

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 928 500**

51 Int. Cl.:

A61K 31/573 (2006.01)
A61K 31/495 (2006.01)
A61K 31/41 (2006.01)
A61K 31/341 (2006.01)
A61K 31/435 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
A61P 25/02 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.08.2015 PCT/US2015/047185**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **03.03.2016 WO16033326**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.08.2015 E 15835924 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.06.2022 EP 3185957**

54 Título: **Patisirán para su uso en el tratamiento de amiloidosis mediada por transtiretina**

30 Prioridad:

29.08.2014 US 201462044100 P
21.04.2015 US 201562150596 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.11.2022

73 Titular/es:

ALNYLAM PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
675 West Kendall Street, Henri A. Termeer Square
Cambridge, MA 02142, US

72 Inventor/es:

BETTENCOURT, BRIAN

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 928 500 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Patisirán para su uso en el tratamiento de amiloidosis mediada por transtiretina

5 **Antecedentes de la invención**

La transtiretina (TTR) es una proteína tetramérica producida principalmente en el hígado. Las mutaciones en el gen de TTR desestabilizan el tetrámero proteico, lo que conduce a un plegamiento incorrecto de monómeros y agregación en fibrillas amiloides de TTR (ATTR). La deposición tisular da como resultado amiloidosis de ATTR sistémica (Coutinho *et al.*, Forty years of experience with type I amyloid neuropathy. Resumen de 483 casos. En los documentos: Glenner *et al.*, Amyloid and Amyloidosis, Amsterdam: Excerpta Media, 1980 págs. 88-93; Hou *et al.*, Transthyretin and familial amyloidotic polyneuropathy. Recent progress in understanding the molecular mechanism of neurodegeneration. FEBS J 2007, 274: 1637-1650; Westermark *et al.*, Fibril in senile systemic amyloidosis is derived from normal transthyretin. Proc Natl Acad Sci USA 1990, 87: 2843-2845). Más de 100 mutaciones de TTR notificadas exhiben un espectro de síntomas de enfermedad.

La amiloidosis por TTR se manifiesta en diversas formas. Cuando el sistema nervioso periférico se ve afectado de manera más prominente, la enfermedad se denomina polineuropatía amiloide familiar (FAP). Cuando el corazón está implicado principalmente pero el sistema nervioso no lo está, la enfermedad se denomina miocardiopatía amiloide familiar (FAC). Un tercer tipo principal de amiloidosis por TTR se denomina amiloidosis leptomeníngea/de SNC (sistema nervioso central).

Las mutaciones más comunes asociadas con la polineuropatía amiloide familiar (FAP) y la miocardiopatía asociada con ATTR, respectivamente, son Val30Met (Coelho *et al.*, Tafamidis for transthyretin familial amyloid polyneuropathy: a randomized, controlled trial. Neurology 2012, 79: 785-792) y Val122Ile (Connors *et al.*, Cardiac amyloidosis in African Americans: comparison of clinical and laboratory features of transthyretin V122I amyloidosis and immunoglobulin light chain amyloidosis. Am Heart J 2009, 158: 607-614).

Opciones de tratamiento actuales para FAP se centran en estabilizar o disminuir la cantidad de proteína amiloidogénica circulante. El trasplante de hígado ortotópico reduce los niveles de TTR mutante (Holmgren *et al.*, Biochemical effect of liver transplantation in two Swedish patients with familial amyloidotic polyneuropathy (FAP-met30). Clin Genet 1991, 40: 242-246), con supervivencia mejorada notificada en pacientes con FAP en etapa temprana, aunque la deposición de TTR de tipo silvestre puede continuar (Yazaki *et al.*, Progressive wild-type transthyretin deposition after liver transplantation preferentially occurs into myocardium in FAP patients. Am J Transplant 2007, 7:235-242; Adams *et al.*, Rapid progression of familial amyloid polyneuropathy: a multinational natural history study Neurology 25 de agosto de 2015; 85(8) 675-82; Yamashita *et al.*, Long-term survival after liver transplantation in patients with familial amyloid polyneuropathy. Neurology 2012, 78: 637-643; Okamoto *et al.*, Liver transplantation for familial amyloidotic polyneuropathy: impact on Swedish patients' survival. Liver Transpl 2009, 15:1229-1235; Stangou *et al.*, Progressive cardiac amyloidosis following liver transplantation for familial amyloid polyneuropathy: implications for amyloid fibrillogenesis. Transplantation 1998, 66:229-233; Fosby *et al.*, Liver transplantation in the Nordic countries - An intention to treat and post-transplant analysis from The Nordic Liver Transplant Registry 1982-2013. Scand J Gastroenterol. Junio de 2015; 50(6):797-808. Transplantation, en prensa).

Tafamidis y diflunisal estabilizan los tetrámeros de TTR circulantes, lo que puede ralentizar la tasa de progresión de la enfermedad (Berk *et al.*, Repurposing diflunisal for familial amyloid polyneuropathy: a randomized clinical trial. JAMA 2013, 310: 2658-2667; Coelho *et al.*, 2012; Coelho *et al.*, Long-term effects of tafamidis for the treatment of transthyretin familial amyloid polyneuropathy. J Neurol 2013, 260: 2802-2814; Lozoron *et al.*, Effect on disability and safety of Tafamidis in late onset of Met30 transthyretin familial amyloid polyneuropathy. Eur J Neurol 2013, 20: 1539-1545). Sin embargo, los síntomas continúan empeorando con el tratamiento en una gran proporción de pacientes, destacando la necesidad de nuevas opciones de tratamiento de modificación de enfermedad para FAP.

La descripción del ARNbc que selecciona como diana TTR puede encontrarse en, por ejemplo, la solicitud de patente internacional n.º PCT/US2009/061381 (WO2010/048228) y la solicitud de patente internacional n.º PCT/US2010/055311 (WO2011/056883). Coelho *et al.* (2013), *New England Journal of Medicine*, que incluye el material complementario del mismo, describe el resultado de un estudio clínico de fase I con ALN-TTR02. Coelho *et al.* (2015), *Neurology*, 84 (Suplemento 14) describe los resultados del estudio clínico de fase II con patisirán.

Sumario

La presente invención se caracteriza por las reivindicaciones. En el presente documento se describen, pero no forman parte de la invención reivindicada, métodos para reducir o detener un aumento en una puntuación de deterioro de neuropatía (NIS, de sus siglas en inglés *Neuropathy Impairment Score*) o una NIS modificada (mNIS+7) en un sujeto humano mediante la administración de una cantidad eficaz de una composición de inhibición de transtiretina (TTR), en donde la cantidad eficaz reduce una concentración de proteína TTR en suero del sujeto humano por debajo de 50 µg/ml o en al menos un 80 %. También se describen en el presente documento, pero no forman parte de la invención reivindicada, métodos para ajustar una dosis de una composición de inhibición de TTR para el tratamiento

del aumento de NIS o polineuropatía amiloide familiar (FAP) administrando la composición de inhibición de TTR a un sujeto que tiene aumento de NIS o FAP, y determinar un nivel de proteína TTR en el sujeto que tiene el aumento de NIS o FAP. En algunos aspectos, la cantidad de la composición de inhibición de TTR administrada posteriormente al sujeto se aumenta si el nivel de proteína TTR es superior a 50 µg/ml, y la cantidad de la composición de inhibición de TTR administrada posteriormente al sujeto se disminuye si el nivel de proteína TTR está por debajo de 50 µg/ml. También se describen en el presente documento versiones formuladas de un ARNip de inhibición de TTR.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un gráfico que ilustra la relación entre la progresión en la concentración de TTR y Δ NIS o Δ mNIS+7.

La figura 2 es un gráfico que ilustra la relación entre la progresión en la concentración de TTR y Δ NIS o Δ mNIS+7.

Descripción detallada

Como se describe con más detalle a continuación, métodos que se dan a conocer en el presente documento, pero que no forman parte de la invención reivindicada, para reducir o detener un aumento en una puntuación de deterioro de neuropatía (NIS) o una NIS modificada (mNIS+7) en un sujeto humano mediante la administración de una cantidad eficaz de una composición de inhibición de transtiretina (TTR), de modo que la cantidad eficaz reduce una concentración de proteína TTR en suero por debajo de 50 µg/ml o en al menos un 80 %. Según la invención, la composición de inhibición de TTR es patisiran. El patisiran es un ácido ribonucleico pequeño de interferencia (ARNip) que es específico para TTR, formulado en una nanopartícula lipídica hepatotrópica (LNP) para administración intravenosa (IV).

Composiciones de inhibición de TTR

Los métodos descritos en el presente documento, pero que no forman parte de la invención reivindicada, incluyen la administración de una composición de inhibición de TTR. Una composición de inhibición de TTR puede ser cualquier compuesto que reduzca una concentración de proteína TTR en el suero de un sujeto humano. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a, ARNi, por ejemplo, ARNip. Ejemplos de ARNip incluyen ARNip que selecciona como diana un gen de TTR, por ejemplo, patisiran (descrito con más detalle) a continuación y revusiran. Ejemplos también incluyen ARN antisentido. Ejemplos de ARN antisentido que seleccionan como diana un gen de TTR pueden encontrarse en la patente de estadounidense n.º 8.697.860.

La composición de inhibición de TTR inhibe la expresión de un gen de TTR. Como se usa en el presente documento, "transtiretina" ("TTR") se refiere a un gen en una célula. La TTR también se conoce como ATTR, HsT2651, PALB, prealbúmina, TBPA, y transtiretina (prealbúmina, amiloidosis tipo I). La secuencia de un transcrito de ARNm de TTR humana puede encontrarse en NM_000371. La secuencia de ARNm de TTR de ratón puede encontrarse en NM_013697.2, y la secuencia de ARNm de TTR de rata puede encontrarse en NM_012681.1.

Los términos "silenciar", "inhibir la expresión de", "regular por disminución la expresión de", "suprimir la expresión de" y similares en la medida en que se refieran a un gen de TTR, en el presente documento se refieren a la supresión al menos parcial de la expresión de un gen de TTR, como se manifiesta por una reducción de la cantidad de ARNm que puede aislarse a partir de una primera célula o grupo de células en las que se transcribe un gen de TTR y que se ha o se han tratado de manera que se inhibe la expresión de un gen de TTR, en comparación con una segunda célula o grupo de células sustancialmente idénticas a la primera célula o grupo de células pero que no se ha o no se han tratado (células de control). El grado de inhibición generalmente se expresa en términos de

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

Alternativamente, el grado de inhibición puede proporcionarse en términos de una reducción de un parámetro que está funcionalmente unido a la expresión génica de TTR, por ejemplo, la cantidad de proteína codificada por un gen de TTR que se secreta por una célula, o el número de células que muestran un determinado fenotipo, por ejemplo, apoptosis. En principio, el silenciamiento génico de TTR puede determinarse en cualquier célula que exprese la diana, o bien constitutivamente o por modificación por ingeniería genómica, y mediante cualquier ensayo apropiado. Sin embargo, cuando se necesita una referencia para determinar si un ARNbc dado inhibe la expresión de un gen de TTR en un determinado grado y, por lo tanto, se abarca por la presente divulgación, los ensayos proporcionados en los ejemplos a continuación deben servir como referencia.

ARNi

En algunos aspectos, los métodos descritos en el presente documento, pero que no forman parte de la invención reivindicada, usan una composición de inhibición de TTR que es un ARNi, por ejemplo, un ARNip, por ejemplo, un

ARNbc para inhibir la expresión de un gen de TTR. En un aspecto, el ARNip es un ARNbc que selecciona como diana un gen de TTR. El ARNbc incluye una hebra de antisentido que tiene una región de complementariedad que es complementaria a al menos una parte de un ARNm formado en la expresión de un gen de TTR, y donde la región de complementariedad es de menos de 30 nucleótidos de longitud, generalmente 19-24 nucleótidos de longitud. El ARNbc de la divulgación puede incluir además uno o más salientes de nucleótidos monocatenarios. Se describen ARNip de inhibición de TTR en la solicitud de patente internacional n.º PCT/US2009/061381 (WO2010/048228) y la solicitud de patente internacional n.º PCT/US2010/055311 (WO2011/056883).

En un aspecto, la composición de inhibición de TTR es patisirán, descrita con más detalle a continuación. En otro aspecto, la composición de inhibición de TTR es revusiran, un ARNip específico para TTR conjugado con una agrupación de carbohidratos GalNAc trivalente. Puede encontrarse una descripción completa de revusiran en la solicitud internacional número PCT/US2012/065691 y la publicación de patente estadounidense US20140315835.

Un ARNbc incluye dos hebras de ARN que son suficientemente complementarias para hibridarse para formar una estructura bicatenaria. Una hebra del ARNbc (la hebra de antisentido) incluye una región de complementariedad que es sustancialmente complementaria, y generalmente completamente complementaria, a una secuencia diana, derivada de la secuencia de un ARNm formado durante la expresión de un gen de TTR, la otra hebra (la hebra de sentido) incluye una región que es complementaria a la hebra de antisentido, de modo que las dos hebras hibridan y forman una estructura bicatenaria cuando se combinan en condiciones adecuadas. El término "hebra de antisentido" se refiere a la hebra de un ARNbc que incluye una región que es sustancialmente complementaria a una secuencia diana. Como se usa en el presente documento, el término "región de complementariedad" se refiere a la región en la hebra de antisentido que es sustancialmente complementaria a una secuencia, por ejemplo, una secuencia diana, como se define en el presente documento. Cuando la región de complementariedad no es completamente complementaria a la secuencia diana, los emparejamientos erróneos son los más tolerados en las regiones terminales y, si están presentes, generalmente están en una región o regiones terminales, por ejemplo, dentro de 6, 5, 4, 3, o 2 nucleótidos del extremo terminal 5' y/o 3'. El término "hebra de sentido", como se usa en el presente documento, se refiere a la hebra de un ARNbc que incluye una región que es sustancialmente complementaria a una región de la hebra de antisentido. Generalmente, la estructura bicatenaria está entre 15 y 80, o 15 y 60 o 15 y 30 o entre 25 y 30, o entre 18 y 25, o entre 19 y 24, o entre 19 y 21, o 19, 20, o 21 pares de bases de longitud. En un aspecto, la estructura bicatenaria tiene 19 pares de bases de longitud. En otro aspecto, la estructura bicatenaria tiene 21 pares de bases de longitud.

Cada hebra de un ARNbc está generalmente entre 15 y 80 o 15 y 60 o 15 y 30, o entre 18 y 25, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 nucleótidos de longitud. En otros aspectos, cada una es una hebra de una longitud de 25-30 nucleótidos. Cada hebra de la estructura bicatenaria puede tener la misma longitud o diferentes longitudes. Cuando se usan dos ARNip diferentes en combinación, las longitudes de cada hebra de cada ARNip pueden ser idénticas o pueden diferir.

Un ARNbc puede incluir uno o más salientes monocatenarios de uno o más nucleótidos. En un aspecto, al menos un extremo del ARNbc tiene un saliente de nucleótido monocatenario de 1 a 4, generalmente 1 o 2 nucleótidos. En otro aspecto, la hebra de antisentido del ARNbc tiene 1-10 salientes de nucleótidos cada uno en el extremo 3' y el extremo 5' sobre la hebra de sentido. En aspectos adicionales, la hebra de sentido del ARNbc tiene 1-10 salientes de nucleótidos cada uno en el extremo 3' y el extremo 5' sobre la hebra de antisentido.

Como se usa en el presente documento, y a menos que se indique de otro modo, el término "complementaria", cuando se usa para describir una primera secuencia de nucleótidos en relación con una segunda secuencia de nucleótidos, se refiere a la capacidad de un oligonucleótido o polinucleótido que comprende la primera secuencia de nucleótidos para hibridar y formar una estructura bicatenaria en ciertas condiciones con un oligonucleótido o polinucleótido que comprende la segunda secuencia de nucleótidos, como entenderá el experto en la técnica. Tales condiciones pueden, por ejemplo, ser condiciones rigurosas, donde las condiciones rigurosas pueden incluir: NaCl 400 mM, PIPES 40 mM pH 6,4, EDTA 1 mM, 50 °C o 70 °C durante 12-16 horas seguido de lavado. Pueden aplicarse otras condiciones, tales como condiciones fisiológicamente relevantes que pueden encontrarse dentro de un organismo. El experto será capaz de determinar el conjunto de condiciones más apropiadas para una prueba de complementariedad de dos secuencias según la aplicación final de los nucleótidos hibridados.

Esto incluye el apareamiento de bases del oligonucleótido o polinucleótido que comprende la primera secuencia de nucleótidos con el oligonucleótido o polinucleótido que comprende la segunda secuencia de nucleótidos en toda la longitud de la primera y segunda secuencia de nucleótidos. Tales secuencias pueden denominarse "completamente complementarias" entre sí en el presente documento. Sin embargo, donde una primera secuencia se denomina "sustancialmente complementaria" con respecto a una segunda secuencia en el presente documento, las dos secuencias pueden ser completamente complementarias, o pueden formar uno o más, pero generalmente no más de 4, 3 o 2 pares de bases no emparejados de manera errónea tras la hibridación, conservando al mismo tiempo la capacidad de hibridarse en las condiciones más relevantes para su aplicación final. Sin embargo, donde se diseñan dos oligonucleótidos para formar, tras la hibridación, uno o más salientes monocatenarios, tales salientes no se considerarán como emparejamientos erróneos con respecto a la determinación de complementariedad. Por ejemplo, un ARNbc que comprende un oligonucleótido de 21 nucleótidos de longitud y otro oligonucleótido de 23 nucleótidos de longitud, en donde el oligonucleótido más largo comprende una secuencia de 21 nucleótidos que es completamente

complementaria al oligonucleótido más corto, todavía puede denominarse “completamente complementario” para los fines descritos en el presente documento.

5 Secuencias “complementarias”, como se usa en el presente documento, también pueden incluir, o formarse completamente a partir de, pares de bases no de Watson-Crick y/o pares de bases formados a partir de nucleótidos no naturales y modificados, en la medida en que se cumplan los requisitos anteriores con respecto a su capacidad de hibridación. Tales pares de bases no de Watson-Crick incluyen, pero no se limitan a, apareamiento de bases de Hoogsteen o Wobble G:U.

10 Los términos “complementaria”, “completamente complementaria” y “sustancialmente complementaria” en el presente documento pueden usarse con respecto a la coincidencia de bases entre la hebra de sentido y la hebra de antisentido de un ARNbc, o entre la hebra de antisentido de un ARNbc y una secuencia diana, como se entenderá a partir del contexto de su uso.

15 Como se usa en el presente documento, un polinucleótido que es “sustancialmente complementario a al menos parte de” un ARN mensajero (ARNm) se refiere a un polinucleótido que es sustancialmente complementario a una parte contigua del ARNm de interés (por ejemplo, un ARNm que codifica TTR) que incluye una UTR 5', un marco de lectura abierto (ORF, por sus siglas en inglés), o una UTR 3'. Por ejemplo, un polinucleótido es complementario a al menos una parte de un ARNm de TTR si la secuencia es sustancialmente complementaria a una parte no interrumpida de un ARNm que codifica TTR.

20 Un ARNbc puede sintetizarse por métodos estándar conocidos en la técnica como se analiza adicionalmente a continuación, por ejemplo, mediante el uso de un sintetizador de ADN automatizado, tales como los disponibles comercialmente de, por ejemplo, Biosearch, Applied Biosystems, Inc.

25 **ARNbc modificado**

30 En algunos aspectos, el ARNbc usado en los métodos descritos en el presente documento, pero que no forma parte de la invención reivindicada, se modifica químicamente para mejorar la estabilidad. Los ácidos nucleicos caracterizados en el presente documento pueden sintetizarse y/o modificarse mediante métodos bien establecidos en la técnica, tales como los descritos en “Current protocols in nucleic acid chemistry”, Beaucage, S.L. *et al.* (Eds.), John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, NY, EE. UU. Ejemplos específicos de compuestos de ARNbc útiles en el presente documento incluyen ARNbc que contienen cadenas principales modificadas o sin enlaces internucleosídicos naturales. Como se define en esta memoria descriptiva, ARNbc que tienen cadenas principales modificadas incluyen aquellos que retienen un átomo de fósforo en la cadena principal y aquellos que no tienen un átomo de fósforo en la cadena principal. Para los fines de esta memoria descriptiva, y como a veces se menciona en la técnica, ARNbc modificados que no tienen un átomo de fósforo en su cadena principal internucleosídica también pueden considerarse oligonucleósidos.

40 Cadenas principales de ARNbc modificadas incluyen, por ejemplo, fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fosforditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, metilo y otros alquilfosfonatos que incluyen 3'-alquilenfosfonatos y fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos que incluyen 3'-aminofosforamidato y aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionoalquilfosfonatos, tionoalquilfosfotriésteres, y boranofosfatos que tienen enlaces 3'-5' normales, análogos unidos en 2'-5' de estos, y aquellos que tienen polaridad invertida en donde los pares adyacentes de unidades de nucleósidos están unidos 3'-5' a 5'-3' o 2'-5' a 5'-2'. También se incluyen diversas sales, sales mixtas y formas de ácido libre.

50 Patentes estadounidenses representativas que enseñan la preparación de los enlaces que contienen fósforo anteriores incluyen, pero no se limitan a, las patentes estadounidenses n.ºs 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; y 5.625.050.

55 Cadenas principales de ARNbc modificadas que no incluyen un átomo de fósforo en las mismas tienen cadenas principales que están formadas por enlaces internucleosídicos de alquilo o cicloalquilo de cadena corta, heteroátomos mixtos y enlaces internucleosídicos de alquilo o cicloalquilo, o uno o más enlaces internucleosídicos heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta. Estas incluyen aquellas que tienen enlaces morfolino (formados en parte a partir de la parte de azúcar de un nucleósido); cadenas principales de siloxano; cadenas principales de sulfuro, sulfóxido y sulfona; cadenas principales de formacetilo y tioformacetilo; cadenas principales de metilen-formacetilo y tioformacetilo; cadenas principales que contienen alqueno; cadenas principales de sulfamato; cadenas principales de metilenimino y metilhidrazino; cadenas principales de sulfonato y sulfonamida; cadenas principales de amida; y otras que tienen partes componentes mixtas de N, O, S y CH₂.

65 Patentes estadounidenses representativas que enseñan la preparación de los oligonucleósidos anteriores incluyen, pero no se limitan a, las patentes estadounidenses n.ºs 5.034.506; 5.166.315; 5.185.444; 5.214.134; 5.216.141; 5.235.033; 5.64.562; 5.264.564; 5.405.938; 5.434.257; 5.466.677; 5.470.967; 5.489.677; 5.541.307; 5.561.225;

5.596.086; 5.602.240; 5.608.046; 5.610.289; 5.618.704; 5.623.070; 5.663.312; 5.633.360; 5.677.437; y 5.677.439.

En otros miméticos de ARNbc adecuados, tanto el azúcar como el enlace internucleosídico, es decir, la cadena principal, de las unidades de nucleótidos se reemplazan con grupos novedosos. Las unidades de base se mantienen para la hibridación con un compuesto diana de ácido nucleico apropiado. Uno de tales compuestos oligoméricos, un mimético de ARNbc que se ha demostrado que tiene excelentes propiedades de hibridación, se denomina ácido nucleico peptídico (PNA). En compuestos de PNA, la cadena principal de azúcar de un ARNbc se reemplaza con una cadena principal que contiene amida, en particular una cadena principal de aminoetilglicina. Las nucleobases se retienen y se unen directa o indirectamente a átomos de nitrógeno aza de la parte amida de la cadena principal. Patentes estadounidenses representativas que enseñan la preparación de compuestos de PNA incluyen, pero no se limitan a, las patentes estadounidenses n.ºs 5.539.082; 5.714.331; y 5.719.262. Puede encontrarse una enseñanza adicional de los compuestos de PNA en Nielsen *et al.*, Science, 1991, 254, 1497-1500.

Otros aspectos que se describen en el presente documento son ARNbc con cadenas principales de fosforotioato y oligonucleósidos con cadenas principales de heteroátomos, y en particular $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{O}-\text{CH}_2-$ - [conocido como metileno (metilimino) o cadena principal de MMI], $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$ y $-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ [en donde la cadena principal de fosfodiéster nativo se representa como $-\text{O}-\text{P}-\text{O}-\text{CH}_2-$] de la patente estadounidense mencionada anteriormente n.º 5.489.677, y las cadenas principales de amida de la patente estadounidense mencionada anteriormente n.º 5.602.240. También se prefieren los ARNbc que tienen estructuras de cadena principal de morfolino de la patente estadounidense mencionada anteriormente n.º 5.034.506.

ARNbc modificados también pueden contener uno o más restos de azúcar sustituidos. ARNbc preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': OH; F; O-, S-, o N-alquilo; O-, S-, o N-alqueno; O-, S- o N-alquino; u O-alquil-O-alquilo, en donde el alquilo, alqueno y alquino pueden ser alquilo C₁ a C₁₀ o alqueno y alquino C₂ a C₁₀ sustituido o no sustituido. Se prefieren particularmente $\text{O}[(\text{CH}_2)_n\text{O}]_m\text{CH}_3$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{OCH}_3$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{ONH}_2$, y $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{ON}[(\text{CH}_2)_m\text{CH}_3]_2$, donde n y m son de 1 a aproximadamente 10. Otros ARNbc preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': alquilo inferior C₁ a C₁₀, alquilo inferior sustituido, alcarilo, aralquilo, O-alcarilo u O-aralquilo, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino, sililo sustituido, un grupo de escisión de ARN, un grupo indicador, un intercalador, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un ARNbc, o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un ARNbc, y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. Una modificación preferida incluye 2'-metoxietoxi (2'-O-CH₂CH₂OCH₃, también conocido como 2'-O-(2-metoxietilo) o 2'-MOE) (Martin *et al.*, Helv. Chim. Acta, 1995, 78, 486-504) es decir, un grupo alcocalcoxilo. Una modificación preferida adicional incluye 2'-dimetilaminoetoxietilo, es decir, un grupo $\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{ON}(\text{CH}_3)_2$, también conocido como 2'-DMAOE, como se describe en los ejemplos a continuación en el presente documento, y 2'-dimetilaminoetoxietilo (también conocido en la técnica como 2'-O-dimetilaminoetoxietilo o 2'-DMAEOE), es decir, 2'-O-CH₂-O-CH₂-N(CH₂)₂, también se describe en los ejemplos a continuación en el presente documento.

Otras modificaciones preferidas incluyen 2'-metoxi (2'-OCH₃), 2'-aminopropoxilo (2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂) y 2'-fluoro (2'-F). También pueden hacerse modificaciones similares en otras posiciones en el ARNbc, particularmente la posición 3' del azúcar en el nucleótido de extremo terminal 3' o en los ARNbc unidos en 2'-5' y la posición 5' del nucleótido de extremo terminal 5'. ARNbc también pueden tener miméticos de azúcar tales como restos ciclobutilo en lugar del azúcar pentofuranosilo. Patentes estadounidenses representativas que enseñan la preparación de tales estructuras de azúcar modificadas incluyen, pero no se limitan a, patentes estadounidenses n.ºs 4.981.957; 5.118.800; 5.319.080; 5.359.044; 5.393.878; 5.446.137; 5.466.786; 5.514.785; 5.519.134; 5.567.811; 5.576.427; 5.591.722; 5.597.909; 5.610.300; 5.627.053; 5.639.873; 5.646.265; 5.658.873; 5.670.633; y 5.700.920, algunas de las cuales son de propiedad común con la presente solicitud.

ARNbc también pueden incluir modificaciones o sustituciones de nucleobases (a menudo denominadas en la técnica simplemente como "base"). Como se usa en el presente documento, nucleobases "no modificadas" o "naturales" incluyen las bases de purina adenina (A) y guanina (G), y las bases de pirimidina timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Nucleobases modificadas incluyen otras nucleobases sintéticas y naturales tales como 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetil citosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-propilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracilo y citosina, 5-propinil uracilo y citosina, 6-azo uracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo y otras adeninas y guaninas sustituidas en la posición 8, 5-halo, particularmente 5-bromo, 5-trifluorometilo y otros uracilos y citosinas sustituidos en la posición 5, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-deazaguanina y 7-daazaadenina y 3-deazaguanina y 3-deazaadenina. Nucleobases adicionales incluyen las dadas a conocer en la patente estadounidense n.º 3.687.808, las dadas a conocer en The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, páginas 858-859, Kroschwitz, J. L., ed. John Wiley & Sons, 1990, aquellas dadas a conocer por Englisch *et al.*, Angewandte Chemie, Edición Internacional, 1991, 30, 613, y aquellas dadas a conocer por Sanghvi, Y S., Capítulo 15, DsRNA Research and Applications, páginas 289-302, Crooke, S. T. y Lebleu, B., Ed., CRC Press, 1993. Algunas de estas nucleobases son particularmente útiles para aumentar la afinidad de unión de los compuestos oligoméricos presentados en el presente documento. Estos incluyen pirimidinas sustituidas en la posición 5, 6-azapirimidinas y purinas N-2, N-6 y O-6 sustituidas, incluyendo 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. Se ha demostrado que las sustituciones de 5-metilcitosina

aumentan la estabilidad de la estructura bicatenaria de ácido nucleico en 0,6-1,2 °C. (Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. y Lebleu, B., Eds., DsRNA Research and Applications, CRC Press, Boca Ratón, 1993, págs. 276-278) y son sustituciones de bases a modo de ejemplo, incluso más particularmente cuando se combinan con modificaciones de azúcar 2'-O-metoxietilo.

Patentes estadounidenses representativas que enseñan la preparación de algunas de las nucleobases modificadas mencionadas anteriormente, así como otras nucleobases modificadas incluyen, pero no se limitan a, las patentes estadounidenses n.ºs 3.687.808, así como patentes estadounidenses n.ºs 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; y 5.681.941, y la patente estadounidense n.º 5.750.692.

Patisirán

Según la invención, la composición de inhibición de TTR es patisirán. El patisirán es un ácido ribonucleico pequeño de interferencia (ARNip) que es específico para TTR, formulado en una nanopartícula lipídica hepatotrópica (LNP) para administración intravenosa (IV) (Akinc A, Zumbuehl A, *et al.* A combinatorial library of lipid-like materials for delivery of RNAi therapeutics. Nat Biotechnol. 2008;26(5):561-569). Este ARNip de TTR tiene una región diana dentro de la región UTR 3' del gen de TTR para garantizar y confirmar la homología con TTR de tipo silvestre (WT), así como todas las mutaciones de TTR informadas. Después del suministro mediado por LNP al hígado, patisirán selecciona como diana el ARNm de TTR para su degradación, dando como resultado la reducción potente y sostenida de la proteína TTR mutante y WT a través del mecanismo de iARN.

El ARNip de TTR (también conocido como ALN-18328) consiste en una hebra de sentido y una hebra de antisentido con las siguientes secuencias; las letras minúsculas indican versiones de 2'-O-metilo del nucleótido:

	Hebra	Nombre de oligonucleótido	Secuencia 5' a 3'	SEQ ID NO:
AD-18328	sentido	A-32345	GuAAccAAGAGuAuuccAudTdT	1
AD-18328	antisentido	A-32346	AUGGAAuACUCUUGGUuACdTdT	2

El proceso de fabricación consiste en sintetizar los dos oligonucleótidos monocatenarios de la estructura bicatenaria mediante síntesis convencional de oligonucleótidos en fase sólida. Después de la purificación, los dos oligonucleótidos se hibridan para dar la estructura bicatenaria.

El producto farmacéutico de patisirán es una formulación estéril del ARNip de TTR ALN-18328 con excipientes lipídicos (DLin-MC3-DMA, DSPC, colesterol, y PEG₂₀₀₀-C-DMG) en disolución salina tamponada con fosfato isotónico.

La formulación de patisirán se muestra en la tabla 1 a continuación:

Tabla 1: Composición de producto farmacéutico de patisirán

Función	Componente de patisirán, grado, concentración (mg/ml)
Principio activo	ALN-18328, cGMP 2,0 mg/ml
Excipiente; aminolípidos titulables para la interacción con el principio activo	DLin-MC3-DMA (6Z, 9Z, 28Z, 31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-il-4-(dimetilamino)butanoato, cGMP; 12,7 mg/ml
Excipiente; estabilidad de producto farmacéutico y biodistribución deseada	PEG ₂₀₀₀ -C-DMG ((R)-metoxi-PEG ₂₀₀₀ -carbamoil-di-O-miristil- <i>sn</i> -glicérido), cGMP; 1,5 mg/ml
Integridad estructural de partículas de LNP	DSPC (1,2-diestearoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocolina), cGMP; 3,1 mg/ml
Integridad estructural de partículas de LNP	Colesterol, sintético, cGMP; 5,9 mg/ml
Tampón	Disolución salina tamponada con fosfato, cGMP; cantidad suficiente

En algunos aspectos, el producto farmacéutico de patisirán se proporciona en un contenedor, por ejemplo, un recipiente de vidrio, con las siguientes cantidades por recipiente:

Tabla 2: Composición del producto farmacéutico de patisirán que incluye por recipiente

Función	Componente de patisirán, grado, concentración (mg/ml)/por recipiente (mg)
Principio activo	ALN-18328, cGMP 2,0 mg/ml/11,0 mg
Excipiente; aminolípidos titulables para la interacción con el principio activo	DLin-MC3-DMA (6Z, 9Z, 28Z, 31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-il-4-(dimetilamin)butanoato, cGMP Peso molecular, 642; 12,7 mg/ml/69,6 mg
Excipiente; estabilidad de producto farmacéutico y biodistribución deseada	PEG ₂₀₀₀ -C-DMG ((R)-metoxi-PEG ₂₀₀₀ -carbamoil-di-O-miristil- <i>sn</i> -glicerido), cGMP Peso molecular, 2510; 1,5 mg/ml/8,2 mg
Integridad estructural de partículas de LNP	DSPC (1,2-diestearoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocolina), cGMP Peso molecular, 790; 3,1 mg/ml/17,3 mg
Integridad estructural de partículas de LNP	Colesterol, sintético, cGMP Peso molecular, 387; 5,9 mg/ml/32,2 mg
Tampón	Disolución salina tamponada con fosfato, cGMP; cantidad suficiente

La disolución de patisirán para inyección contiene 2 mg/ml de sustancia farmacéutica de ARNip de TTR. El producto farmacéutico de patisirán se envasa en recipientes de vidrio de 10 ml con un volumen de llenado de 5,5 ml. El sistema de cierre del contenedor consiste en un recipiente de vidrio de borosilicato tipo I de la Farmacopea de los Estados Unidos/Farmacopea Europea (USP/EP), un tapón de caucho de butilo con cara de teflón, y una tapa levadizo de aluminio.

Estabilizadores de tetrámero

En algunos aspectos, los métodos descritos en el presente documento, pero que no forman parte de la invención reivindicada, incluyen la administración conjunta de un estabilizador de tetrámero con otra composición de inhibición de TTR.

Los estabilizadores de tetrámero son compuestos que se unen a la proteína TTR y actúan para estabilizar el tetrámero de TTR. Las mutaciones que desestabilizan el tetrámero TTR dan como resultado una TTR mal clasificada y agregada.

Ejemplos de estabilizadores de tetrámero incluyen tafamidis y diflunisal. Tanto la tafamidis como la diflunisal pueden ralentizar la tasa de progresión de la enfermedad (Berk *et al.*, Repurposing diflunisal for familial amyloid polyneuropathy: a randomized clinical trial. JAMA 2013, 310: 2658-2667; Coelho *et al.*, 2012; Coelho *et al.*, Long-term effects of tafamidis for the treatment of transthyretin familial amyloid polyneuropathy. J Neurol 2013, 260: 2802-2814; Lozeron *et al.*, Effect on disability and safety of Tafamidis in late onset of Met30 transthyretin familial amyloid polyneuropathy. Eur J Neurol 2013, 20: 1539-1545).

Sujetos y diagnóstico

En el presente documento se dan a conocer, pero no forman parte de la invención reivindicada, métodos para reducir o detener un aumento en una puntuación de deterioro de neuropatía (NIS) o una NIS modificada (mNIS+7) en un sujeto humano, en donde el sujeto humano tiene un trastorno relacionado con TTR. En algunos aspectos, el trastorno relacionado con TTR es una de las enfermedades causadas por mutaciones en el gen de transtiretina (TTR). En un aspecto, la enfermedad es amiloidosis por TTR, que se manifiesta en diversas formas, tales como la polineuropatía amiloide familiar (FAP), amiloidosis mediada por transtiretina (ATTR), y polineuropatía sintomática. Cuando el sistema nervioso periférico se ve afectado de manera más prominente, la enfermedad se denomina FAP. Cuando el corazón está implicado principalmente pero el sistema nervioso no lo está, la enfermedad se denomina miocardiopatía amiloide familiar (FAC). Un tercer tipo principal de amiloidosis por TTR se denomina amiloidosis leptomeníngea/SNC (sistema nervioso central). La ATTR afecta al sistema nervioso autónomo.

En algunos aspectos, el sujeto humano con un trastorno relacionado con TTR tiene un gen de TTR mutante. Más de 100 mutaciones de TTR informadas exhiben un espectro de síntomas de enfermedad. Las mutaciones más comunes asociadas con FAP y miocardiopatía asociada con ATTR, respectivamente, son Val30Met y Val122Ile. Las mutaciones de TTR causan un plegamiento incorrecto de la proteína y aceleran el proceso de formación de amiloide de TTR, y son el factor de riesgo más importante para el desarrollo de amiloidosis por TTR clínicamente significativa (también denominada ATTR (tipo amiloidosis por transtiretina)). Se sabe que más de 85 variantes de TTR amiloidogénicas causan amiloidosis familiar sistémica.

En algunos aspectos, un sujeto humano se selecciona para recibir tratamiento para cualquier forma de amiloidosis por TTR si el sujeto humano es un adulto (≥ 18 años) con amiloidosis de ATTR sometida a prueba por biopsia y neuropatía de leve a moderada. En un aspecto adicional, el sujeto humano también tiene uno o más de los siguientes: estado de rendimiento de Karnofsky (KPS) ≥ 60 %; índice de masa corporal (IMC) 17-33 kg/m²; función hepática y renal adecuada (aspartato transaminasa (AST) y alanina transaminasa (ALT) $\leq 2,5$ x el límite superior de la normalidad (ULN),

bilirrubina total dentro de los límites normales, albúmina > 3 g/dl, y relación normalizada internacional (INR) \leq 1,2; creatinina sérica \leq 1,5 ULN); y seronegatividad para el virus de hepatitis B y el virus de hepatitis C.

En otro aspecto, un sujeto humano se excluye del tratamiento si el sujeto humano tuvo un trasplante de hígado; tenía planificada cirugía durante el tratamiento; es positivo para VIH; ha recibido un fármaco en investigación distinto de tafamidis o diflunisal en 30 días; tenía una clasificación de insuficiencia cardíaca de la New York Heart Association > 2; está embarazada o es lactante; tenía infecciones bacterianas, víricas, parasitarias, o fúngicas sistémicas conocidas o sospechosas; tenía angina inestable, arritmia cardíaca clínicamente significativa no controlada; o tenía una reacción grave previa a un producto liposomal o hipersensibilidad conocida a oligonucleótidos.

Puntuación de deterioro de neuropatía (NIS)

Los métodos dados a conocer en el presente documento reducen o detienen un aumento en una puntuación de deterioro de neuropatía (NIS) en un sujeto humano mediante la administración de una composición de inhibición de transtiretina (TTR). NIS se refiere a un sistema de puntuación que mide la debilidad, sensibilidad y reflejos, especialmente con respecto a neuropatía periférica. La puntuación NIS evalúa un grupo estándar de músculos en cuanto a debilidad (1 es un 25 % débil, 2 es un 50 % débil, 3 es un 75 % débil, 3,25 es movimiento contra la gravedad, 3,5 es el movimiento con gravedad eliminada, 3,75 es fasciculación muscular sin movimiento, y 4 es paralizado), un grupo estándar de reflejos de estiramiento muscular (0 es normal, 1 está disminuido, 2 está ausente), y presión táctil, vibración, posición y movimiento de articulación, y pinchazo (todos clasificados en el dedo índice y el dedo gordo del pie: 0 es normal, 1 está disminuida, 2 está ausente). Las evaluaciones se corrigen por edad, sexo, y aptitud física.

En un aspecto, el método para reducir una puntuación NIS da como resultado una reducción de NIS en al menos un 10 %. En otros aspectos, la puntuación del método da como resultado una reducción de NIS en al menos un 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, o en al menos un 50 %. En otros aspectos, el método detiene una puntuación NIS creciente, por ejemplo, el método da como resultado un aumento del 0 % de la puntuación NIS.

Métodos para determinar una NIS en un sujeto humano son bien conocidos por un experto en la técnica y pueden encontrarse los siguientes:

Dyck, PJ *et al.*, Longitudinal assessment of diabetic polyneuropathy using a composite score in the Rochester Diabetic Neuropathy Study cohort, *Neurology* 1997. 49(1): págs. 229-239).

Dyck PJ. Detection, characterization, and staging of polyneuropathy: assessed in diabetics. *Muscle Nerve*. Enero de 1988;11(1):21-32.

Puntuación de deterioro de neuropatía modificada (mNIS+7)

En algunos aspectos, los métodos dados a conocer en el presente documento reducen o detienen un aumento en una puntuación de deterioro de neuropatía modificada (mNIS+7) en un sujeto humano mediante la administración de una composición de inhibición de transtiretina (TTR). Como es bien conocido por un experto en la técnica, mNIS+7 se refiere a una evaluación basada en un examen clínico de deterioro neurológico (NIS) en combinación con medidas electrofisiológicas de función de fibra nerviosa pequeña y grande (NCS y QST), y medición de función autónoma (presión sanguínea postural).

La puntuación mNIS+7 es una modificación de la puntuación NIS+7 (que representa NIS más siete pruebas). NIS+7 analiza reflejos de estiramiento muscular y debilidad. Cinco de las siete pruebas incluyen atributos de conducción nerviosa. Estos atributos son la amplitud de potencial de acción muscular de compuesto nervioso peroneal, velocidad de conducción de nervio motor y latencia distal de nervio motor (MNDL), MNDL tibial, y amplitudes de potencial de acción del nervio sensorial sural. Estos valores se corrigen para las variables de edad, sexo, altura y peso. Las dos restantes de las siete pruebas incluyen umbral de detección vibratorio y disminución de la frecuencia cardíaca con respiración profunda.

La puntuación mNIS+7 modifica NIS+7 para tener en cuenta el uso de la prueba de sensibilidad cuantitativa somatotópica inteligente, nuevas evaluaciones autónomas, y el uso del potencial de acción muscular compuesto de amplitudes de los nervios cubital, peroneal, y tibial, y potenciales de acción nerviosa sensorial de los nervios cubital y sural (Suanprasert, N. *et al.*, Retrospective study of a TTR FAP cohort to modify NIS+7 for therapeutic trials, *J. Neurol. Sci.*, 2014. 344(1-2): págs. 121-128).

En un aspecto, el método para reducir una puntuación mNIS+7 da como resultado una reducción de mNIS+7 en al menos 10 %. En otros aspectos, la puntuación del método da como resultado una reducción de una puntuación de mNIS+7 en al menos un 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, o en al menos un 50 %. En otros aspectos, el método detiene una mNIS+7 creciente, por ejemplo, el método da como resultado un aumento del 0 % de la mNIS+7.

Concentración de proteína TTR en suero.

Los métodos descritos en el presente documento, pero que no forman parte de la invención reivindicada, incluyen administrar al sujeto humano una cantidad eficaz de una composición de inhibición de transtiretina (TTR), en donde la cantidad eficaz reduce una concentración de proteína TTR en suero del sujeto humano por debajo de 50 µg/ml o en al menos un 80 %. La concentración de proteína TTR en suero puede determinarse directamente usando cualquier método conocido por un experto en la técnica, por ejemplo, un ensayo basado en anticuerpos, por ejemplo, un ELISA. Alternativamente, la concentración de proteína TTR en suero puede determinarse midiendo la cantidad de ARNm de TTR. En aspectos adicionales, la concentración de proteína TTR en suero se determina midiendo la concentración de un sustituto, por ejemplo, vitamina A o proteína de unión a retinol (RBP). En un aspecto, la concentración de proteína TTR en suero se determina usando un ensayo ELISA como se describe en los ejemplos a continuación.

En algunos aspectos, la concentración de proteína TTR en suero se reduce por debajo de 50 µg/ml, o por debajo de 40 µg/ml, 25 µg/ml o 10 µg/ml. En algunos aspectos, la concentración de proteína TTR en suero se reduce en un 80 %, o en un 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, o en un 95 %.

ABC

ABC se refiere al área bajo la curva de la concentración de una composición, por ejemplo, TTR, en el plasma del torrente sanguíneo a lo largo del tiempo después de una dosis de un fármaco, por ejemplo, una composición de inhibición de TTR, se administra a un paciente. Se ve afectado por la velocidad de absorción y la velocidad de eliminación de la composición del plasma sanguíneo del paciente. Como sabe un experto en la técnica, el ABC puede determinarse calculando la integral de la concentración de composición plasmática después de administrar el fármaco. En otro aspecto, el ABC puede predecirse usando la siguiente fórmula:

$$\text{ABC predicha} = (D \times F) / \text{CL}$$

donde D es la concentración de dosificación, F es una medida de biodisponibilidad, y Cl es la tasa prevista de depuración. Un experto en la técnica aprecia que los valores para el ABC predicha tienen un error en el intervalo de ±3 a 4 veces.

En algunos aspectos, los datos para determinar el ABC se obtienen tomando muestras de sangre del paciente a diversos intervalos de tiempo después de la administración del fármaco. En un aspecto, el ABC medio en el plasma del paciente después de la administración de la composición de inhibición de TTR está en el intervalo de aproximadamente 9000 a aproximadamente 18000.

Se entiende que la concentración plasmática de TTR, puede variar significativamente entre sujetos, debido a la variabilidad con respecto al metabolismo y/o posibles interacciones con otros agentes terapéuticos. Según un aspecto, la concentración en plasma sanguíneo de TTR puede variar de un sujeto a otro sujeto. Del mismo modo, valores tales como concentración plasmática máxima ($C_{m\acute{a}x}$) o tiempo para alcanzar la concentración plasmática máxima ($T_{m\acute{a}x}$) o área bajo la curva desde tiempo cero hasta tiempo de la última concentración medible ($ABC_{\acute{u}ltima}$) o área total bajo la curva de tiempo de concentración plasmática (ABC) pueden variar de sujeto a sujeto. Debido a esta variabilidad, la cantidad necesaria para constituir "una cantidad terapéuticamente eficaz" de un compuesto, tal como, una composición de inhibición de TTR, puede variar de sujeto a sujeto.

Composiciones farmacéuticas

Los métodos descritos en el presente documento, pero que no forman parte de la invención reivindicada, incluyen la administración de una composición de inhibición de TTR, por ejemplo, un ARNip que selecciona como diana un gen de TTR, por ejemplo, patisirán. En algunos aspectos, la composición de inhibición de TTR es una composición farmacéutica.

Como se usa en el presente documento, una "composición farmacéutica" comprende una composición de inhibición de TTR y un portador farmacéuticamente aceptable. El término "portador farmacéuticamente aceptable" se refiere a un portador para la administración de un agente terapéutico. Tales portadores incluyen, pero no se limitan a, disolución salina, disolución salina tamponada, dextrosa, agua, glicerol, etanol, y combinaciones de los mismos. El término excluye específicamente el medio de cultivo celular. Para fármacos administrados por vía oral, portadores farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a excipientes farmacéuticamente aceptables tales como diluyentes inertes, agentes disgregantes, agentes aglutinantes, agentes lubricantes, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes colorantes y conservantes. Diluyentes inertes adecuados incluyen carbonato de sodio y calcio, fosfato de sodio y calcio, y lactosa, mientras que el almidón de maíz y el ácido algínico son agentes disgregantes adecuados. Agentes aglutinantes pueden incluir almidón y gelatina, mientras que el agente lubricante, si está presente, generalmente será estearato de magnesio, ácido esteárico o talco. Si se desea, los comprimidos pueden recubrirse con un material tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo, para retrasar la absorción en el tracto gastrointestinal.

Las composiciones farmacéuticas como se describen en el presente documento pueden administrarse de varias maneras dependiendo de si se desea un tratamiento local o sistémico y del área a tratar. La administración puede ser

tópica, pulmonar, por ejemplo, por inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, incluyendo por nebulizador; intratraqueal, intranasal, epidérmica y transdérmica, oral o parenteral. La administración parenteral incluye intravenosa, intraarterial, subcutánea, inyección o infusión intraperitoneal o intramuscular; o intracraneal, por ejemplo, administración intraparenquimatosa, intratecal o intraventricular.

Las composiciones pueden suministrarse de manera que se seleccione como diana un tejido particular, tal como el hígado (por ejemplo, los hepatocitos del hígado). Composiciones farmacéuticas pueden suministrarse mediante inyección directamente en el cerebro. La inyección puede ser por inyección estereotáctica en una región particular del cerebro (por ejemplo, la sustancia negra, corteza, hipocampo, cuerpo estriado, o globo pálido), o el ARNbc puede suministrarse en múltiples regiones del sistema nervioso central (por ejemplo, en múltiples regiones del cerebro, y/o en la médula espinal). El ARNbc también puede suministrarse en regiones difusas del cerebro (por ejemplo, suministro difuso a la corteza del cerebro).

En un aspecto, un ARNbc que selecciona como diana TTR puede suministrarse por medio de una cánula u otro dispositivo de suministro que tiene un extremo implantado en un tejido, por ejemplo, el cerebro, por ejemplo, la sustancia negra, corteza, hipocampo, cuerpo estriado, cuerpo calloso o globo pálido del cerebro. La cánula puede conectarse a un depósito de la composición de ARNbc. El flujo o suministro puede estar mediado por una bomba, por ejemplo, una bomba o minibomba osmótica, tal como una bomba Alzet (Durect, Cupertino, CA). En un aspecto, se implantan una bomba y un depósito en un área distante del tejido, por ejemplo, en el abdomen, y el suministro se efectúa mediante un conducto que conduce desde la bomba o depósito hasta el sitio de liberación. La infusión de la composición de ARNbc en el cerebro puede ser durante varias horas o durante varios días, por ejemplo, durante 1, 2, 3, 5 o 7 días o más. Se describen dispositivos para el suministro al cerebro, por ejemplo, en las patentes estadounidenses n.ºs 6.093.180 y 5.814.014.

Dosificación y cronología

El experto en la técnica apreciará que determinados factores pueden influir en la dosificación y la cronología necesarios para tratar eficazmente a un sujeto, incluyendo, pero sin limitación, la gravedad de la enfermedad o trastorno, tratamientos previos, la salud general y/o la edad del sujeto, y otras enfermedades presentes. Además, el tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición puede incluir un solo tratamiento o una serie de tratamientos. Las estimaciones de dosificaciones eficaces y las semividas *in vivo* para las composiciones de inhibición de TTR abarcadas por la divulgación pueden hacerse usando metodologías convencionales o basándose en sometimiento a prueba *in vivo* usando un modelo animal apropiado, como se describe en otra parte del presente documento.

En general, una dosis adecuada de una composición farmacéutica de la composición de inhibición de TTR estará en el intervalo de 0,01 a 200,0 miligramos por kilogramo de peso corporal del receptor por día, generalmente en el intervalo de 1 a 50 mg por kilogramo de peso corporal por día.

Por ejemplo, la composición de inhibición de TTR puede ser un ARNip, y puede administrarse a, 0,01 mg/kg, 0,05 mg/kg, 0,2 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,4 mg/kg, 0,5 mg/kg, 0,6 mg/kg, 0,7 mg/kg, 0,8 mg/kg, 0,9 mg/kg, 1 mg/kg, 1,1 mg/kg, 1,2 mg/kg, 1,3 mg/kg, 1,4 mg/kg, 1,5 mg/kg, 1,628 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 5,0 mg/kg, 10 mg/kg, 20 mg/kg, 30 mg/kg, 40 mg/kg, o 50 mg/kg por dosis única. En otro aspecto, la dosificación está entre 0,15 mg/kg y 0,3 mg/kg. Por ejemplo, la composición de inhibición de TTR puede administrarse a una dosis de 0,15 mg/kg, 0,2 mg/kg, 0,25 mg/kg o 0,3 mg/kg. En un aspecto, la composición de inhibición de TTR se administra a una dosis de 0,3 mg/kg.

La composición farmacéutica (por ejemplo, patisirán) puede administrarse una vez al día, o una o dos veces cada 5, 10, 15, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 días. La unidad de dosificación puede prepararse para el suministro durante varios días, por ejemplo, usando una formulación de liberación sostenida convencional que proporciona la liberación sostenida de la composición de inhibición de TTR durante un periodo de varios días. Formulaciones de liberación sostenida son bien conocidas en la técnica y son particularmente útiles para el suministro de agentes en un sitio particular, tal como podría usarse con los agentes de la presente divulgación.

Según la invención, la composición de inhibición de TTR es patisirán, y la dosificación es 0,3 mg/kg, y en donde la dosis se administra una vez cada 21 días. En otra realización, la cantidad eficaz es 0,3 mg/kg y la cantidad eficaz se administra una vez cada 21 días a través de una infusión de 70 minutos de 1 ml/min durante 15 minutos seguido de 3 ml/min durante 55 minutos. En otra realización, la cantidad eficaz es 0,3 mg/kg y la cantidad eficaz se administra a dos dosis cada 21-28 días a través de una infusión de 60 minutos de 3,3 ml/min, o a través de una infusión de 70 minutos de 1,1 ml/min durante 15 minutos seguido de 3,3 ml/min durante 55 minutos.

Una dosificación de una composición de inhibición de TTR puede ajustarse para el tratamiento del aumento de NIS o FAP mediante: administración de la composición de inhibición de TTR y determinación de un nivel de proteína TTR en el sujeto. Si el nivel de proteína TTR es superior a 50 µg/ml, se aumenta la cantidad de composición de inhibición de TTR administrada posteriormente al sujeto, y si el nivel de proteína TTR está por debajo de 50 µg/ml, se disminuye la cantidad de la composición de inhibición de TTR administrada posteriormente al sujeto.

Las composiciones de inhibición de TTR pueden administrarse en combinación con otros agentes conocidos eficaces en el tratamiento de procesos patológicos mediados por la expresión génica diana. En un aspecto, se administra patisirán con un estabilizador de tetrámero tal como tafamidis o diflunisal. En cualquier caso, el médico que lo administra puede ajustar la cantidad y la cronología de la administración de patisirán y/o estabilizador de tetrámero basándose en los resultados observados usando medidas estándar de eficacia conocidas en la técnica o descritas en el presente documento.

Ejemplos

A continuación se presentan ejemplos de aspectos específicos para llevar a cabo la presente invención. Los ejemplos se ofrecen solo con fines ilustrativos, y no se pretende que limiten el alcance de la presente invención de ninguna manera. Se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperaturas, etc.), pero, por supuesto, deben permitirse algunos errores y desviaciones experimentales.

La puesta en práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique de otro modo, métodos convencionales de química de proteínas, bioquímica, técnicas de ADN recombinante y farmacología, dentro de la habilidad de la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, T. E. Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W.H. Freeman and Company, 1993); A.L. Lehninger, *Biochemistry* (Worth Publishers, Inc., edición actual); Sambrook, *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª Edición, 1989); *Methods In Enzymology* (ediciones de S. Colowick y N. Kaplan, Academic Press, Inc.); *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18ª Edición (Easton, Pensilvania: Mack Publishing Company, 1990); Carey y Sundberg *Advanced Organic Chemistry* 3ª Ed. (Plenum Press) Volúmenes A y B(1992).

Ejemplo de referencia 1: Seguridad y eficacia de patisirán para amiloidosis por TTR

En un ensayo clínico de fase I, se encontró que el patisirán reducía los niveles de TTR en pacientes durante un periodo de 28 días. Los resultados de este estudio se publicaron en *New England Journal of Medicine* (Coelho *et al.*, N Engl J Med 2013;369:819-29.) También se presentan un resumen del diseño del estudio y los resultados de la siguiente manera.

El ensayo fue multicéntrico, aleatorizado, con enmascaramiento único, controlado con placebo, y con intervalo de dosis para evaluar la seguridad y eficacia de una dosis única de patisirán en pacientes con amiloidosis por TTR o en adultos sanos. Hombres y mujeres entre las edades de 18-45 años eran elegibles para este ensayo si estaban sanos (según lo determinado basándose en una historia médica, examen físico, y electrocardiografía de 12 derivaciones), tenían un IMC de 18,0-31,5, tenían una función hepática y recuentos sanguíneos adecuados, y no tenían potencial de procreación.

Se asignaron aleatoriamente series de participantes (cuatro en cada serie) para recibir patisirán a dosis de 0,01-0,5 mg/kg o placebo (disolución salina normal) en una proporción de 3:1. El patisirán se administró por vía intravenosa durante un período de 15 minutos y 60 minutos, respectivamente. En el ensayo, los pacientes recibieron una medicación previa similar la noche antes y el día de la infusión para reducir el riesgo de reacciones relacionadas con infusión. Estos medicamentos incluyeron dexametasona, acetaminofeno, difenhidramina o cetirizina, y ranitidina.

La actividad farmacodinámica de patisirán se midió como se refleja en los niveles de TTR en suero, usando un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) validado para la TTR total (Charles River Laboratories, Wilmington MA). Niveles de referencia de TTR, proteína de unión a retinol, y vitamina A para cada paciente se definieron como la media de cuatro mediciones antes de la administración del patisirán. Se monitorizaron eventos adversos desde el inicio de la administración del fármaco hasta el día 28. La monitorización de seguridad también incluyó evaluaciones hematológicas, análisis químicos de la sangre, y pruebas de función tiroidea.

La farmacocinética de plasma del ARNip de TTR contenido en patisirán se evaluó por medio de un ensayo de hibridación basado en ELISA validado. Para la detección y cuantificación de ARNip, se usó el ensayo ATTO-sonda-HPLC (límite inferior de cuantificación, 1,0 ng por mililitro) (Tandem Laboratories, Salt Lake City UT). Se usó WinNonlin (Pharsight, Princeton NJ) para determinar las estimaciones farmacocinéticas.

La disminución de expresión génica de TTR, vitamina A, y la proteína de unión a retinol se midió en comparación con los niveles de referencia. (datos no mostrados).

Resultados

No se observaron cambios significativos en los niveles de TTR (en comparación con placebo) a las dos dosis más bajas de patisirán. Sin embargo, se observó una disminución de expresión génica de TTR sustancial en todos los participantes que recibieron dosis de 0,15-0,5 mg/kg (datos no mostrados). La disminución de expresión génica de TTR fue rápida, potente, y duradera en los tres niveles de dosis, con cambios altamente significativos, en comparación con placebo ($P < 0,001$) hasta el día 28. A la luz de la respuesta robusta observada en 0,15 y 0,3 mg/kg y modesta

mejora incremental en la respuesta a 0,5 mg/kg, solo un participante recibió la dosis de 0,5 mg/kg.

Hubo poca variabilidad entre participantes en la cinética de respuesta (datos no mostrados), especialmente a dosis de al menos 0,3 mg/kg, con más del 50 % de reducción en el día 3, un nivel nadir aproximadamente el día 10, y supresión continua de más del 50 % en el día 28, con recuperación completa que ocurre en el día 70. Valores máximos para la disminución de expresión génica de TTR para participantes que recibieron 0,15 mg/kg, 0,3 mg/kg y 0,5 mg/kg fueron un 85,7 %, 87,6 % y 93,8 %, respectivamente. Los niveles promedio nadir a dosis de 0,15 mg/kg y 0,3 mg/kg fueron de un 82,3 % (intervalo de confianza (IC) de 95 %, 67,7-90,3) y un 86,8 % (CI de 95 %, 83,8-89,3), respectivamente; estos niveles nadires mostraron poca variabilidad entre los participantes cuando se analizaron como o bien niveles absolutos de TTR o bien disminución de expresión génica de TTR en porcentaje y fueron altamente significativos, en comparación con placebo ($P < 0,001$) (datos no mostrados).

El grado de disminución de expresión génica parece determinar la duración de la supresión, con reducciones medias en el día 28 de un 56,6 % (CI de 95 %, 11,6-78,7) y un 67,1 % (CI de 95 %, 45,5-80,1) para participantes que recibieron 0,15 mg/kg y 0,3 mg/kg, respectivamente, y un 76,8 % de reducción en el día 28 para el paciente individual que recibió 0,5 mg/kg. La disminución de expresión génica de TTR observada en seres humanos a una dosis de 0,3 mg/kg fueron prácticamente idénticos a los observados en primates no humanos al mismo nivel de dosis (datos no mostrados). Estas reducciones en TTR por patisirán se correlacionaron con cambios en los niveles de proteína de unión a retinol y vitamina A (datos no mostrados).

El uso de patisirán no dio como resultado ningún cambio significativo en mediciones hematológicas, hepáticas o renales o en la función tiroidea, y no hubo eventos adversos graves relacionados con el fármaco o ninguna interrupción del fármaco del estudio debido a eventos adversos (datos no mostrados).

Los perfiles farmacocinéticos de plasma de patisirán mostraron que los valores para la concentración plasmática máxima y para el área bajo la curva hasta el último día para el ARNip de TTR aumentaron de manera aproximadamente proporcional a la dosis en el intervalo de dosis que se sometieron a prueba (datos no mostrados).

Especificidad de patisirán

Para demostrar adicionalmente la especificidad del efecto de patisirán, la TTR también se midió en un grupo de voluntarios sanos en un ensayo de fase 1 de ALN-PCS, que contiene un ARNip que selecciona como diana PCSK9 (una diana para reducción del colesterol) que se formula en el mismo tipo de nanopartícula lipídica usada en patisirán. Una dosis única de 0,4 mg/kg de ALN-PCS (denominado ARNip de control) no tuvo efecto sobre TTR (datos no mostrados), que mostró que el efecto de patisirán sobre TTR se debió a la selección como diana específica por el ARNip y no a un efecto no específico de la formulación de nanopartículas lipídicas.

Se obtuvo evidencia adicional en apoyo de la especificidad y el mecanismo de acción del efecto farmacodinámico de patisirán usando el ensayo RACE 5' (amplificación rápida de extremos de ADN complementarios) en muestras de sangre obtenidas de participantes que recibieron una dosis de 0,3 mg/kg para detectar el producto de escisión de ARNm de TTR predicho en ARN extracelular coagulante. Para recoger las muestras de sangre, se recogió suero después de centrifugar la muestra de sangre coagulada (antes de la dosis y 24 horas después de la dosis de los sujetos) a 1200 x g durante 20 minutos. El suero se centrifugó por segunda vez a 1200 x g durante 10 minutos para retirar el material celular flotante y luego se congeló. El suero descongelado se mezcló con cloruro de litio (concentración final 1 M) y se incubó a 4 grados C durante 1 hora. Las muestras se centrifugaron a 120.000 x g durante 2 horas a 4 grados C para sedimentar el ARN, y el ARN total se aisló de los gránulos mediante extracción con Trizol (Life Technologies, Grand Island, Nueva York, EE. UU.) y precipitación de isopropanol.

Para detectar el producto de escisión mediada por ARNip de TTR, el ARN aislado se usó para la PCR de RACE mediada por unión usando el kit GeneRacer (Life Technologies). El ARN se ligó al adaptador GeneRacer y se transcribió inversamente usando el cebador inverso específico de TTR (5'-aatcaagtaaagtggaatgaaaagtgcccttcacag-3') (SEQ ID NO:3) seguido de 2 rondas de PCR usando el cebador directo Gene Racer GR5' complementario al adaptador y el cebador inverso específico de TTR (5'-gccttcacaggaatgtttattgtctctg-3') (SEQ ID NO:4). La PCR con cebadores internos se llevó a cabo con cebador interno GR5' y el cebador interno inverso específico de TTR (5'-ctctgcctggacttaacatagcatatgagtg-3') (SEQ ID NO:5). Los productos de PCR se clonaron usando el vector TOPO-Blunt (Life Technologies). Las inserciones clonadas se amplificaron por PCR de colonias usando cebadores M13 directo e inverso. Los amplicones se secuenciaron con el cebador promotor T7 en la instalación de secuenciación de Macrogen. Las secuencias de 96 clones se alinearon con TTR humana usando CLC Workbench.

Se detectó ARNm de TTR tanto en muestras previas a la dosis como en muestras obtenidas 24 horas después de la administración de fármaco. Según el mecanismo de iARN, el producto de escisión de ARNm predicho estaba ausente en las muestras previas a la dosis y estaba presente en las muestras posteriores a la dosis en los tres participantes (datos no mostrados).

Un ensayo LC/MS/MS para la cuantificación de TTR de tipo silvestre y mutante en suero humano fue calificado y realizado por Tandem Labs. Las muestras de suero se digirieron usando quimotripsina y luego se procesaron mediante

extracción por precipitación de proteínas antes del análisis por LC/MS/MS. Los péptidos quimotripticos TTRW-1 que representan TTR de tipo silvestre y V30M-1 que representan V30M mutante se monitorizaron según sus únicas transiciones específicas de relación masa con respecto a carga. Los datos de curva de calibración estándar obtenidos usando péptidos marcados con isótopos estables (TTRW-1-D8 y V30M-1-D8) se usaron para calcular fragmentos peptídicos endógenos (TTRW-1 y V30M-1) en muestras de suero humano. Las relaciones de área de pico para los estándares (es decir, TTRW-1-D8 con respecto al patrón interno TTRW-L1-D16 y V30M-1-D8 con respecto al V30M-L1-D16) se usaron para crear una curva de calibración lineal usando análisis de regresión de mínimos cuadrados ponderados 1/x². El método LC/MS/MS calificado logró un límite inferior de cuantificación (LLOQ) de 5 ng/ml con curvas estándar que varían de 5 a 2500 ng/ml.

Ejemplo de referencia 2: Estudio de múltiples dosis para seguridad y eficacia de terapia con patisirán para polineuropatía amiloide familiar

En este ensayo clínico de fase II, se administraron múltiples dosis de patisirán a pacientes con FAP mediada por TTR para evaluar la seguridad, tolerabilidad, farmacocinética, y farmacodinámica de múltiples dosis intravenosas ascendentes de patisirán en estos pacientes. Estos datos se presentaron en el simposio internacional sobre la polineuropatía amiloide familiar (ISFAP) mantenido en noviembre de 2013.

Pacientes elegibles eran adultos (≥ 18 años) con amiloidosis de ATTR sometida a prueba por biopsia y neuropatía de leve a moderada; estado de rendimiento de Karnofsky (KPS) ≥ 60 %; índice de masa corporal (IMC) 17-33 kg/m²; función hepática y renal adecuada (aspartato transaminasa (AST) y alanina transaminasa (ALT) $\leq 2,5$ x el límite superior de la normalidad (ULN), bilirrubina total dentro de los límites normales, albúmina > 3 g/dl, y relación normalizada internacional (INR) $\leq 1,2$; creatinina sérica $\leq 1,5$ ULN); y seronegatividad para el virus de la hepatitis B y el virus de la hepatitis C. Se excluyeron pacientes si tenían un trasplante de hígado; tenían planificada cirugía durante el estudio; eran positivos para VIH; habían recibido un fármaco en investigación distinto de tafamidis o diflunisal en 30 días; tenía una clasificación de insuficiencia cardíaca de la New York Heart Association > 2 ; estaban embarazadas o eran lactantes; tenían infecciones bacterianas, víricas, parasitarias o fúngicas sistémicas conocidas o sospechosas; tenían angina inestable, arritmia cardíaca clínicamente significativa no controlada; o tenían una reacción grave previa a un producto liposomal o hipersensibilidad conocida a oligonucleótidos.

Este fue un estudio de fase II de escalado de múltiples dosis sin enmascaramiento internacional multicéntrico de patisirán en pacientes con FAP. Las cohortes de 3 pacientes recibieron dos dosis de patisirán, con cada dosis administrada como una infusión intravenosa (IV). Las cohortes 1-3 recibieron dos dosis de patisirán de 0,01, 0,05 y 0,15 mg/kg cada cuatro semanas (Q4W), respectivamente; las cohortes 4 y 5 recibieron dos dosis de patisirán de 0,3 mg/kg Q4W. Todos los pacientes en las cohortes 6-9 recibieron dos dosis de patisirán de 0,3 mg/kg administradas cada tres semanas (Q3W). Todos los pacientes recibieron medicación previa antes de cada infusión de patisirán que consistía en dexametasona, paracetamol (acetaminofeno), un bloqueante de H₂ (por ejemplo, ranitidina o famotidina), y un bloqueante de H₁ (por ejemplo, cetirizina, hidroxizina o fexofenadina) para reducir el riesgo de reacciones relacionadas con la infusión. Se administró patisirán IV a 3,3 ml/min durante 60 minutos, o durante 70 minutos usando un régimen de microdosificación (1,1 ml/min durante 15 minutos seguido de 3,3 ml/min durante el resto de la dosis).

Se evaluaron los niveles séricos de proteína TTR total para todos los pacientes usando un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Adicionalmente, la proteína TTR de tipo silvestre y mutante se midió por separado y específicamente en suero para pacientes con la mutación Val30Met usando un método de espectrometría de masas patentado (Charles River Laboratories, Quebec, Canadá). Se recogieron muestras de suero en el cribado, y los días: 0, 1, 2, 7, 10, 14, 21, 22, 23 (solo Q3W); 28, 29 (solo Q4W); 30 (solo Q4W); 31 (solo Q3W); 35, 38 (solo Q4W) y 42, 49, 56, 112 y 208 de seguimiento.

Se crearon perfiles de concentración plasmática-tiempo para ARNip de TTR, basándose en muestras de sangre recogidas el día 0 y en los siguientes puntos temporales: antes de la dosis (dentro de 1 hora del inicio de dosificación planificada), al final de la infusión (EOI), a los 5, 10 y 30 minutos y a 1, 2, 4, 6, 24, 48, 168, 336, 504 (día 21, solo régimen Q3W) y 672 (día 28, solo régimen Q4W) horas después de la infusión. Se recogieron muestras adicionales los días 84 y 180 para los regímenes Q4W, y los días 35, 91 y 187 para el régimen Q3W. Para las cohortes 3-9, también se analizaron muestras de sangre el día 0 en EOI y 2 horas después de la infusión en cuanto al ARNip de TTR tanto libre como encapsulado. El ARNip de TTR en suero se analizó usando un ensayo de cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC) de sonda ATTO validada (Tandem Laboratories, Salt Lake City, Utah, EE. UU.). Los análisis de PK se llevaron a cabo utilizando una evaluación no compartimental y/o compartimental de los datos de concentración plasmática-tiempo de ARNip de TTR para determinar las estimaciones de parámetros de PK utilizando el programa informático validado WinNonlin®. Las muestras de orina se analizaron en cuanto a los niveles de ARNip de TTR excretado, y se midió la depuración renal (CL_R) después de la dosificación.

Los niveles séricos de vitamina A y proteína de unión a retinol (RBP) se midieron por HPLC y nefelometría, respectivamente, en los mismos puntos de tiempo especificados para la TTR total (Biomins Specialized Medical Pathology, Lyon, Francia).

Se calcularon las medias y las varianzas para la disminución de expresión génica de TTR desde el valor de referencia

para la población de PP, con el valor de referencia definido como el promedio de todos los valores previos a la dosis. Se usaron análisis de varianza (ANOVA) y análisis de covarianza (ANCOVA) para analizar los datos de PD (TTR transformada logarítmicamente natural en relación con el valor de referencia), con pruebas *a posteriori* de Tukey de comparaciones por pares individuales (entre niveles de dosis). Los niveles de TTR nadir se definieron como el nivel mínimo por paciente durante el período de 28 días (período de 21 días para el grupo Q3W) después de cada administración de dosis (períodos de primera dosis, segunda dosis: días 1-28, 29-56 y días 1-21, 22-42 para los grupos Q4W y Q3W, respectivamente). Relación entre TTR y RBP o vitamina A, en relación con el valor de referencia, y la relación entre los niveles de TTR de tipo silvestre y V30M, se exploraron mediante regresión lineal. La proporcionalidad de la dosis del componente de patisirán en los parámetros de PK se evaluó usando un análisis de modelo de potencia. Los EA se codificaron usando el sistema de codificación Medical Dictionary for Regulatory Activities (MedDRA), versión 15.0, y estadísticas descriptivas proporcionadas para los EA, datos de laboratorio, datos de signos vitales, y datos de intervalo de ECG. Todos los análisis estadísticos se realizaron usando el software SAS, versión 9.3 o superior. Eficacia y farmacodinámica: la media (DE) de los niveles de proteína TTR en suero de referencia fueron similares en las cohortes de dosis: grupos de dosificación de 272,9 (98,86), 226,5 (12,67), 276,1 (7,65), 242,6 (38,30) y 235,5 (44,45) $\mu\text{g/ml}$ para el 0,01, 0,05, 0,15, 0,3 Q4W y de 3 mg/kg Q3W, respectivamente.

En comparación con la cohorte de dosis de 0,01 mg/kg, una reducción significativa en TTR ($p < 0,001$ mediante pruebas *a posteriori* después de ANCOVA) después de la primera y segunda dosis de patisirán en las cohortes de 0,3 mg/kg Q4W y Q3W. (datos no mostrados). En pacientes con la mutación Val30Met, se observó un grado muy similar de disminución de expresión génica para la TTR de tipo silvestre y mutante (datos no mostrados). El nivel de disminución de expresión de TTR en suero se correlacionó altamente con la reducción en el nivel de RBP circulante ($r^2 = 0,89$, $p < 10^{-15}$) y vitamina A ($r^2 = 0,90$, $p < 10^{-15}$) (datos no mostrados).

Aunque los pacientes que tomaron tafamidis o diflunisal tuvieron niveles de referencia significativamente aumentados de TTR en suero en comparación con los pacientes que no tomaron terapia estabilizadora ($p < 0,001$ por ANOVA) (datos no mostrados), la administración de patisirán dio como resultado un grado similar de disminución de expresión génica de TTR en estos dos grupos de pacientes (datos no mostrados).

Farmacocinética: concentraciones medias del componente de ARNip de TTR de patisirán disminuyeron después de EOI (datos no mostrados), y no hubo acumulación de ARNip después de la segunda dosis el día 21/28. Las mediciones de concentraciones encapsuladas frente a no encapsuladas de ARNip de TTR después de cada dosis indicaron la estabilidad de la formulación de LNP circulante. Tanto para la primera como para la segunda dosis, los valores medios para la concentración plasmática máxima ($C_{\text{máx}}$) y el área bajo la curva de concentración plasmática-tiempo desde cero hasta el último punto de tiempo medible ($ABC_{0-\text{último}}$) aumentaron de manera proporcional a la dosis en el intervalo de dosis sometido a prueba. $C_{\text{máx}}$ y $ABC_{0-\text{último}}$ después de la dosis 1 y la dosis 2 fueron comparables, sin acumulación. La semivida terminal media de patisirán en los días 0 y 21/28 fue 39-59 horas a dosis $> 0,01$ mg/kg, y no cambió relativamente al comparar la dosis 1 y la dosis 2 para cada cohorte de dosis.

Estos datos de fase II demuestran que el tratamiento de pacientes con FAP con patisirán condujo a una disminución de expresión génica estadísticamente significativa, dependiente de la dosis, y consistente de los niveles de proteína TTR en suero. Se logró una reducción media sostenida en la TTR de $> 80\%$ con dos dosis consecutivas de patisirán 0,3 mg/kg dosificado cada 3-4 semanas, con una disminución de expresión génica máxima del 96% lograda en el grupo Q3W. Estas tasas de disminución de expresión génica son consistentes con las tasas observadas en el estudio de fase 1 controlado con placebo de dosis única ascendente de patisirán (Coelho *et al.* 2013a). La evidencia de otras enfermedades amiloides sistémicas indica que tan solo un 50% de reducción de la proteína causante de enfermedad puede dar como resultado una mejora o estabilización de enfermedad clínica (Lachmann *et al.* 2003; Lachmann *et al.* 2007). El grado de disminución de expresión génica de TTR con patisirán no se vio afectado por pacientes que tomaron tafamidis o diflunisal, lo que sugiere que estos fármacos estabilizadores de TTR no interfieren con la actividad farmacológica de patisirán. En pacientes con la mutación Val30Met, patisirán suprimió la producción tanto de TTR mutada como de tipo silvestre; esta última sigue siendo amiloidogénica en pacientes con FAP de inicio tardío después de trasplante de hígado (Yazaki *et al.*, 2003; Liepnieks *et al.*, 2010).

Ejemplo 1: Reducción de deterioro neurológico medido por NIS y mNIS+7 administrando patisirán

Se realizó un estudio de extensión sin enmascaramiento con pacientes con FAP usando los protocolos descritos en el ejemplo 2. La administración de patisirán condujo a una reducción tanto de NIS como de mNIS+7.

Los pacientes con FAP previamente dosificados en el ensayo de fase 2 fueron elegibles para pasar al estudio OLE de fase 2. Se realizaron y se realizan hasta 2 años de dosificación, 0,30 mg/kg cada 3 semanas, con criterios de valoración clínicos evaluados cada 6 meses. Los objetivos de estudio incluyeron efectos sobre el deterioro neurológico (mNIS+7 y NIS), calidad de vida, mBMI, discapacidad, movilidad, fuerza de agarre, síntomas autónomos, densidad de fibra nerviosa en biopsias de piel, afectación cardíaca (en el subgrupo cardíaco), y niveles de TTR en suero.

La demografía de los pacientes se muestra a continuación.

65

Característica	Resultado
Número de pacientes	N = 27 (incluye 11 pacientes en subgrupo cardíaco)
Mediana de edad	64,0 años (intervalo 29-77)
Género	18 hombres, 9 mujeres
Genotipo de TTR	<ul style="list-style-type: none"> • Val30Met (V30M) = 20 • Ser77Tyr (S77Y) = 2 • Ser77Phe (S77F) = 2 • Tyr116Ser (Y116S) = 1 • Phe64Leu (F64L) = 1 • Arg54Thr (R54T) = 1
Fase de FAP / puntuación de PND	<ul style="list-style-type: none"> • Fase 1: 24 • Fase 2: 3 • I: 14 • II: 10 • IIIa: 2 • IIIb: 1
Uso de estabilizador de tetrámero concurrente en valor de referencia	13 tafamidis, 7 diflunisal, 7 ninguno
Uso de estabilizador de tetrámero actual ¹	12 tafamidis, 6 diflunisal, 9 ninguno
Dosis administradas totales	511
Mediana de dosis/paciente hasta la fecha	19 (intervalo 13-24)
Duración de tratamiento media	12,9 meses (intervalo 8,4-16,7)

Las características de valor de referencia incluyeron lo siguiente:

Característica	N	Media (intervalo)
mNIS+7a (deterioro máximo: 304)	27	52,9 (2,0 - 122,5)
NIS (deterioro máximo: 244)	27	34,8 (4,0 - 93,4)

- 5 Como se muestra en la tabla a continuación, la administración de patisirán dio como resultado una disminución de los niveles de TTR en suero. El patisirán logró una reducción de TTR en suero sostenida de aproximadamente el 80 %, con nadir adicional de hasta el 88 % entre dosis.

Día	N	% de disminución de expresión génica media
1	25	21,4
3	25	46,8
7	25	71,1
17	24	77,8
84	26	78,1
168	27	80,5
182	27	87,7
231	25	82,4
234	24	87,0
238	24	88,1
248	25	86,0
273	22+	80,7
357	22	81,3
371	18	87,1
462	3	79,2

- 10 Como se muestra en la tabla a continuación, la administración de patisirán dio como resultado un cambio en mNIS+7 medido a los 6 y 12 meses.

Componente de mNIS+7	Cambio con respecto a valor de referencia en el mes 6 (n=27)		Cambio con respecto a valor de referencia en el mes 12 (n=20)	
	Media (EEM)	Mediana (mín, máx)	Media (SEM)	Mediana (mín, máx)
Total	-1,4 (2,06)	-2 (-25,38, 22)	-2,5 (2,85)	-1,5 (-29,75, 24)
Debilidad según NIS	0,2 (1,17)	0 (-9,88, 16)	-0,5 (0,86)	0 (-10,38, 6)
Reflejos según NIS	-0,7 (0,49)	0 (-8, 3)	0,6 (0,43)	0 (-5,5, 4)
QST*	-1,1 (1,49)	-1,5 (-15, 16)	-2,6 (2,35)	-2 (-23, 19)
NCS Σ5	0,2 (0,13)	0 (-1,5, 1,5)	-0,1 (0,25)	0 (-2, 3,5)
PS ⁺ postural	0 (0,08)	0 (-1, 1)	-0,1 (0,11)	0 (-1,5, 0,5)

- 15 Como se muestra en la tabla a continuación, la administración de patisirán dio como resultado cambios en NIS a los 6 y 12 meses.

Componente de NIS	Cambio con respecto a valor de referencia en el mes 6 (n=27)		Cambio con respecto a valor de referencia en el mes 12 (n=20)	
	Media (EEM)	Mediana (intervalo)	Media (EEM)	Mediana (intervalo)
Total	-0,7 (1,3)	-1,0 (-12,9, 12)	0,4 (1,2)	-0,8 (-8,4, 11)
Debilidad según NIS	0,2 (1,2)	0 (-9,9, 16)	-0,5 (0,9)	0 (-10,4, 6)
Reflejos según NIS	-0,7 (0,5)	0 (-8, 3)	0,6 (0,44)	0 (-5,5, 4)
Sensibilidad según NIS	-0,3 (0,7)	0 (-9,5, 5)	0,4 (0,8)	0,5 (-5, 8)

La relación entre la progresión en Δ NIS o Δ mNIS+7 y concentración de TTR se exploró mediante regresión lineal como se muestra en la figura 1 y la figura 2. La TTR y el valor mínimo antes de la dosis promedio [TTR] se correlacionaron con un cambio en mNIS+7 a los 6 meses.

NIS y mNIS+7 se midieron a 0, 6 y 12 meses. Δ NIS o Δ mNIS+7 de 0 a 6 y de 0 a 12 meses se usaron como variables de respuesta. Las variables predictoras incluyeron dos medidas diferentes de concentración de TTR: área bajo la curva ("ABC") de concentración de proteína TTR, y disminución de expresión génica en porcentaje promedio de en relación con el valor de referencia en los días 84 y 168 (para comparaciones de 0-6 meses) y los días 84, 168, 273 y 357 (para comparaciones de 0-12 meses).

Para ambas medidas de TTR, "valor de referencia" se definió como el promedio de todos los valores antes de la dosis. La ABC de TTR se calculó usando concentraciones de TTR en bruto (μ g/ml) y el método de trapecios, comenzando en el valor de referencia (insertado en el día 0) y extendiéndose hasta el día 182 (para comparaciones de 0-6 meses) o el día 357 (para comparaciones de 0-12 meses). La disminución de expresión génica en porcentaje en relación con el valor de referencia se calculó en cada punto de tiempo programado. Se realizó una regresión lineal y se reportaron los valores de P asociados con la prueba de la hipótesis nula de que no existe asociación entre el predictor y la variable de respuesta.

Hubo un cambio medio en mNIS+7 y NIS de -2,5 y 0,4 puntos, respectivamente, a los 12 meses se compara favorablemente con el rápido aumento (por ejemplo, aumento de 10-18 puntos) en mNIS+7 y NIS estimadas a los 12 meses de estudios previos de FAP en una población de pacientes con NIS de valor de referencia similar. El impacto favorable de patisirán en la progresión de puntuación de deterioro de neuropatía se correlacionó con el grado de disminución de TTR. Esto demuestra que una reducción en la carga de TTR en suero por el patisirán conduce a un beneficio clínico en pacientes con FAP.

Lista de secuencias

<110> ALNYLAM PHARMACEUTICALS, INC.

<120> Métodos para tratar amiloidosis mediada por transtiretina (TTR)

<130> AA1274 EP

<140> EP 15 83 5924.0

<141> 27-08-2015

<150> US 62/150.596

<151> 21-04-2015

<150> US 62/044.100

<151> 29-08-2014

<160> 5

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético

<220>

ES 2 928 500 T3

	<223> Descripción de molécula de ADN/ARN combinados: oligonucleótido sintético	
	<400> 1	
5	guaaccaaga guauccaut t	21
	<210> 2	
	<211> 21	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético	
	<220>	
15	<223> Descripción de molécula de ADN/ARN combinados: oligonucleótido sintético	
	<400> 2	
	auggaaucu cuugguact t	21
20	<210> 3	
	<211> 37	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: cebador sintético	
	<400> 3	
30	aatcaagtta aagtggaatg aaaagtgcct ttcacag	37
	<210> 4	
	<211> 30	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: cebador sintético	
	<400> 4	
40	gcctttcaca ggaatgtttt attgtctctg	30
	<210> 5	
	<211> 34	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: cebador sintético	
50	<400> 5	
	ctctgcctgg acttctaaca tagcatatga ggtg	34

REIVINDICACIONES

1. Patisirán para su uso en un método para reducir una puntuación de deterioro de neuropatía (NIS) o una NIS modificada (mNIS+7) en un sujeto humano que tiene una polineuropatía amiloide familiar, en donde tras la administración, la concentración de proteína TTR en suero se reduce por debajo de 50 µg/ml o en al menos un 80 %, en donde patisirán es una formulación estéril de un ARNip con DLin-MC3-DMA, DSPC, colesterol, y PEG2000-C-DMG en disolución salina tamponada con fosfato isotónico, consistiendo dicho ARNip en una hebra de sentido con la secuencia de GuAAccAAGAGuAuuccAudTdT y una hebra de antisentido con la secuencia de AUGGAAuACUCUUGGUuACdTdT, en donde se administrará patisirán mediante infusión intravenosa a una dosis de 0,3 mg/kg una vez cada tres semanas;
- 5
- 10
- en donde además se usa una medicación previa que reduce el riesgo de reacciones relacionadas con la infusión, en donde la medicación previa consiste en dexametasona, paracetamol, un bloqueante de H₂ y un bloqueante de H₁.
- 15
2. Patisirán para su uso según la reivindicación 1, en donde la administración del mismo da como resultado una reducción de NIS o mNIS+7 en al menos un 10 %.
3. Patisirán para su uso según la reivindicación 1, en donde la administración del mismo da como resultado la detención del aumento de NIS o mNIS+7.
- 20
4. Patisirán para su uso según la reivindicación 1, en donde tras la administración, la concentración de proteína TTR en suero se reduce por debajo de 40 µg/ml, 25 µg/ml o 10 µg/ml.
- 25
5. Patisirán para su uso según la reivindicación 1, en donde tras la administración, la concentración de proteína TTR en suero se reduce en al menos un 85 %, 90 % o 95 %.
6. Patisirán para su uso según la reivindicación 5, en donde patisirán se administrará una vez cada 21 días, opcionalmente una vez cada 21 días a través de una infusión de 70 minutos de 1 ml/min durante 15 minutos seguido de 3 ml/min durante 55 minutos.
- 30
7. Patisirán para su uso según la reivindicación 5, en donde patisirán se administrará en dos dosis cada 21-28 días a través de una infusión de 60 minutos de 3,3 ml/min, o a través de una infusión de 70 minutos de 1,1 ml/min durante 15 minutos seguido de 3,3 ml/min durante 55 minutos.
- 35
8. Patisirán para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la concentración de proteína TTR en suero se determinará mediante un ensayo basado en inmunoquímica, un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), un ensayo para determinar la concentración de vitamina A, un ensayo para determinar la concentración de RBP, o un ensayo para determinar la concentración de ARNm de TTR.
- 40
9. Patisirán para su uso según la reivindicación 1, en donde
- (i) el bloqueante de H₂ es ranitidina o famotidina; y/o
- 45
- (ii) el bloqueante de H₁ es cetirizina, hidroxizina o fexofenadina.

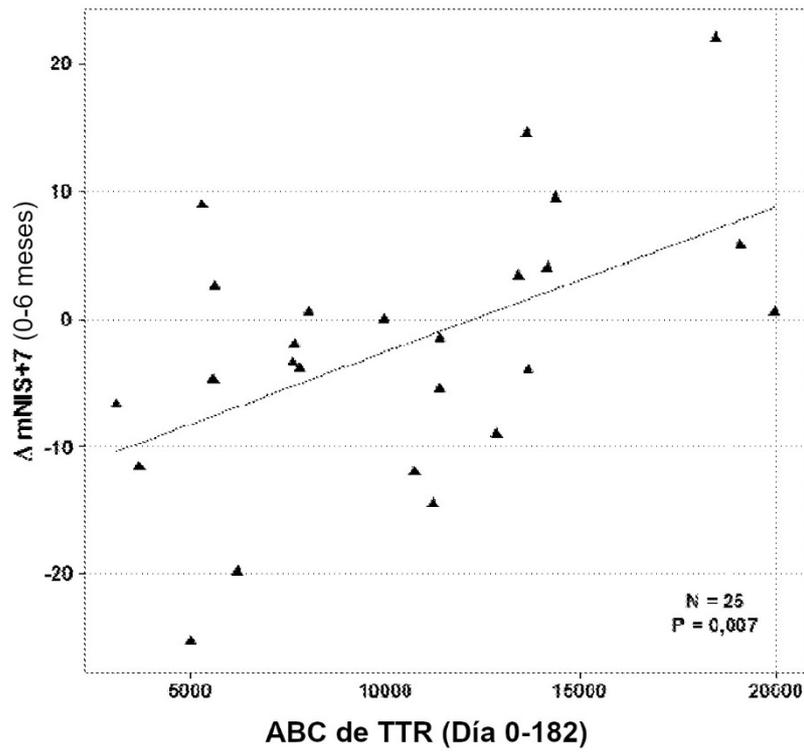


FIG. 1

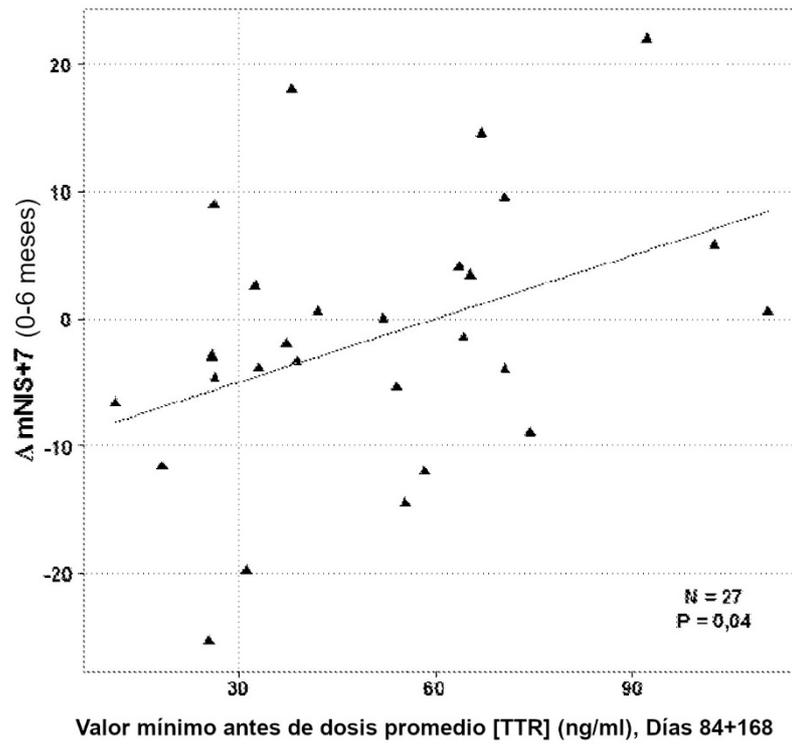


FIG. 2