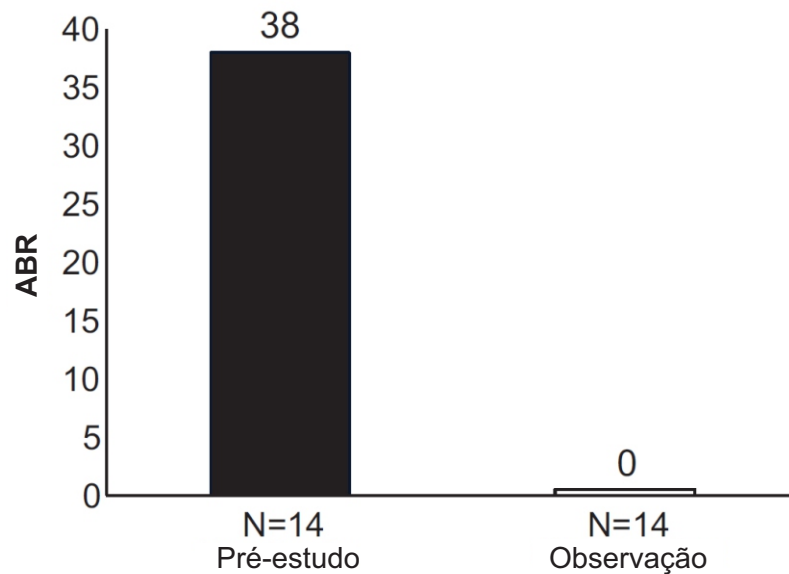


- Duração média no período de observação: 13 meses [faixa: 2 a 19]
- Atividade AT média no período de observação (em relação à avaliação inicial): 22%

† Período de observação definido como dia 29 de tratamento para o mais cedo da transferência dos dados ou 56 dias após a última dose]

ABR taxa hemorrágica anual, AsBR, taxa hemorrágica anual espontânea; PPx, profilaxia; OD: em demanda

**FIG. 20A**

**Resumo das médias de ABRs em pacientes com inibidores**

- Duração média no período de observação: 6 meses [faixa: 1 a 11]
- Atividade AT média no período de observação (em relação à avaliação inicial): 18%

† Período de observação definido como dia 29 de tratamento para o mais cedo da transferência dos dados ou 56 dias após a última dose

ABR taxa hemorrágica anual, AsBR, taxa hemorrágica anual espontânea;

PPx, profilaxia; OD: em demanda

**FIG. 20B**

<b>Características</b>	<b>Pacientes sem inibidores (n=19)</b>	<b>Pacientes com inibidores (n=14)</b>
Hemorragias totais, n	25	68
Pacientes que experimentaram hemorragia(s), n	10	5
<b>Casualidade</b>		
Espontânea	8	50
Traumática	16	18
Outra †	1	-
<b>Local</b>		
Juntas	19	54
Músculo	1	14
Interno	2	-
Pele/mucosa	3	-

† Paciente recebeu tratamento com fator para dor abdominal pois não tinha certeza se era uma hemorragia. Mais tarde percebeu que não era uma hemorragia.

**FIG. 21**

<b>Tratamento de hemorragias</b>	<b>FVIII (n=8)</b>	<b>FIX (n=2)</b>
Recomendação do protocolo	Não mais que 30 UI/kg; re-dosagem após 24 horas se sintomas não melhorarem	Não mais que 50 UI/kg; re-dosagem após 24 horas se sintomas não melhorarem
Hemorragias totais, n	18	7
Administrações totais, n	20	27
Administrações médias por hemorragia (média; faixa)	1 (1.5; 1-7)	3.9 (3; 1-8)
Dose média por injeção	17 (5 – 31) IU/kg	18 (9 – 27) IU/kg
% usando menos que ou a mesma quantidade de fator por hemorragia como antes de fitusiran	100%	100%
Quantidade total média de fator por hemorragia	19 IU/kg	70 IU/kg

FVIII, Fator VIII, FIX, Fator IX  
 Produtos de fator de substituição usados: Advate, Aimafix, Benefix, Eloctate, Haemate, Helixate, Immunate, Immunine, Octanate, Recombinate, Refacto

**FIG. 22**

Tratamento de hemorragias	aPCC (n=4)	rFVIIa (n=1)
Recomendação do protocolo	Até 75 U/kg para hemorragias menores a moderadas e até 100 U/kg (não mais de 200 U/kg/dia) para hemorragias grandes em intervalos de 12 horas; ser continuado até sinais claros de melhora clínica	Até 90 µg/kg a cada 2 horas, ajustável com base na gravidade da hemorragia até a hemostasia ser alcançada. Para hemorragias graves, até 90 µg/kg a cada 3-6 horas após a hemostasia ser alcançada
Hemorragias totais, n	56	3
Administrações totais, n	82	8
Administrações médias por hemorragia (média; faixa)	1.5 (1; 1-3)	2.7 (3; 2-3)
Dose média por injeção	27 (14 – 37) U/kg	59 (37 – 62) µg/kg
% usando menos que ou a mesma quantidade de BPA por hemorragia como antes de fitusiran	95% (53)	100% (3)
Quantidade total média de BPA por hemorragia	40 U/kg	156 µg/kg

aPCC, concentrados de complexos de protrombina ativados; rFVIIa, fator recombinante VIIa; BPA, agente de desvio  
Agentes de desvio usados: FEIBA, NovoSeven, Prothromplex

**FIG. 23**

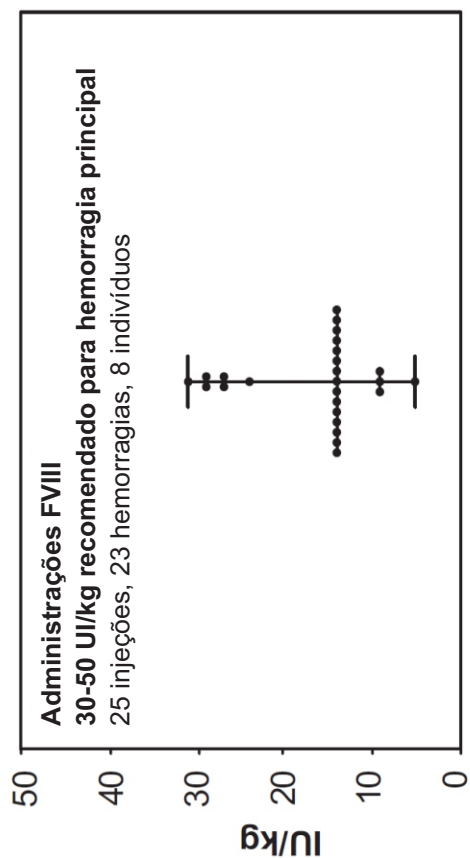


FIG. 24A

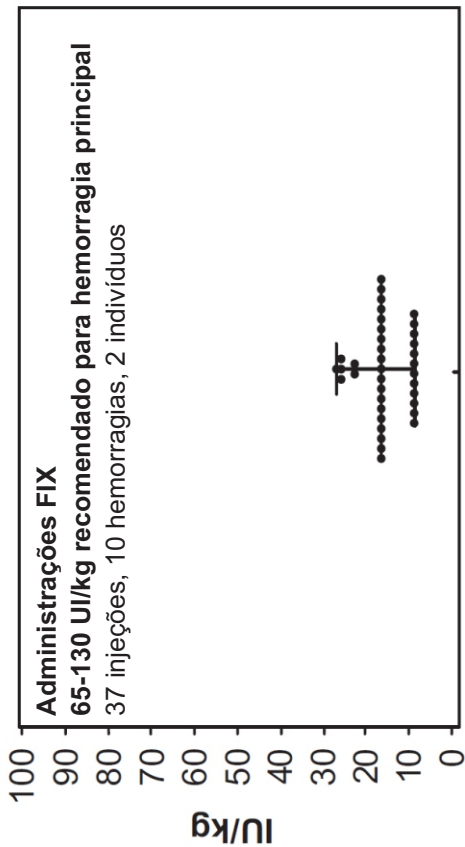


FIG. 24B

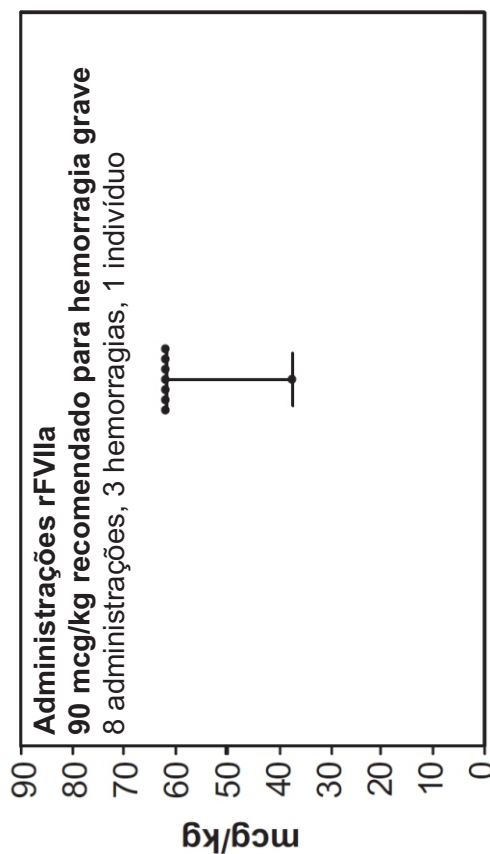


FIG. 24C

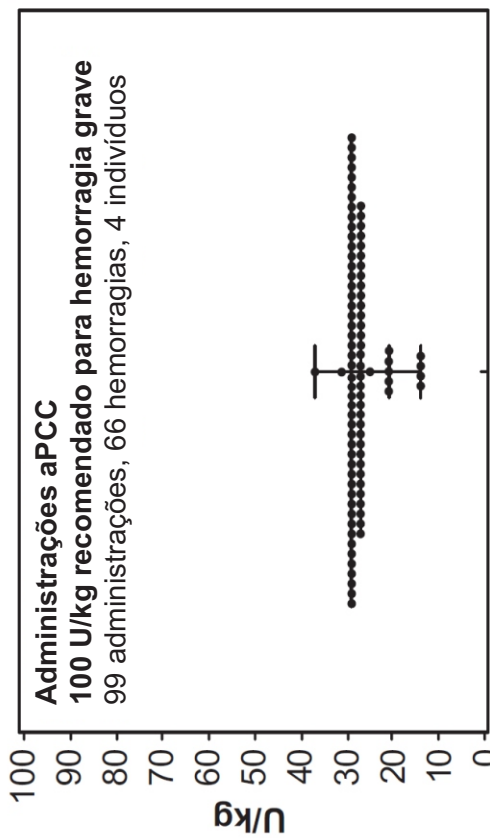


FIG. 24D

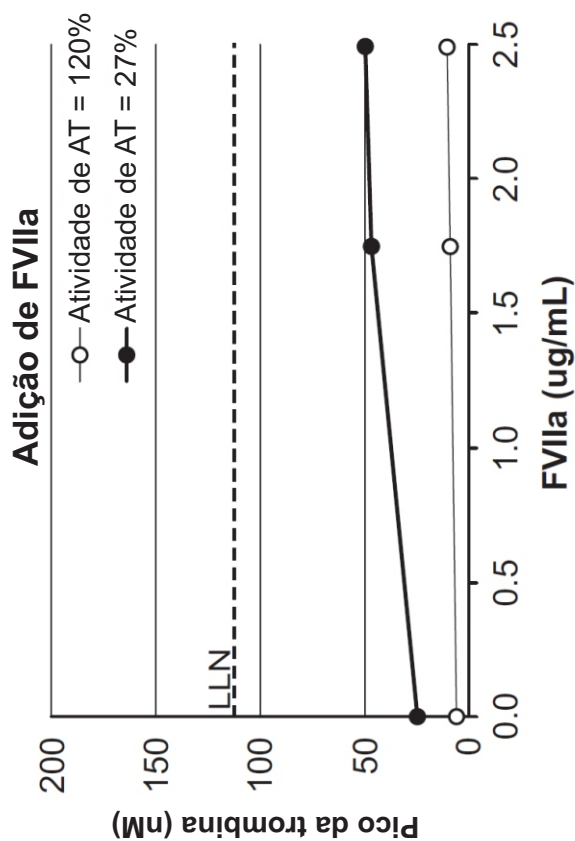


FIG. 25B

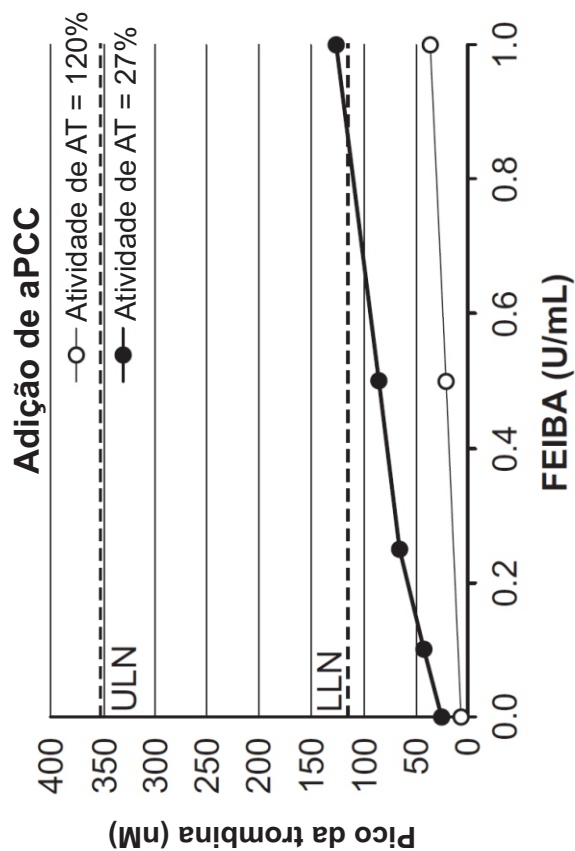


FIG. 25A

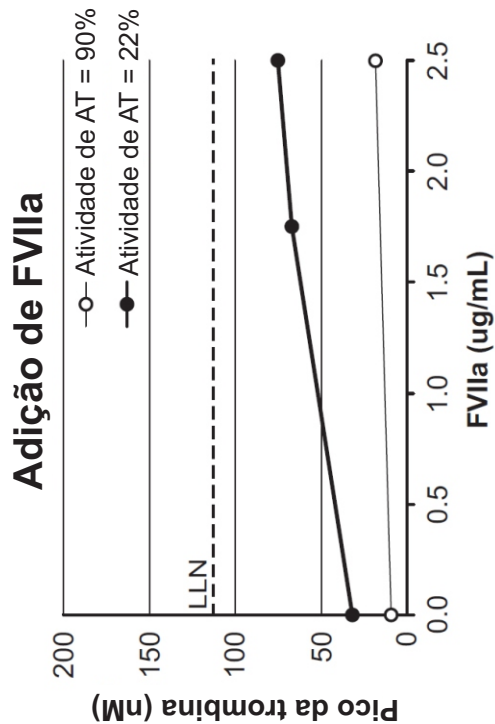


FIG. 26B

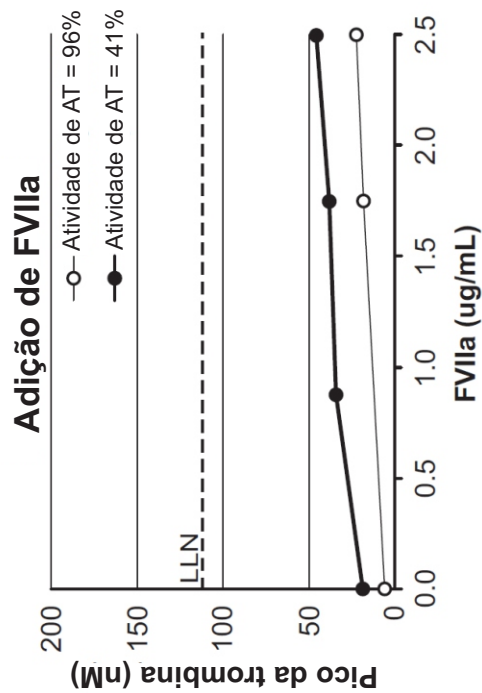


FIG. 26D

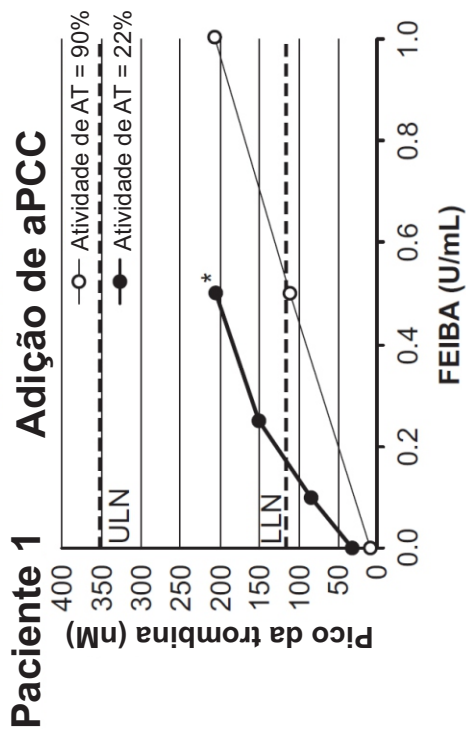


FIG. 26A

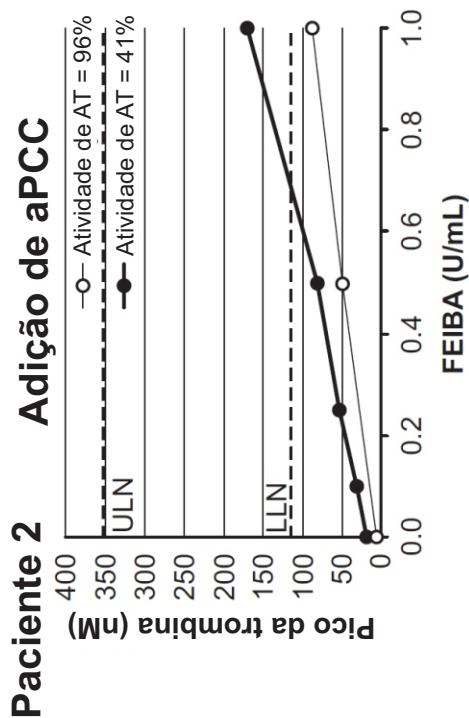


FIG. 26C

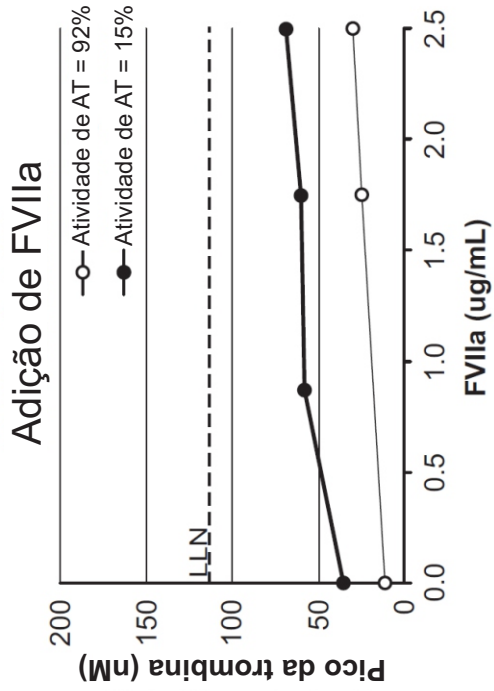


FIG. 26F

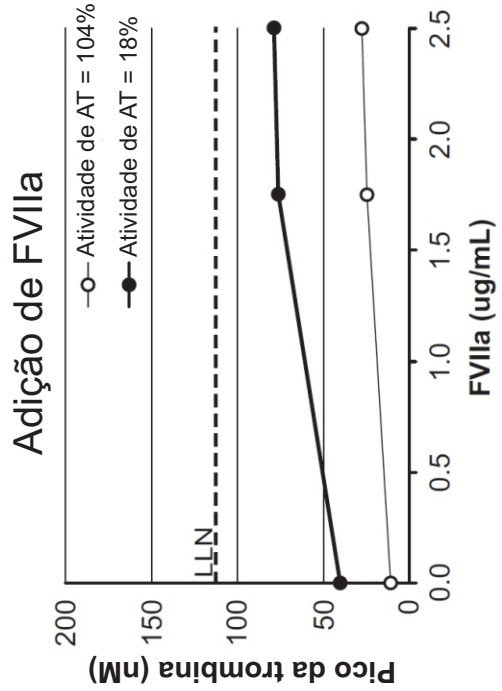


FIG. 26H

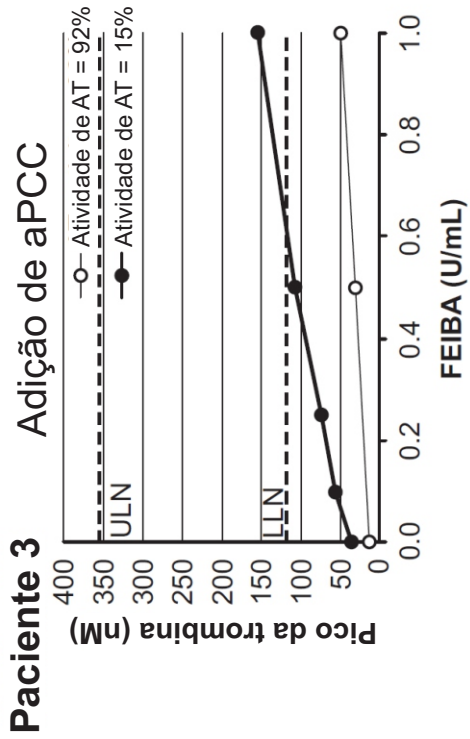


FIG. 26E

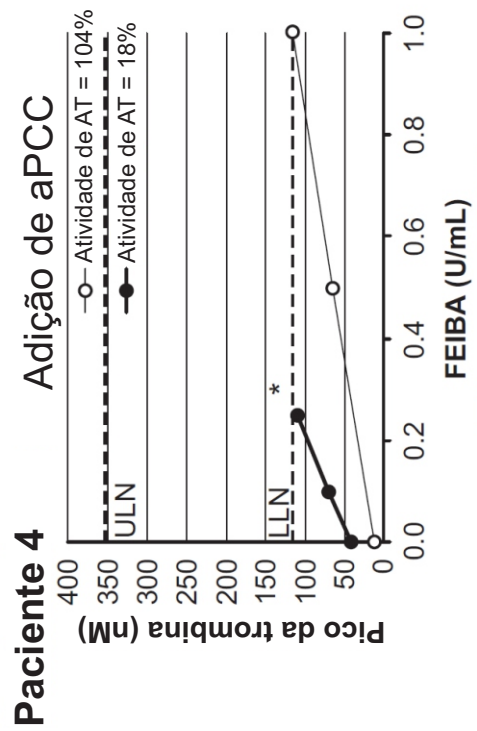


FIG. 26G

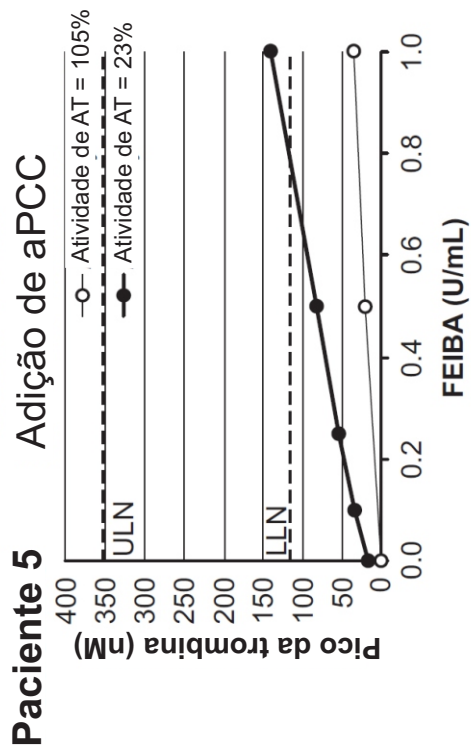


FIG. 26I

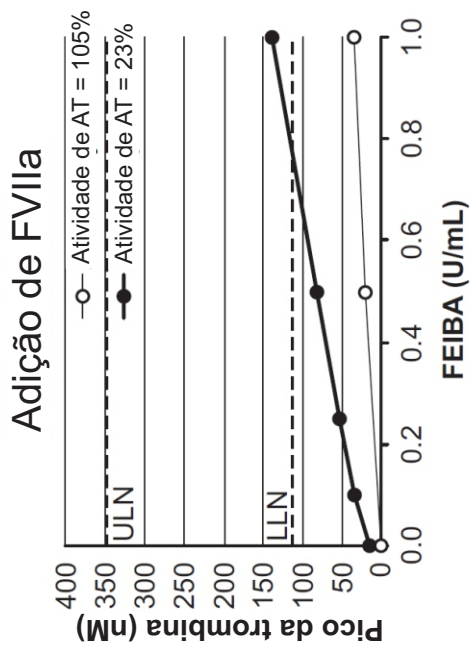


FIG. 26J

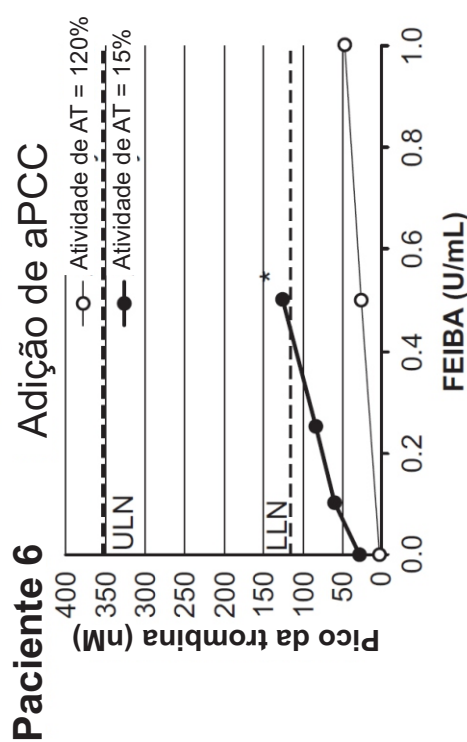


FIG. 26K

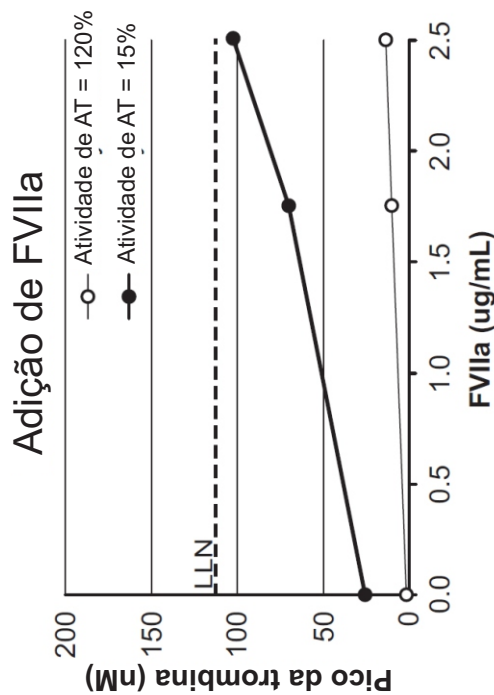


FIG. 26L

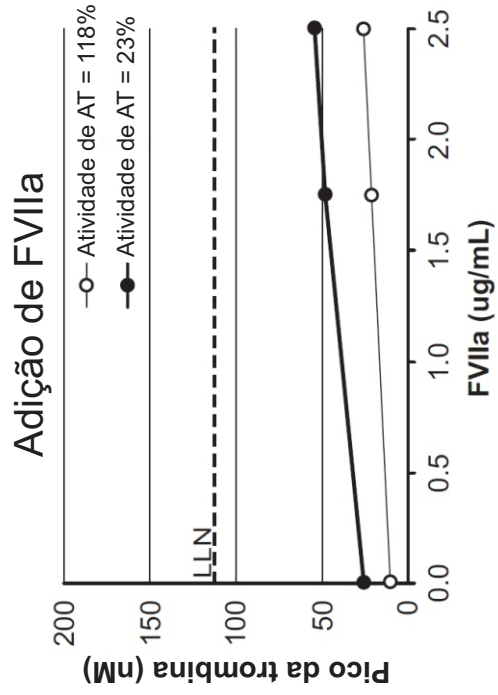


FIG. 26N

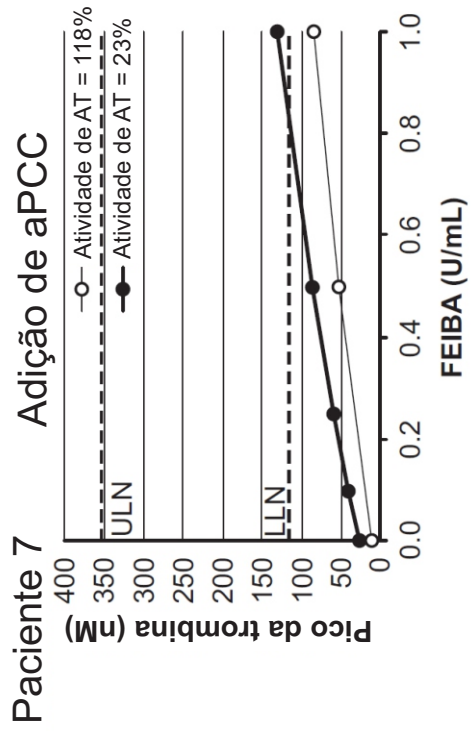
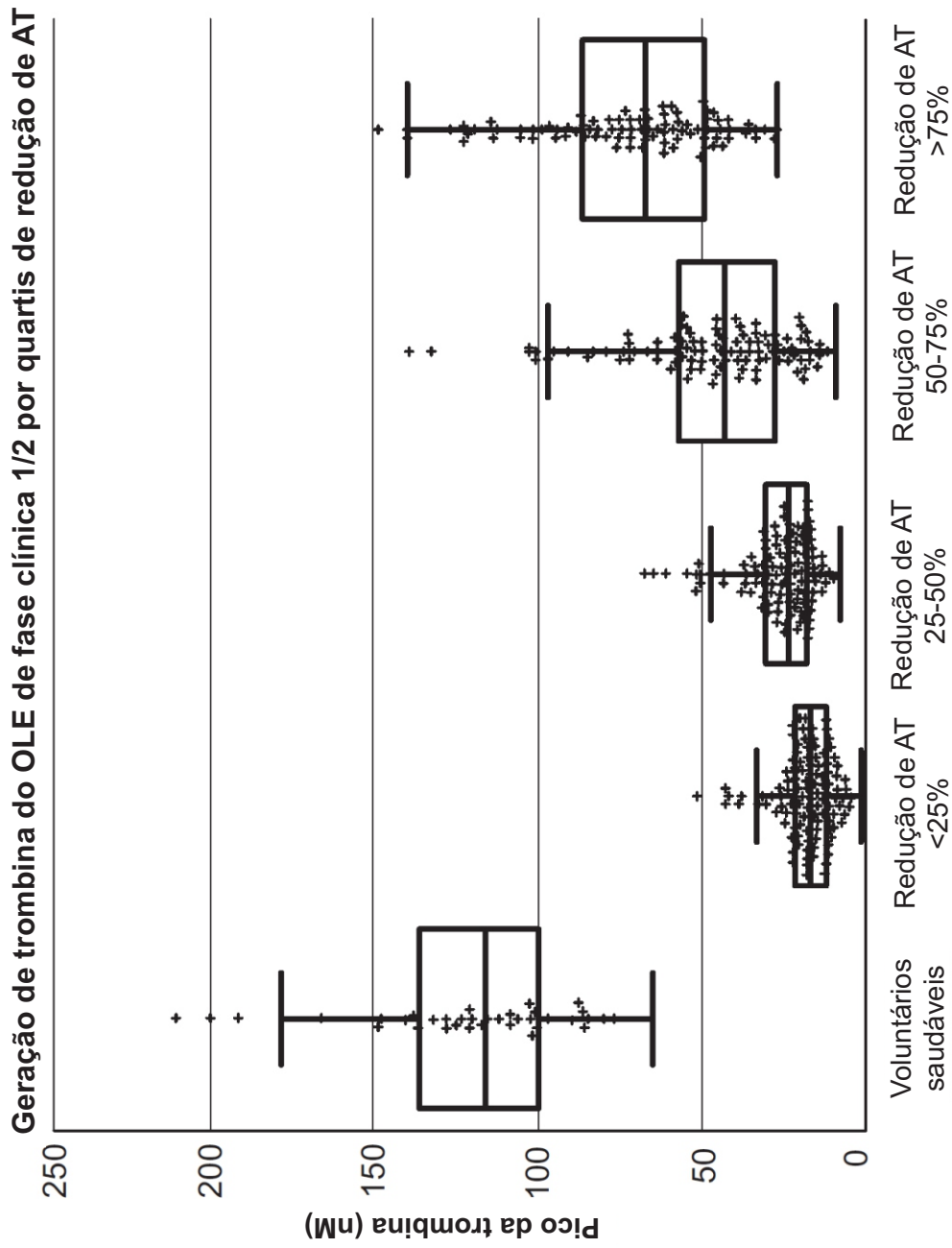
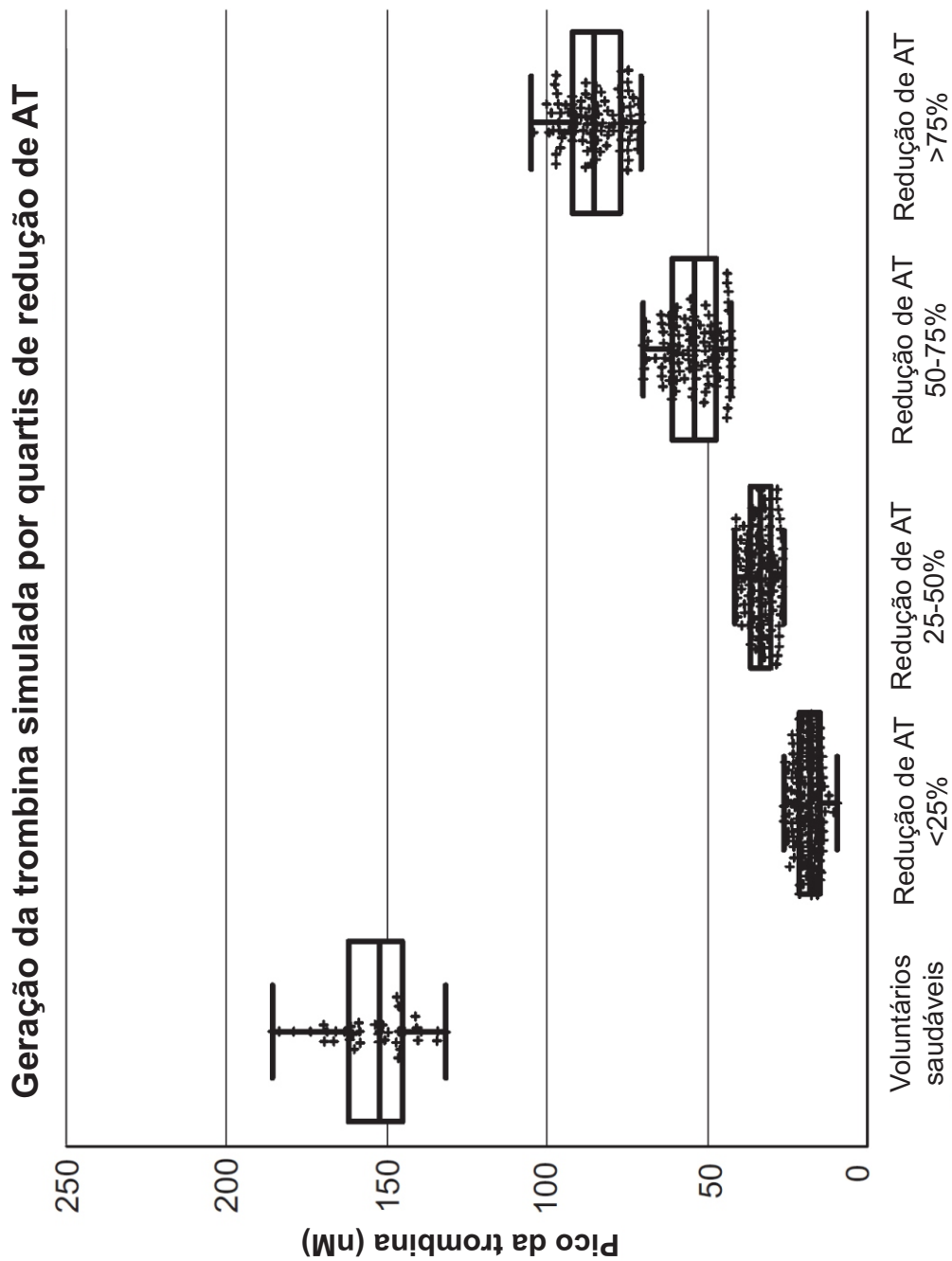


FIG. 26M



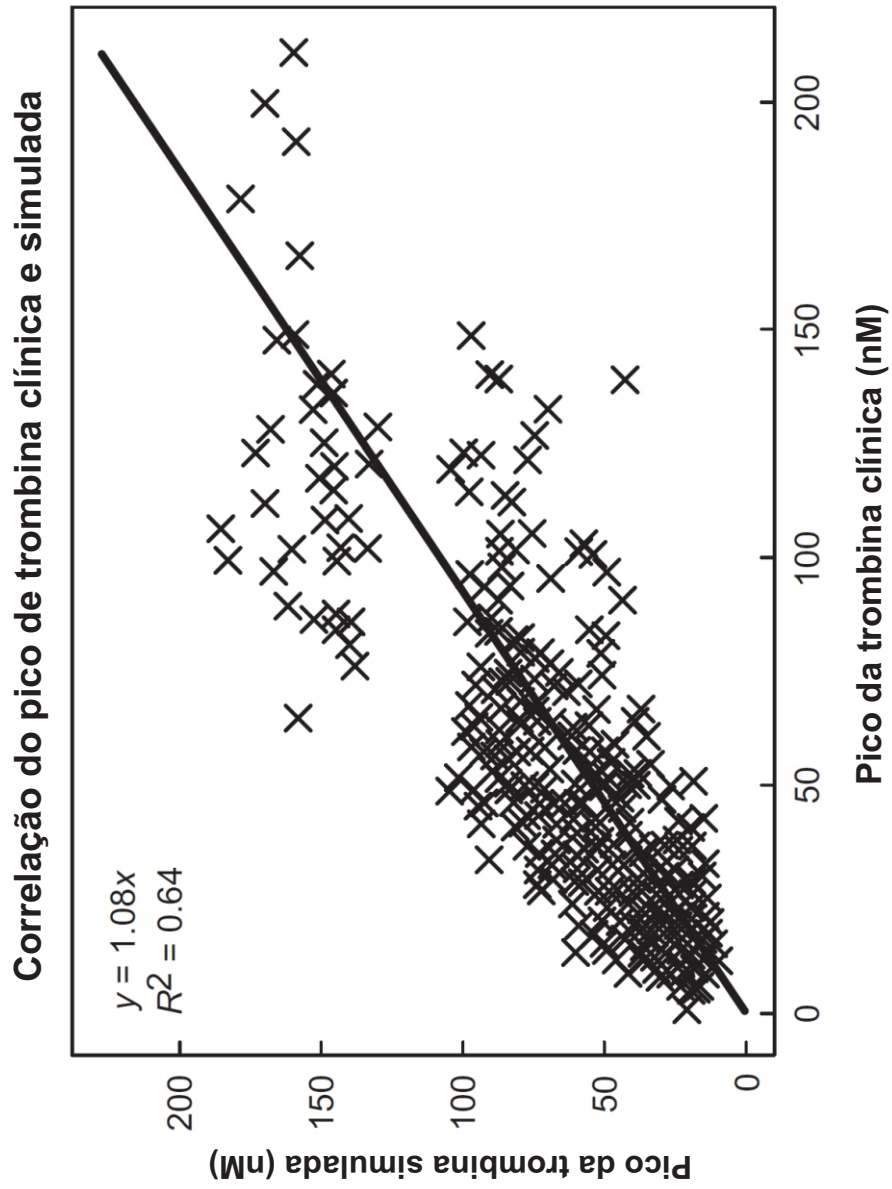
**Medições clínicas**

**FIG. 27A**



Resultados simulados

FIG. 27B



**FIG. 27C**

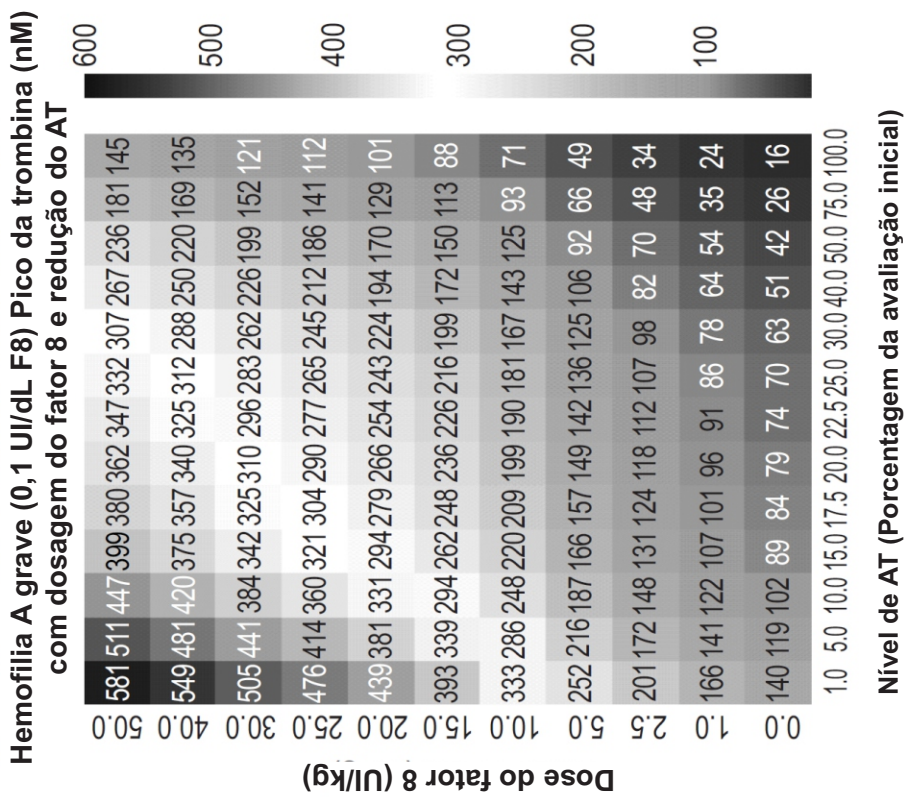


FIG. 28B

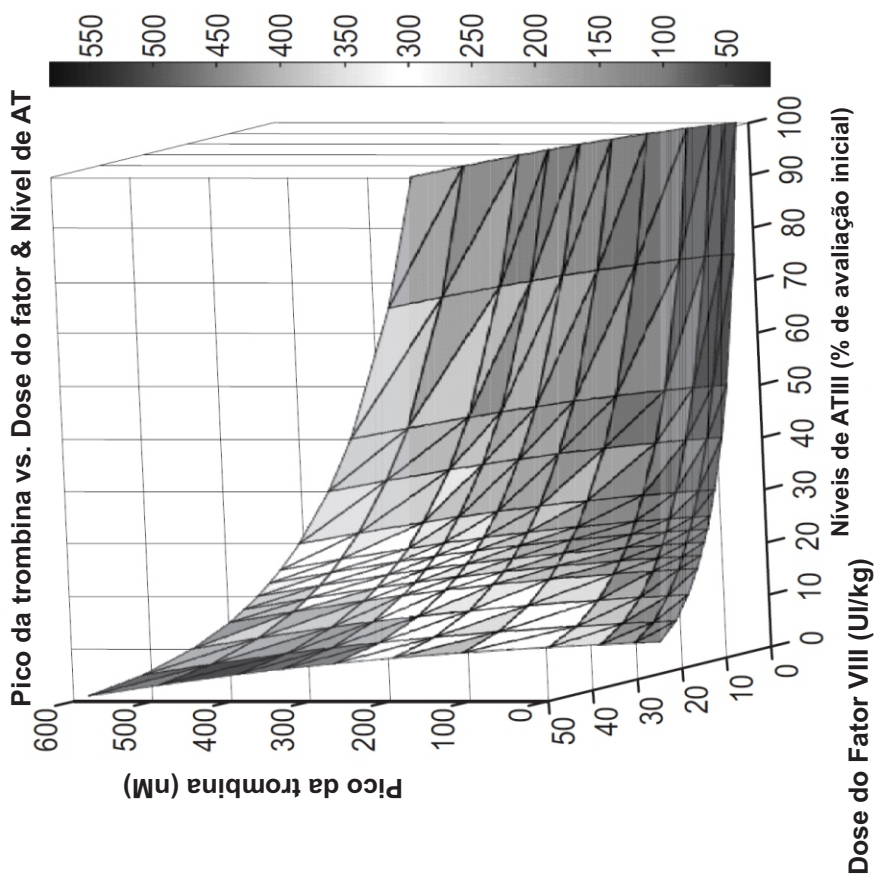
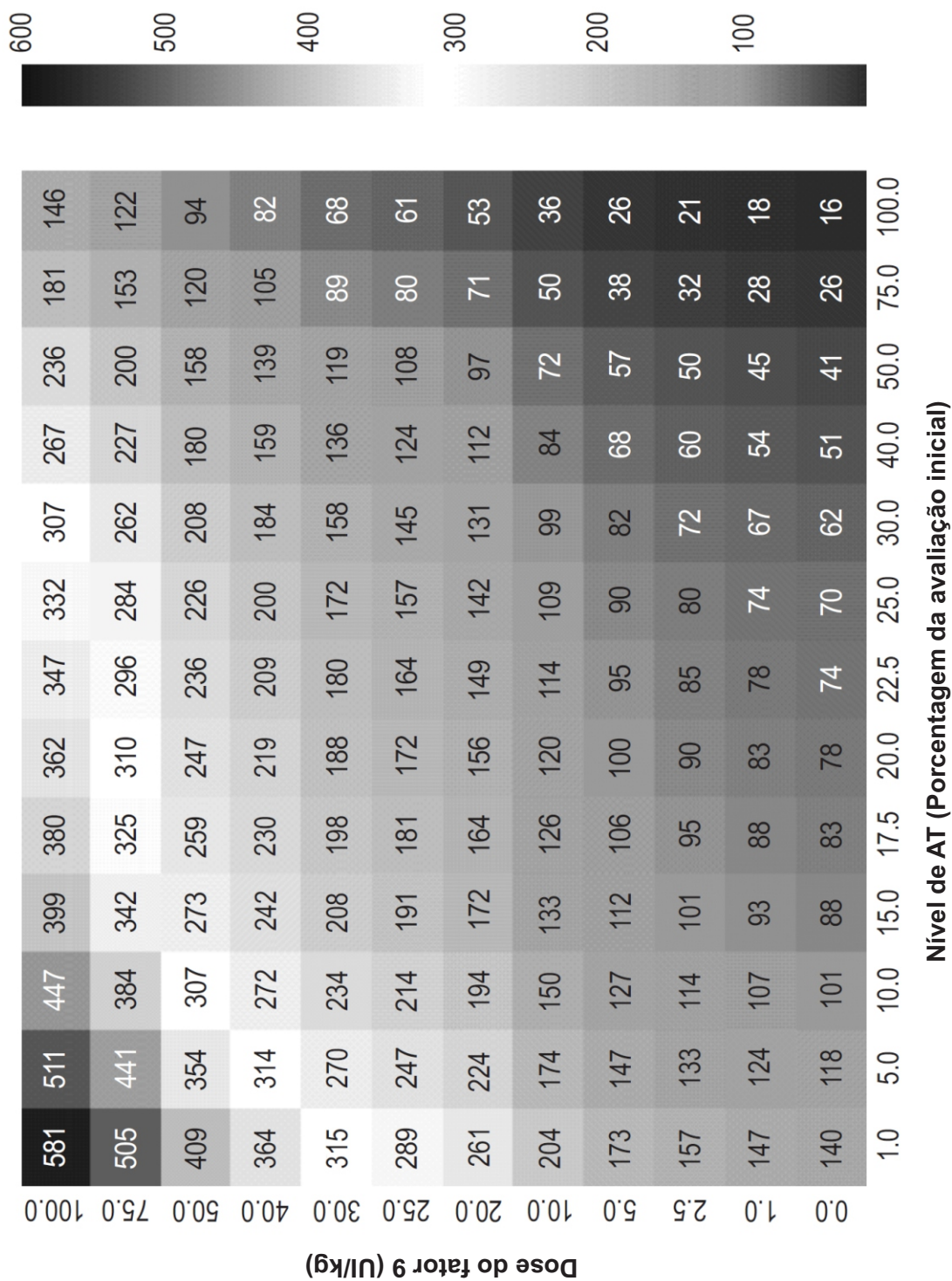
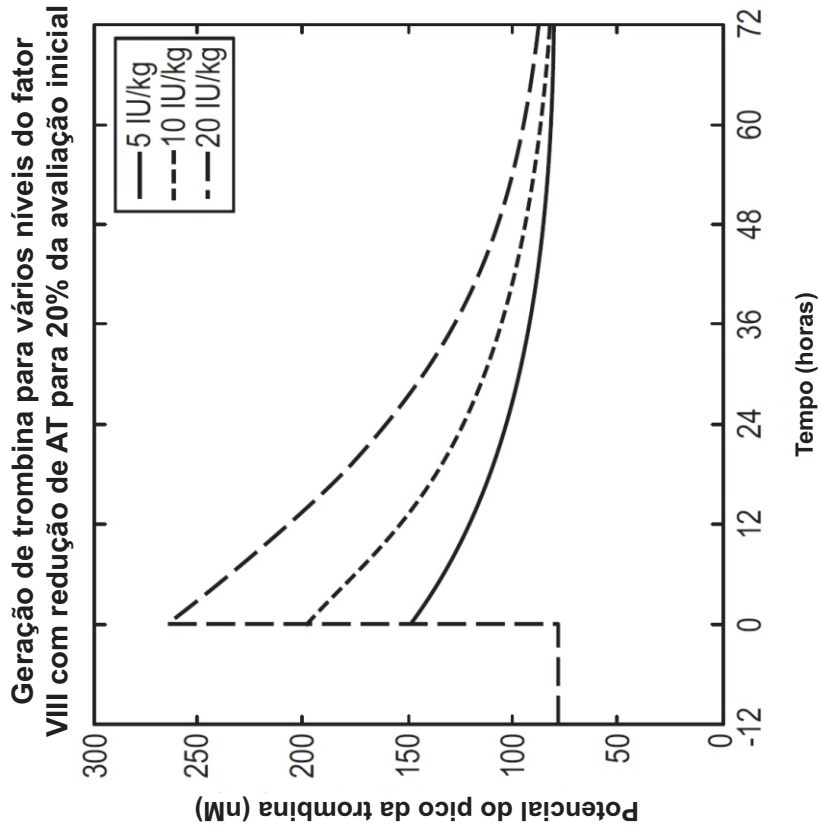


FIG. 28A

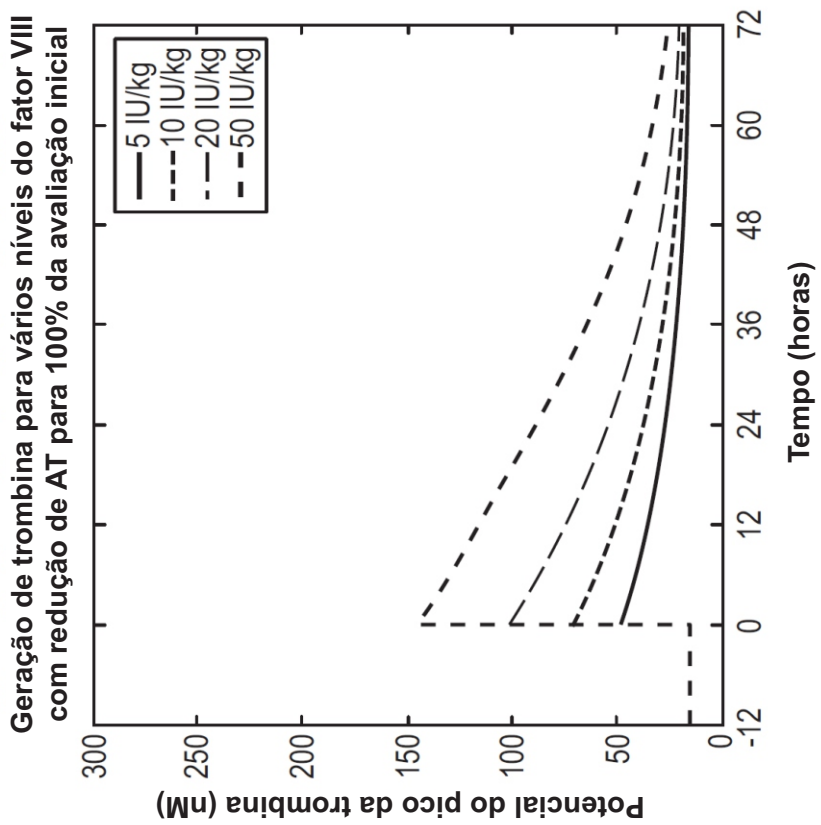


Nível de AT (Porcentagem da avaliação inicial)

FIG. 28C



**FIG. 29B**



**FIG. 29A**

## RESUMO

Patente de Invenção: **"MÉTODOS E COMPOSIÇÕES PARA O TRATAMENTO DE UM CASO DE HEMORRAGIA EM UM INDIVÍDUO COM HEMOFILIA"**.

A presente invenção refere-se ao iRNA, por exemplo, ácido ribonucléico de fita dupla (dsRNA), composições visando o gene *Serpinc1*, e métodos para usar tal iRNA, por exemplo, composições de dsRNA, para tratar um caso de sangramento em um indivíduo com uma hemofilia (por exemplo, com ou sem inibidores).

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

### Código de Controle

Campo 1



Campo 2



### Outras Informações:

- Nome do Arquivo: Listagem de sequência - P244512.TXT
- Data de Geração do Código: 08/01/2020
- Hora de Geração do Código: 14:23:41
- Código de Controle:
  - Campo 1: 729408B11362C148
  - Campo 2: B5A67CCA2DB52E0B