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

(11) BR 112015027377-7 B1

(22) Data do Depósito: 01/05/2014

(45) Data de Concessão: 10/01/2023

(54) Título: COMPOSTOS OLIGOMÉRICOS COM GRUPOS DE CONJUGADO, COMPOSIÇÕES COMPREENDENDO OS REFERIDOS COMPOSTOS E USOS DOS MESMOS

(51) Int.Cl.: A61K 31/7125.

(30) Prioridade Unionista: 01/05/2013 US 61/818,442; 08/04/2014 US 61/976,991; 08/07/2013 US 61/843,887; 15/05/2013 US 61/823,826; 20/09/2013 US 61/880,790; (...).

(73) Titular(es): IONIS PHARMACEUTICALS, INC..

(72) Inventor(es): THAZHA P. PRAKASH; ERIC E. SWAYZE; PUNIT P. SETH; MARK J. GRAHAM.

(86) Pedido PCT: PCT US2014036462 de 01/05/2014

(87) Publicação PCT: WO 2014/179626 de 06/11/2014

(85) Data do Início da Fase Nacional: 28/10/2015

(57) Resumo: COMPOSTOS OLIGOMÉRICOS COM GRUPOS DE CONJUGADO, COMPOSIÇÕES COMPREENDENDO OS REFERIDOS COMPOSTOS E USOS DOS MESMOS. São fornecidos aqui compostos oligoméricos com grupos de conjugado que se direcionam à apolipoproteína C- III (ApoCIII). Em determinadas modalidades, os compostos oligoméricos que se direcionam à ApoCIII estão conjugados à N-Acetilgalactosamina. Também são divulgados aqui compostos conjugados oligomérico os que se direcionam à ApoCIII para uso na diminuição da ApoCIII para tratar, prevenir ou melhorar doenças, distúrbios ou condições relacionadas à ApoCIII. Determinadas doenças, distúrbios ou condições relacionadas à ApoCIII incluem doenças, distúrbios ou condições inflamatórias, cardiovasculares e/ou metabólicas. Os compostos oligoméricos conjugados divulgados aqui podem ser usados para tratar tais doenças, distúrbios ou condições em um indivíduo em necessidade.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"COMPOSTOS OLIGOMÉRICOS COM GRUPOS DE CONJUGADO, COMPOSIÇÕES COMPREENDENDO OS REFERIDOS COMPOSTOS E USOS DOS MESMOS".**

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

[001] O presente pedido está sendo depositado junto com uma Listagem de Sequência em formato eletrônico. A Listagem de Sequência é fornecida como um arquivo intitulado BIOL0249WOSEQ_ST25.txt criado em 1º de maio de 2013, que tem 68 Kb de tamanho. As informações no formato eletrônico da listagem sequência são incorporadas aqui por referência na sua totalidade.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[002] O princípio por trás da tecnologia antissenso é que um composto antissenso se hibridiza em um ácido nucleico alvo e modula a quantidade, atividade e/ou a função do ácido nucleico alvo. Por exemplo em certos casos, compostos antissensos resultam na transcrição alterada ou tradução de um alvo. Tal modulação da expressão pode ser conseguida, por exemplo, a degradação do mRNA alvo ou inibição baseada na ocupação. Um exemplo de modulação da função alvo de RNA pela degradação é a degradação à base de RNase H do RNA alvo mediante hibridação com um composto antissenso semelhante ao DNA. Outro exemplo de modulação da expressão gênica pela degradação do alvo é o RNA de interferência (RNAi). RNAi refere-se ao silenciamento de genes mediado por antissenso através de um mecanismo que utiliza o complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC). Um exemplo adicional de modulação da função alvo do RNA é através de um mecanismo baseado em ocupação, tal como empregado naturalmente pelo microRNA. MicroRNAs são pequenos RNAs não codificantes que regulam a expressão de RNAs codificantes de proteínas. A ligação de um composto antissenso para um microRNA impede que o microRNA se

ligue a seus alvos de RNA mensageiro e, portanto, interfere com a função do microRNA. Mímicos de MicroRNA podem melhorar a função nativa do microRNA. Certos compostos antissenso alteram a junção do pré-mRNA. Independentemente do mecanismo específico, a especificidade da sequência torna compostos antissenso atraentes como ferramentas para validação de alvo e funcionalização do gene, bem como terapêutica para modular seletivamente a expressão dos genes envolvidos na patogênese das doenças.

[003] A tecnologia antissenso é um meio eficaz para modular a expressão de um ou mais produtos de genes específicos e, portanto, pode revelar-se excepcionalmente útil em um número de diagnósticos, terapêuticos e aplicações de pesquisa. Nucleosídeos modificados quimicamente podem ser incorporados em compostos antissenso para melhorar uma ou mais propriedades, como resistência à nuclease, farmacocinética ou afinidade por um alvo do ácido nucleico. Em 1998, o composto antissenso, Vitravene® (fomivirsen; desenvolvido pela Isis Pharmaceuticals Inc., Carlsbad, CA) foi o primeiro fármaco antissenso de conseguir liberação de comercialização dos U.S. Food and Drug Administration (FDA), e atualmente é um tratamento da retinite induzida por citomegalovírus (CMV) em pacientes com AIDS.

[004] Novas modificações químicas melhoraram a potência e eficácia de compostos antissenso, descobrindo o potencial para a distribuição oral, bem como potencializando a administração subcutânea, diminuindo o potencial de efeitos colaterais, e levando a melhorias do conforto do paciente. Modificações químicas, aumentando a potência de compostos antissenso permitem a administração de doses mais baixas, o que reduz o potencial de toxicidade, bem como diminuindo o custo total da terapia. Modificações aumentando a resistência à degradação resultam em depuração mais lenta do corpo, permitindo uma dosagem menos frequente. Diferentes tipos de modificações químicas podem ser

combinados em um composto para otimizar ainda mais a eficácia do composto.

[005] A apolipoproteína C-III (também chamada APOC3, APOC-III, ApoCIII e APO C-III) é um constituinte de HDL e de lipoproteínas ricas em triglicerídeos (TG). Níveis elevados de ApoCIII estão associados a níveis elevados de TG e a doenças como doenças cardiovasculares, síndrome metabólica, obesidade e diabetes (Chan et al., Int J Clin-Pract, 2008, 62:799-809; Onat et at., *Atherosclerosis*, 2003, 168:81-89; Mendivil *et al., Circulation*, 2011, 124:2065-2072; Mauger et al., *J. Lipid Res*, 2006. 47: 1212-1218; Chan et al., *Clin. Chem*, 2002. 278-283; Ooi et al., *Clin. Sci*, 2008. 114: 611-624; Davidsson et al., J. Lipid Res. 2005. 46: 1999-2006; Sacks et al., *Circulation*, 2000. 102. 1886-1892; Lee et al., Arterioscler Thromb *Vasc Biol*, 2003. 23: 853-858). ApoCIII retarda a clearance de lipoproteínas ricas em TG pela inibição de lipólise por meio da inibição da lipoproteína lipase (LPL) e por meio da interferência com a lipoproteína que se liga à matriz de glicosaminoglicano da superfície celular (Shachter, *Curr. Opin. Lipidol, 2001, 12, 297-304)*.

[006] A tecnologia antissenso está emergindo como um meio eficaz para reduzir a expressão de determinados produtos do gene e, portanto, pode vir a ser bem útil em uma série de aplicações terapêuticas, de diagnóstico, e de pesquisa para a modulação de ApoCIII. Compostos antissenso que direcionam a ApoCIII e métodos associados para inibição da ApoCIII foram divulgados anteriormente (ver, por exemplo, Patente U.S. Nº 7.598.227, Patente U.S. Nº 7.750.141, publicação PCT WO 2004/093783, publicação PCT WO 2012/149495 e PCT/US14/016546, todos incorporados por referência aqui). Um composto antissenso que direciona a ApoCIII, ISIS-APOCIII$_{Rx}$ foi testado em uma Fase I e em ensaios clínicos II. No entanto, nenhum composto antissenso que direciona a ApoCIII foi aprovado para uso comercial, portanto, ainda há uma necessidade de oferecer aos pacientes opções de

tratamento adicionais e mais potentes.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[007] Em determinadas modalidades, a presente divulgação fornece compostos antissenso conjugados. Em determinadas modalidades, a presente divulgação fornece compostos antissenso conjugados, compreendendo o oligonucleotídeo antissenso complementar a um transcrito de ácido nucleico. Em determinadas modalidades, a presente divulgação fornece métodos que compreendem o contato de uma célula com um composto antissenso conjugado compreendendo um oligonucleotídeo antissenso complementar a um transcrito de ácido nucleico. Em determinadas modalidades, a presente divulgação fornece métodos que compreendem o contato de uma célula com um composto antissenso conjugado compreendendo um oligonucleotídeo antissenso e reduzindo a quantidade ou a atividade de um transcrito de ácido nucleico em uma célula.

[008] O receptor da asialoglicoproteína (ASGP-R) foi descrito anteriormente. Ver, por exemplo, Park et al., PNAS vol. 102, No. 47, pp 17125-17129 (2005). Esses receptores são expressos em células do fígado, particularmente hepatócitos. Além disso, verificou-se que compostos composto por aglomerados de três ligantes N-acetilgalactosamina (GalNAc) são capazes de vinculação ao ASGP-r, resultando em absorção do composto para a célula. Ver, por exemplo, Khorev et al., Bioorganic and Medicinal Chemistry, 16, 9, pp 5216-5231 (maio de 2008). Nesse sentido, os conjugados compreendendo esses agrupamentos de GalNAc têm sido utilizado para facilitar a absorção de certos compostos nas células do fígado, especificamente nos hepatócitos. Por exemplo, foi mostrado que certos conjugados contendo GalNAc aumentam a atividade de compostos de siRNA duplex nas células do fígado in vivo. Em tais casos, o conjugado contendo GalNAc está normalmente

ligado à fita senso do siRNA duplex. Uma vez que a fita senso é descartada antes que a fita antissenso se hibridize, enfim, no ácido nucleico alvo, há pouca preocupação de que o conjugado interfira na atividade. Normalmente, o conjugado é ligado à extremidade 3' da fita senso do siRNA. Ver, por exemplo, a Patente U.S. 8.106.022. Certos grupos de conjugados descritos aqui são mais ativos e/ou mais fáceis de sintetizar do que os grupos de conjugados descritos anteriormente.

[009] Em determinadas modalidades da presente invenção, os conjugados são ligados aos compostos antissenso de fita única, incluindo, mas não se limitando a compostos antissenso baseados em RNase H e compostos antissenso que alteram a junção de um ácido nucleico alvo de pré-mRNA. Em tais modalidades, o conjugado deve permanecer ligado ao composto antissenso tempo suficiente para fornecer o benefício (absorção melhorada nas células) mas em seguida deve ser clivado, ou de outra forma para não interferir nas etapas subsequentes necessárias para a atividade, tais como a hibridização de um ácido nucleico alvo e a interação com a RNase H ou com enzimas associadas à junção ou à modulação por splice. Esse equilíbrio de propriedades é mais importante na configuração dos compostos antissenso de fiar única do que nos compostos de siRNA, onde o conjugado pode simplesmente estar ligado à fita senso. Divulgados aqui estão os compostos antissenso de fita única conjugados tendo potência melhorada nas células do fígado in vivo em comparação com o mesmo composto antissenso em que falta o conjugado. Dado o equilíbrio necessário das propriedades para esses compostos, tal potência melhorada é surpreendente.

[0010] Em determinadas modalidades, os grupos de conjugado compreendem aqui uma porção clivável. Como observado, sem querer estar vinculado pelo mecanismo, é lógico que o conjugado deve perma-

necer no composto tempo suficiente para proporcionar melhoria na absorção, mas após isso, é desejável que uma alguma parte ou, idealmente, a totalidade do conjugado seja clivada, liberando o composto de origem (por exemplo, composto antissenso) em sua forma mais ativa. Em determinadas modalidades, a porção clivável é um nucleosídeo clivável. Tais modalidades tiram proveito de nucleases endógenas na célula, ligando o resto do conjugado (o agrupamento) ao oligonucleotídeo antissenso através de um nucleosídeo através de uma ou mais ligações cliváveis, tais como aquelas de uma ligação fosfodiéster. Em determinadas modalidades, o agrupamento está ligado ao nucleosídeo clivável através de uma ligação fosfodiéster. Em determinadas modalidades, o nucleosídeo clivável está ligado ao oligonucleotídeo antissenso (composto antissenso) por uma ligação fosfodiéster. Em determinadas modalidades, o grupo do conjugado pode compreender dois ou três nucleosídeos cliváveis. Em tais modalidades, tais nucleosídeos cliváveis estão ligados um ao outro, ao composto antissenso e/ou ao agrupamento por meio de ligações cliváveis (tais como aquelas de uma ligação fosfodiéster). Certos conjugados aqui não compreendem um nucleosídeo clivável e, em vez disso, compreendem uma ligação clivável. É mostrado que a clivagem suficiente do conjugado a partir do oligonucleotídeo é proporcionada por pelo menos uma ligação que é vulnerável à clivagem na célula (uma ligação clivável).

[0011] Em determinadas modalidades, os compostos antissenso conjugados são profármacos. Tais profármacos são administrados a um animal e são, enfim, metabolizados numa forma mais ativa. Por exemplo, os compostos antissenso conjugados são clivados para remover a totalidade ou parte do conjugado resultando na forma ativa (ou mais ativa) do composto antissenso em que falta a totalidade ou uma parte do conjugado.

[0012] Em determinadas modalidades, os conjugados são ligados

na extremidade 5' de um oligonucleotídeo. Alguns desses conjugados 5' são clivados mais eficientemente do que as contrapartes tendo um grupo de conjugado semelhante liagdo à extremidade 3'. Em determinadas modalidades, a atividade melhorada pode se correlacionar com a clivagem melhorada. Em determinadas modalidades, os oligonucleotídeos compreendendo um conjugado na extremidade 5' tem maior eficácia do que os oligonucleotídeos compreendendo um conjugado na extremidade 3' (ver, por exemplo, Exemplos, 56, 81, 83 e 84). Além disso, a ligação em 5' permite uma síntese mais simples do oligonucleotídeo. Normalmente, os oligonucleotídeos são sintetizados em um suporte sólido na direção 3' para 5'. Para fazer o oligonucleotídeo conjugado em 3', normalmente, liga-se um nucleosídeo pré-conjugado 3' ao suporte sólido e então monta-se o oligonucleotídeo como de costume. No entanto, a ligação desse nucleosídeo conjugado ao suporte sólido adiciona uma complicação à síntese. Além disso, usando essa abordagem, o conjugado está então presente em toda a síntese do oligonucleotídeo e pode tornar-se degradado durante as etapas subsequentes ou pode limitar os tipos de reações e reagentes que podem ser usados. Usando as estruturas e as técnicas descritas aqui para oligonucleotídeos conjugados em 5', podemos sintetizar o oligonucleotídeo usando técnicas padrão automatizadas e introduzir o conjugado com o nucleosídeo (mais extremo em 5') final ou depois do oligonucleotídeo ter sido clivado do suporte sólido.

[0013] Tendo em vista a técnica e a presente divulgação, um versado na técnica pode facilmente fabricar qualquer um dos conjugados e oligonucleotídeos conjugados aqui. Além disso, a síntese de tais conjugados e oligonucleotídeos conjugados divulgados aqui é mais fácil e/ou requer algumas etapas, e é, portanto, menos caro do que a dos conjugados anteriormente divulgados, oferecendo vantagens na fabricação.

Por exemplo, a síntese de certos grupos de conjugado consiste em menos etapas sintéticas, resultando em aumento de rendimento, em relação aos grupos de conjugado descritos anteriormente. Os grupos de conjugado, tais como GalNAc3-10 no Exemplo 46 e GalNAc3-7 no Exemplo 48 são muito mais simples do os conjugados descritos anteriormente, tais como os descritos em U.S. 8.106.022 ou U.S. 7.262.177 que exigem o conjunto de mais intermediários químicos. Por conseguinte, esses e outros conjugados descritos aqui têm vantagens sobre os compostos descritos anteriormente para uso com qualquer oligonucleotídeo, incluindo oligonucleotídeos de fita única e qualquer fita de oligonucleotídeos de fita dupla (por exemplo, siRNA).

[0014] De forma semelhante, são divulgados aqui grupos de conjugado tendo apenas um ou dois ligantes de GalNAc. Como mostrado, tais grupos de conjugados melhoram a atividade dos compostos antissenso. Tais compostos são mais fáceis de preparar do que os conjugados compreendendo três ligantes de GalNAc. Os grupos de conjugado que compreendem um ou dois ligantes de GalNAc podem estar ligados a quaisquer compostos antissenso, incluindo oligonucleotídeos de fita única e qualquer fita de oligonucleotídeos de fita dupla (por exemplo, siRNA).

[0015] Em determinadas modalidades, os conjugados aqui não alteram substancialmente certas medidas de tolerabilidade. Por exemplo, é mostrado aqui que os compostos antissenso conjugados não são mais imunogênicos do que os compostos de origem não conjugados. Uma vez que a potência é melhorada, as modalidades, em que a tolerabilidade permanece a mesma (ou de fato, mesmo se a tolerabilidade piorar apenas ligeiramente em comparação com os ganhos de potência), têm propriedades melhoradas para a terapia.

[0016] Em determinadas modalidades, a conjugação permite alterar

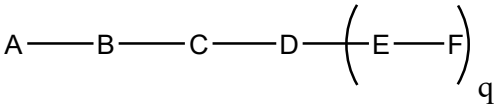
os compostos antissenso de formas a ter consequências menos atraentes na ausência de conjugação. Por exemplo, em determinadas modalidades, a substituição de uma ou mais ligações de fosforotioato de um composto antissenso totalmente de fosforotioato com ligações fosfodiéster resulta na melhoria de algumas medidas de tolerabilidade. Por exemplo, em certos casos, tais compostos antissenso, que têm um ou mais fosfodiéster, são menos imunogênicos do que o mesmo composto, em que cada ligação é um fosforotioato. No entanto, em certos casos, conforme mostrado no Exemplo 26, essa mesma substituição de uma ou mais ligações fosforotioato com ligações fosfodiéster também resulta numa absorção celular reduzida e/ou perda de potência. Em determinadas modalidades, os compostos antissenso conjugados descritos aqui toleram tal mudança em ligações com pouca ou nenhuma perda na absorção e potência quando comparados com a contraparte de fosforotioato inteira conjugada. Na verdade, em determinadas modalidades, por exemplo, nos Exemplos 44, 57, 59 e 86, os oligonucleotídeos compreendendo um conjugado e, pelo menos, uma ligação internuclesídica de fosfodiéster, na verdade, exibem um aumento de potência in vivo, até mesmo em relação a uma contraparte de fosforotioato completo compreendendo também o mesmo conjugado. Além disso, uma vez que conjugação resulta em aumentos substanciais na absorção/potência uma pequena perda em que o ganho substancial pode ser aceitável para alcançar tolerância melhorada. Por conseguinte, em determinadas modalidades, compostos antissenso conjugados compreendem pelo menos uma ligação fosfodiéster.

[0017] Em determinadas modalidades, a conjugação de compostos antissenso resulta, aqui, em maior distribuição, absorção e atividade nos hepatócitos. Assim, mais composto é distribuído para o tecido hepático. No entanto, em determinadas modalidades, a distribuição aumentada sozinha não explica o aumento todo na atividade. Em algumas dessas

modalidades, mais compostos entram nos hepatócitos. Em determinadas modalidades, mesmo que o aumento da absorção de hepatócitos não explique o aumento total na atividade. Em tais modalidades, a absorção produtiva do composto conjugado é aumentada. Por exemplo, como mostrado no Exemplo 102, determinadas modalidades dos conjugados contendo GalNAc aumentam o enriquecimento dos oligonucleotídeos antissenso em hepatócitos versus células não parenquimatosas. Este enriquecimento é benéfico para os oligonucleotídeos que se direcionam aos genes que são expressos nos hepatócitos.

[0018] Em determinadas modalidades, os compostos antissenso conjugados aqui resultam na exposição reduzida do rim. Por exemplo, como mostrado no Exemplo 20, as concentrações dos oligonucleotídeos antissenso compreendendo determinadas modalidades de conjugados contendo GalNAc são inferiores no rim do que a dos oligonucleotídeos antissenso sem um conjugado contendo GalNAc. Há várias implicações terapêuticas benéficas. Para indicações terapêuticas em que não se busca a atividade no rim, a exposição do rim arrisca a toxicidade renal, sem benefício correspondente. Além disso, a alta concentração no rim geralmente resulta na perda do composto na urina resultando em uma depuração mais rápida. Nesse sentido, para alvos não renais, o acúmulo renal é indesejado.

[0019] Em determinadas modalidades, a presente divulgação fornece compostos antissenso conjugados representados pela fórmula:



em que

[0020] A é o oligonucleotídeo antissenso;

[0021] B é a porção clivável

[0022] C é o ligador do conjugado

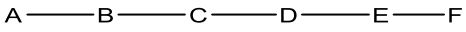
[0023] D é o grupo de ramificação

[0024] cada E é uma corrente;

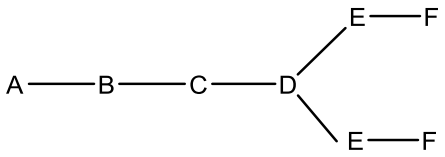
[0025] cada F é um ligante; e

[0026] q é um número inteiro entre 1 e 5.

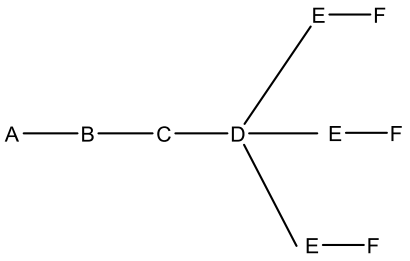
[0027] No diagrama acima e nos diagramas similares contidos aqui, o grupo de ramificação "D" ramifica-se tantas vezes quanto for necessário para acomodar o número dos grupos (E-F), conforme indicado por "q". Assim, onde q = 1, a fórmula é:



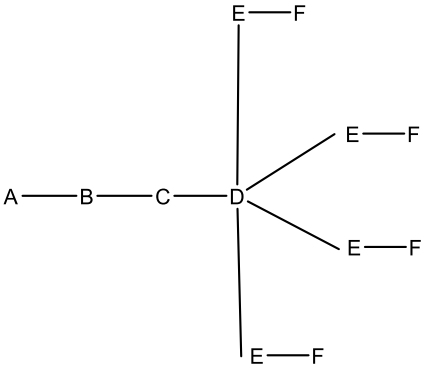
onde q = 2, a fórmula é:



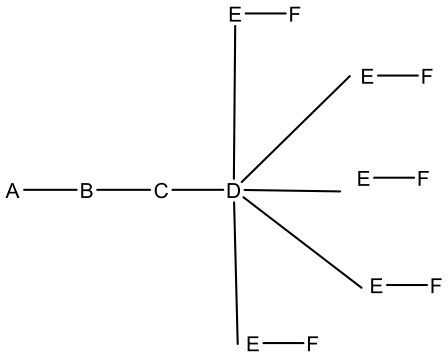
onde q = 3, a fórmula é:



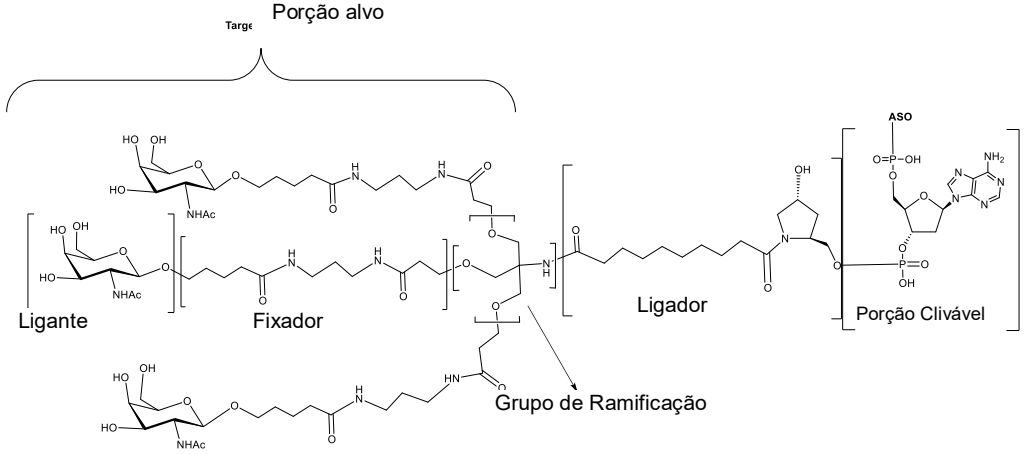
onde q = 4, a fórmula é:



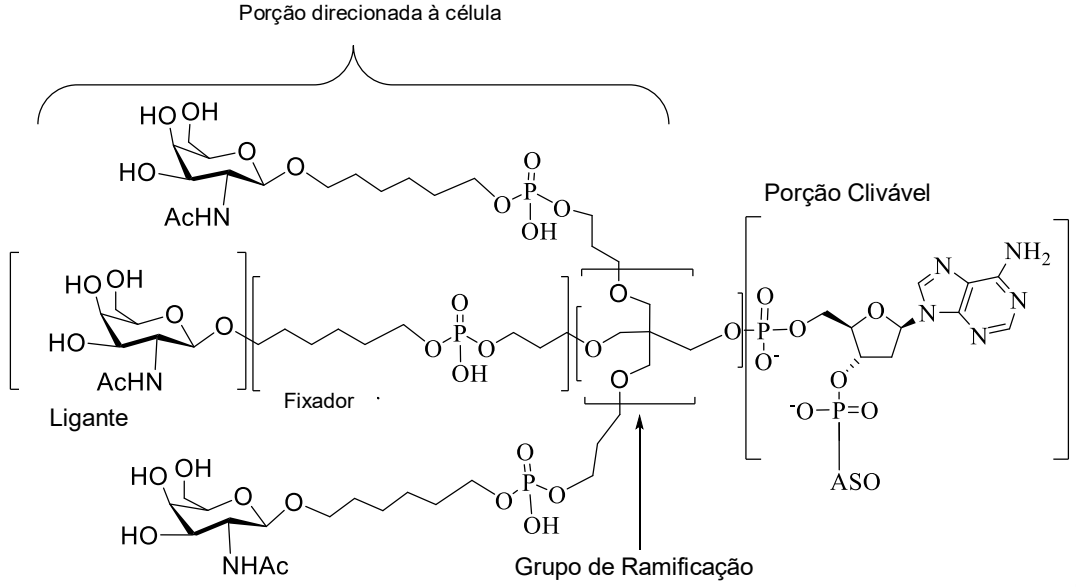
onde q = 5, a fórmula é:



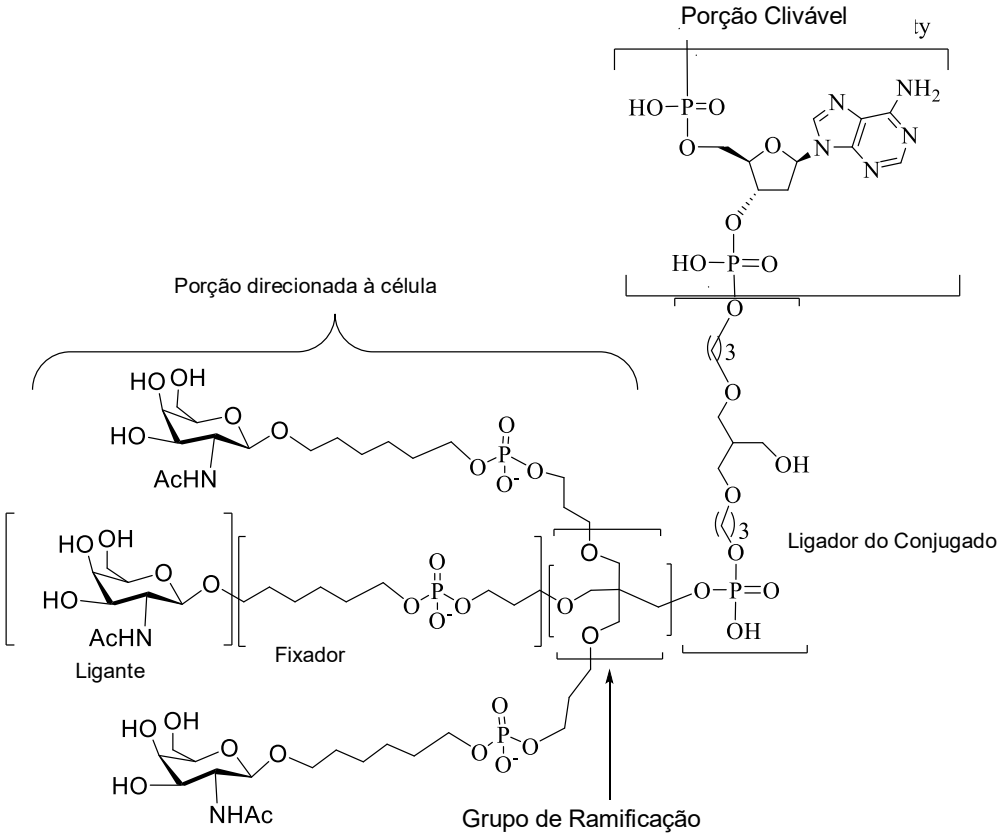
[0028] Em determinadas modalidades, os compostos antissenso conjugados são fornecidos tendo a estrutura:



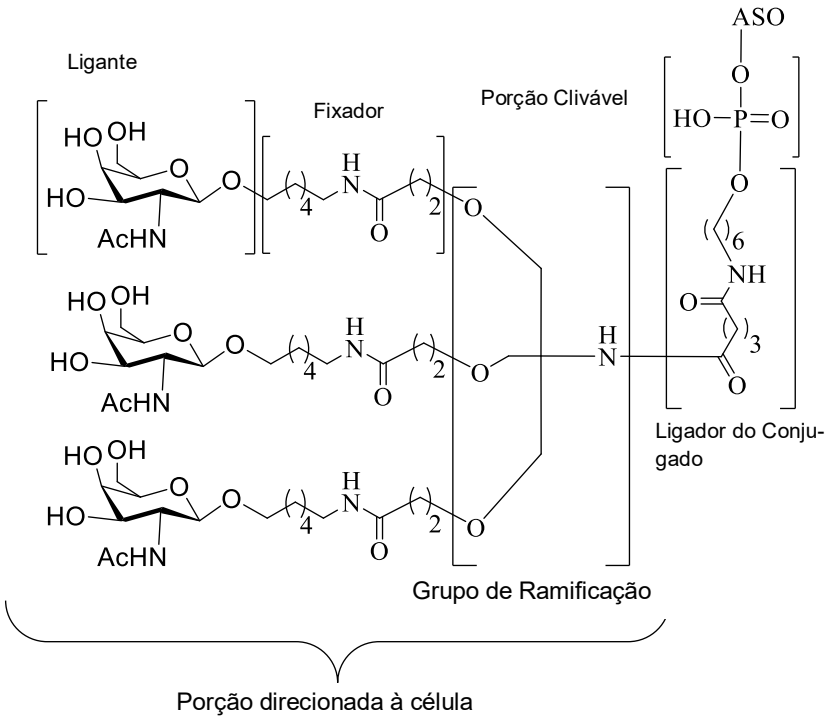
[0029] Em determinadas modalidades, os compostos antissenso conjugados são fornecidos tendo a estrutura:



[0030] Em determinadas modalidades, os compostos antissenso conjugados são fornecidos tendo a estrutura:



[0031] Em determinadas modalidades, os compostos antissenso conjugados são fornecidos tendo a estrutura:



[0032] A presente divulgação fornece as seguintes modalidades não limitantes:

[0033] Em modalidades que têm mais de uma variável específica (por exemplo, mais de um "m" ou "n"), salvo indicação em contrário, cada uma dessa variável específica é selecionada independentemente. Assim, para uma estrutura que tem mais de um n, cada n é selecionado de forma independente assim, eles podem ser iguais ou diferentes uns dos outros.

[0034] Certas modalidades fornecem um composto compreendendo um oligonucleotídeo modificado que direciona ApoCIII e um grupo conjugado, em que o oligonucleotídeo modificado consiste em 12 a 30 nucleosídeos ligados e compreende: Em certas modalidades, o oligonucleotídeo modificado com o grupo de conjugado consiste em 20 nucleosídeos ligados.

[0035] Certas modalidades fornecem um composto compreendendo um oligonucleotídeo modificado que direciona ApoCIII e um grupo conjugado, em que o oligonucleotídeo modificado consiste em 12 a 30 nucleosídeos ligados e compreende uma sequência de nucleobase complementar a uma parte do comprimento equivalente de nucleobases 3533 a 3552 da SEQ ID NO: 3, em que a sequência de nucleobase do oligonucleotídeo modificado é pelo menos 80% complementar à SEQ ID NO: 3.

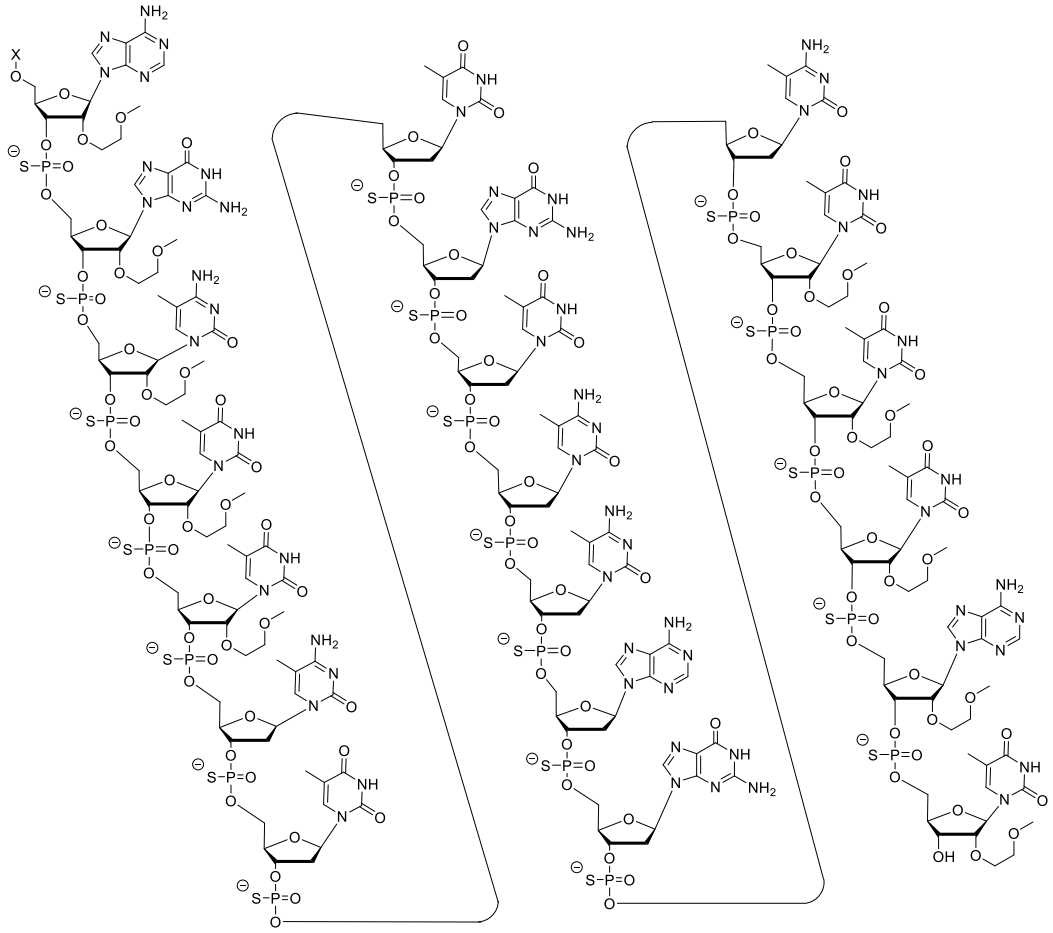
[0036] Certas modalidades fornecem um composto compreendendo um oligonucleotídeo modificado que direciona ApoCIII e um grupo conjugado, em que o oligonucleotídeo modificado consiste em 12 a 30 nucleosídeos ligados e compreende uma sequência de nucleobase complementar a uma parte do comprimento equivalente de nucleobases 3514 a 3558 da SEQ ID NO: 3, em que a sequência de nucleobase do oligonucleotídeo modificado é pelo menos 80% complementar à SEQ ID NO: 3.

[0037] Certas modalidades fornecem um composto compreendendo um oligonucleotídeo modificado que direciona ApoCIII e um

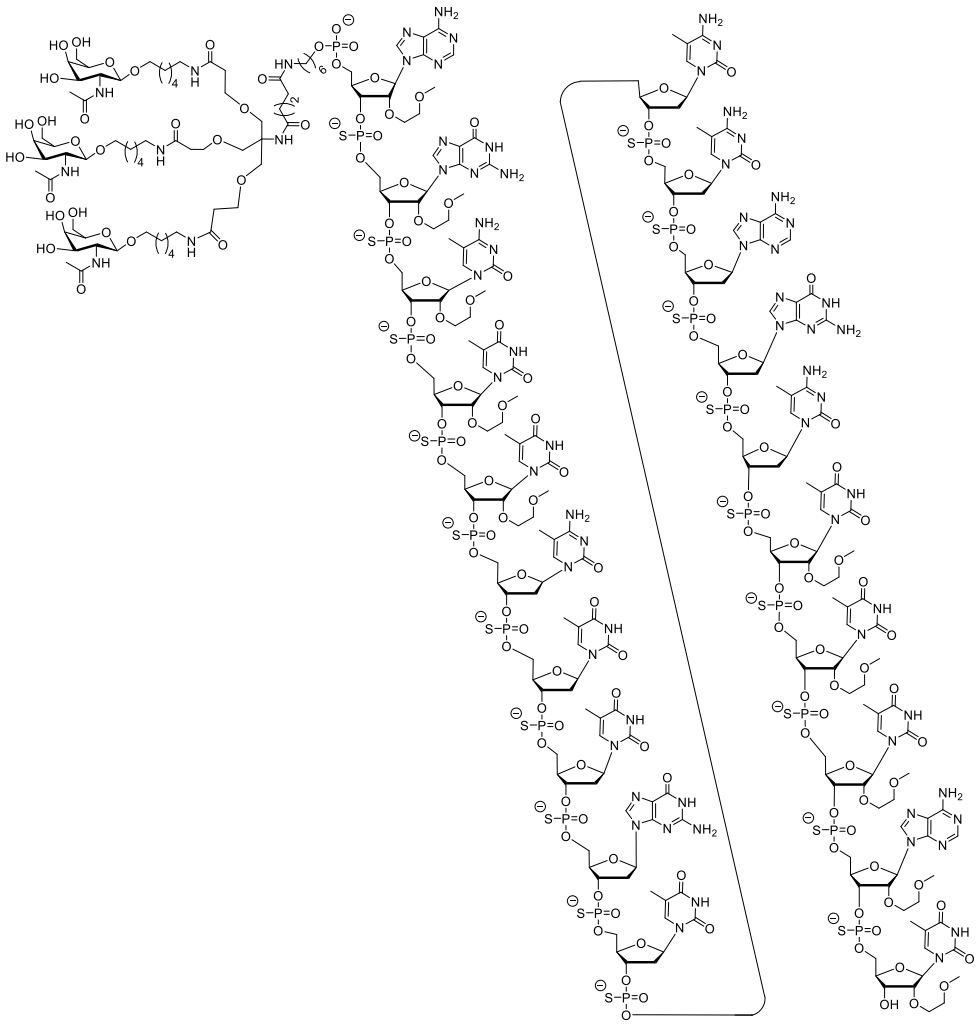
grupo conjugado, em que o oligonucleotídeo modificado consiste em 12 a 30 nucleosídeos ligados e tem uma sequência de nucleobase de quaisquer sequências de nucleobases da SEQ ID NOs: 19-96, 209-221. Em certas modalidades, o oligonucleotídeo modificado conjugado tem uma sequência de nucleobase compreendendo pelo menos 8 nucleobases contíguas de qualquer uma das sequências de nucleobase de SEQ ID NOs: 19-96, 209-221. Em determinadas modalidades, o composto consiste em qualquer SEQ ID NOs: 19-96, 209-221 e um grupo conjugado.

[0038] Determinadas modalidades fornecem um composto que compreende um oligonucleotídeo modificado que direciona ApoCIII e um grupo conjugado, em que o oligonucleotídeo modificado consiste em 12 a 30 nucleosídeos ligados e tem uma sequência de nucleobase de SEQ ID NO: 87. Em certas modalidades, o oligonucleotídeo modificado com o grupo de conjugado tem uma sequência de nucleobase compreendendo pelo menos 8 nucleobases contíguas da sequência de nucleobase de SEQ ID NO: 87. Em determinadas modalidades, o composto consiste em SEQ ID NO: 87 e um grupo conjugado.

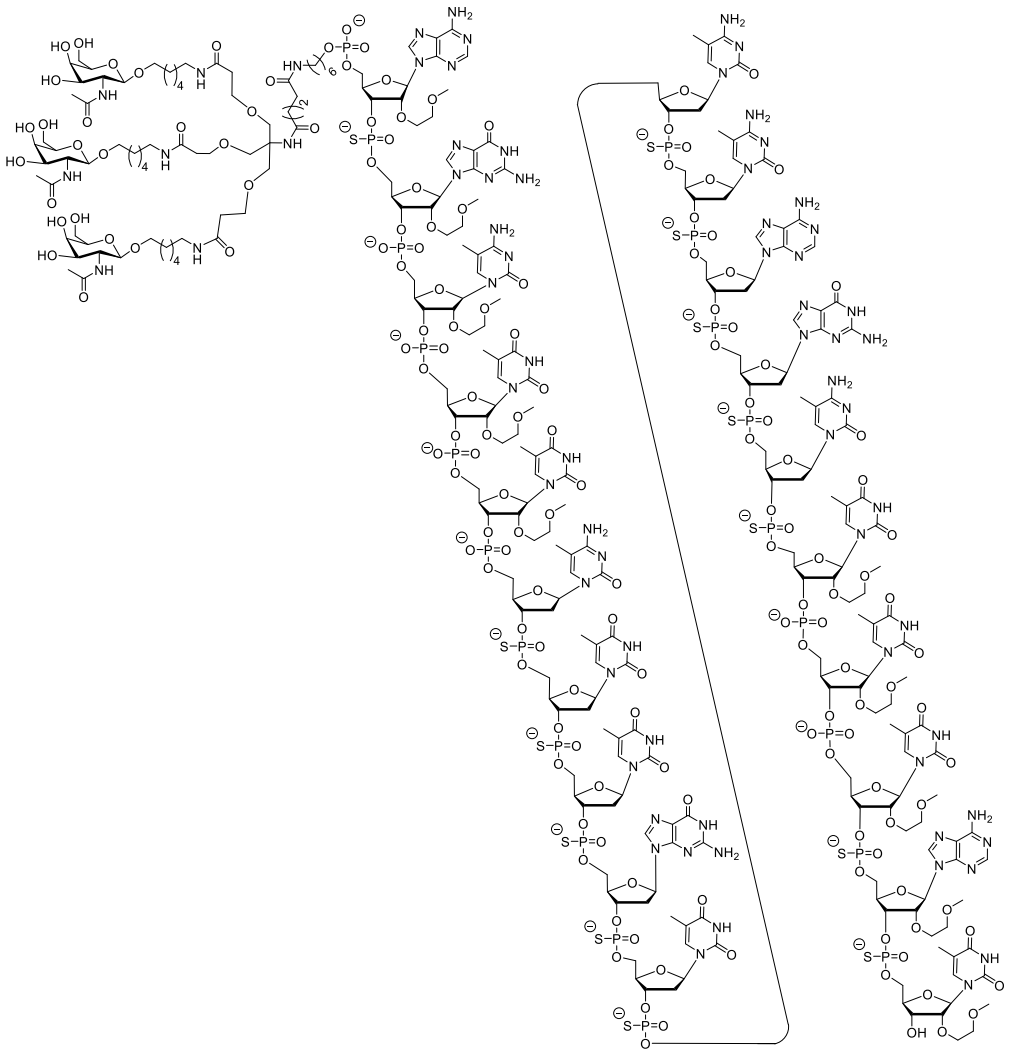
[0039] Em determinadas modalidades, a presente divulgação fornece compostos antissenso conjugados representados pela seguinte estrutura. Em determinadas modalidades, o composto antissenso compreende o oligonucleotídeo modificado ISIS 304801 com 5'-X, onde X é um grupo de conjugado que compreende GalNAc. Em determinadas modalidades, o composto antissenso consiste no oligonucleotídeo modificado ISIS 304801 com 5'-X, onde X é um grupo de conjugado que compreende GalNAc.



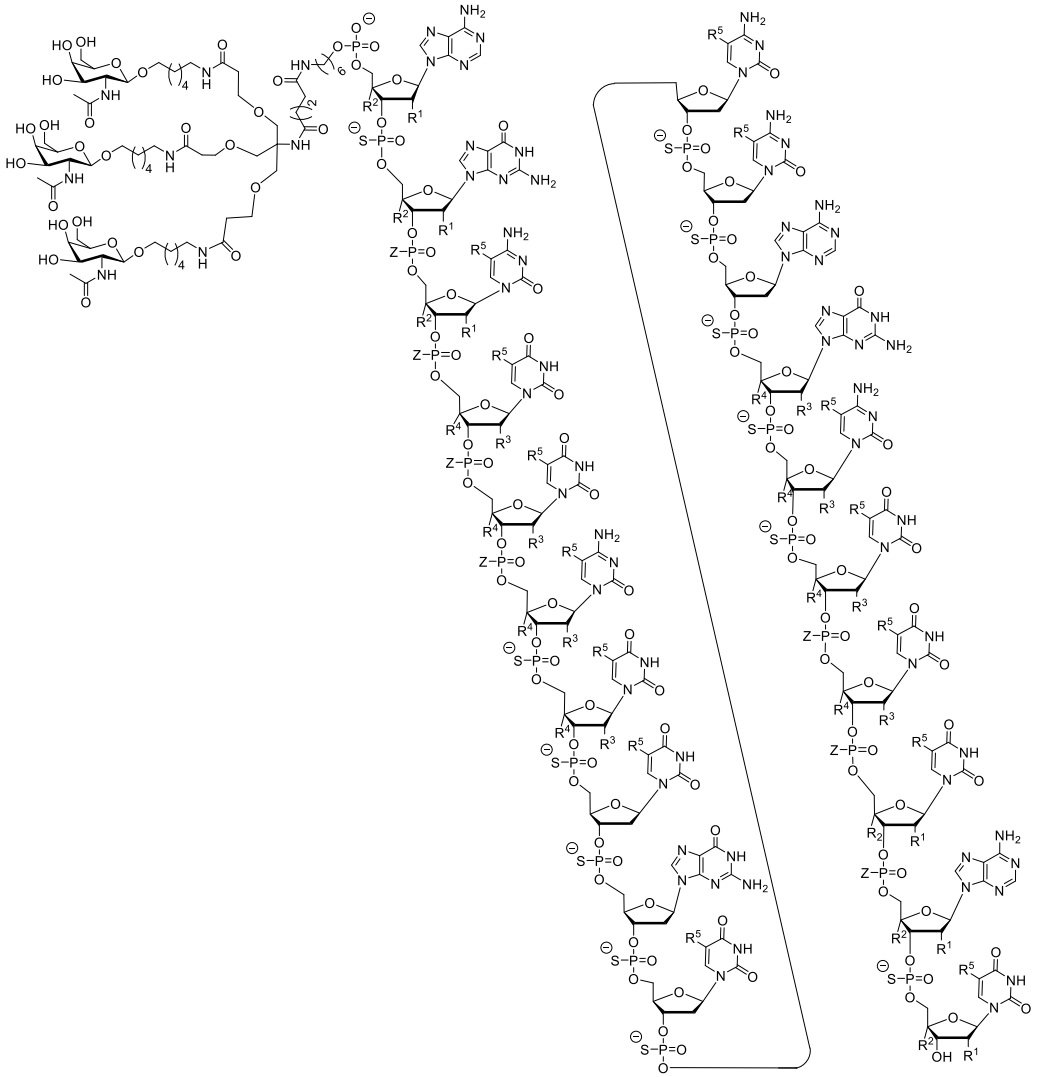
[0040] Em determinadas modalidades, a presente divulgação fornece compostos antissenso conjugados representados pela seguinte estrutura. Em determinadas modalidades, o composto antissenso compreende o oligonucleotídeo modificado conjugado ISIS 678354. Em determinadas modalidades, o composto antissenso consiste no oligonucleotídeo modificado conjugado ISIS 678354.



[0041] Em determinadas modalidades, a presente divulgação fornece compostos antissenso conjugados representados pela seguinte estrutura. Em determinadas modalidades, o composto antissenso compreende o oligonucleotídeo modificado conjugado ISIS 678357. Em determinadas modalidades, o composto antissenso consiste no oligonucleotídeo modificado conjugado ISIS 678357.



[0042] Em determinadas modalidades, a presente divulgação fornece compostos antissenso conjugados representados pela seguinte estrutura. Em determinadas modalidades, o composto antissenso compreende um oligonucleotídeo modificado com a sequência de nucleobase de SEQ ID NO: 87 com 5'-GalNAc com variabilidade no mods de açúcar das asas. Em determinadas modalidades, o composto antissenso consiste em um oligonucleotídeo modificado com a sequência de nucleobase de SEQ ID NO: 87 com 5'-GalNAc com variabilidade no mods de açúcar das asas.



[0043] onde R^1 é $-OCH_2CH_2OCH_3$ (MOE) e R^2 é H; ou R^1 e R^2 juntos formam uma ponte, onde R^1 é -O- e R^2 é $-CH_2-$, $-CH(CH_3)-$, ou $-CH_2CH_2-$, e R^1 e R^2 estão diretamente conectados de modo que a ponte resultante seja selecionada a partir de: $-O-CH_2-$, $-O-CH(CH_3)-$, e $-O-CH_2CH_2-$;

[0044] e para cada par de R^3 e R^4 no mesmo anel, independentemente para cada anel: qualquer R^3 seja selecionado de H e $-OCH_2CH_2OCH_3$ e R^4 seja H; ou R^3 e R^4, juntos, formem uma ponte, em que R^3 é -O-, e R^4 é $-CH_2-$, $-CH(CH_3)-$, ou $-CH_2CH_2-$ e R^3 e R^4 estão diretamente conectados, tal que a ponte resultante seja selecionada de: $-O-CH_2-$, $-O-CH(CH_3)-$, e $-O-CH_2CH_2-$;

[0045] e R^5 seja selecionado de H e $-CH_3$;

[0046] e Z seja selecionado de S- e O-.

[0047] A presente divulgação fornece as seguintes modalidades não limitantes numeradas:

DESCRIÇÃO DETALHADA

[0048] Deve ser compreendido que tanto a descrição geral acima quanto a seguinte descrição detalhada são exemplares e explicativas apenas e não são restritivas da divulgação. Aqui, o uso do singular inclui o plural, a menos que especificamente indicado o contrário. Como usado aqui, o uso de "ou" significa "e/ou", a menos que indicado o contrário. Além disso, o uso do termo "incluindo", bem como outras formas, tais como "inclui" e "incluído", não são limitantes. Além disso, termos tais como "elemento" ou "componente" abrangem elementos e componentes que compreendem uma unidade e elementos e componentes que compreendem mais de uma subunidade, a menos que especificamente indicado o contrário.

[0049] Os títulos da seção usados aqui são para fins organizacionais apenas e não devem ser interpretados como limitantes do tema descrito. Todos os documentos, ou partes de documentos, citados neste pedido, incluindo, mas não se limitando a, patentes, pedidos de patente, artigos, livros, e tratados, são expressamente incorporados por meio deste em sua totalidade por referência para qualquer finalidade.

Definições

[0050] A menos que definições específicas sejam fornecidas, a nomenclatura utilizada em conexão com, e os procedimentos e técnicas de, química analítica, química orgânica sintética, e químicas farmacêutica e medicinal descritos aqui são aquelas bem conhecidas e comumente usadas na técnica. Técnicas padrão podem ser usadas para a síntese química e análise química. Determinadas técnicas e procedimentos podem ser encontrados por exemplo em "Carbohydrate Modifications in Antisense Research", editado por Sangvi e Cook, American

Chemical Society, Washington D.C., 1994; "Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publishing Co., Easton, Pa., 21a edição, 2005; e "Antisense Drug Technology, Principles, Strategies, and Applications", editado por Stanley T. Crooke, CRC Press, Boca Raton, Florida; e Sambrook et al.,"Molecular Cloning, A laboratory Manual," 2a Edição, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, que são incorporados por referência por meio deste para qualquer finalidade. Quando permitido, todas as patentes, pedidos, pedidos publicados e outras publicações e outros dados mencionados toda a divulgação são incorporados por referência aqui na sua totalidade.

[0051] Salvo indicado em contrário, os seguintes termos têm os seguintes significados:

[0052] Como usado aqui, "nucleosídeo" se refere a um composto que compreende uma porção de nucleobase e uma porção de açúcar. Os nucleosídeos incluem, mas não estão limitados a, nucleosídeos de ocorrência natural (como encontrado no DNA e RNA) e nucleosídeos modificados. Os nucleosídeos podem estar ligados a uma porção de fosfato.

[0053] Como usado aqui, o termo "modificação química" significa uma diferença química em um composto quando comparado a uma contraparte de ocorrência natural. As modificações químicas dos oligonucleotídeos incluem modificações de nucleosídeos (incluindo modificações da porção de açúcar e modificações da nucleobase) e modificações da ligação internucleosídica. Em referência a um oligonucleotídeo, a modificação química não inclui diferenças apenas na sequência de nucleobase.

[0054] Como usado aqui, o termo "furanosil" refere-se a uma estrutura que compreende um anel de 5 membros compreendendo quatro átomos de carbono e um átomo de oxigênio.

[0055] Como usado aqui, "porção de açúcar de ocorrência natural"

se refere a um ribofuranosil como é encontrado no RNA de ocorrência natural ou a um desoxirribofuranosil como é encontrado no DNA de ocorrência natural.

[0056] Como usado aqui, "porção de açúcar" significa uma porção de açúcar de ocorrência natural ou a uma porção de açúcar modificada de um nucleosídeo.

[0057] Como usado aqui, a expressão "porção de açúcar modificado" se refere a uma porção de açúcar substituída ou a um substituto do açúcar.

[0058] Como usado aqui, "porção de açúcar substituída" significa um furanosil que não é uma porção de açúcar de ocorrência natural. As frações de açúcar substituídas incluem, mas não estão limitadas a furanosis que compreendem substituintes na posição 2', posição 3', posição 5' e/ou posição 4'. Determinadas frações de açúcar substituídas são frações de açúcar bicíclico.

[0059] Como usado aqui, a expressão "porção de açúcar substituída em 2'" se refere a um furanosil que compreende um substituinte na posição 2' diferente de H ou OH. Salvo indicação em contrário, uma porção de açúcar substituída em 2' não é uma porção de açúcar bicíclica (isto é, substituinte em 2' de uma porção de açúcar substituída em 2' não forma uma ponte para outro átomo do anel de furanosil).

[0060] Como usado aqui, "MOE" se refere a $-OCH_2CH_2OCH_3$.

[0061] Conforme usado aqui, "nucleosídeo 2'-F" se refere a um nucleosídeo que compreende um açúcar compreendendo um flúor na posição 2'. Salvo indicação em contrário, o flúor em um nucleosídeo 2'-F está na posição ribo (substituindo o OH de uma ribose natural).

[0062] Como usado aqui, o termo "substituto de açúcar" significa uma estrutura que não compreende um furanosil e que é capaz de substituir a porção de açúcar de ocorrência natural de um nucleosídeo, tal que as subunidades do nucleosídeo resultantes sejam capazes de se

ligar e/ou de se ligar a outros nucleosídeos para formar um composto oligomérico que seja capaz de se hibridizar em um composto oligomérico complementar. Essas estruturas incluem anéis que compreendem um número diferente de átomos do que o furanosil (por exemplo, anéis com 4, 6 ou 7 membros); substituição do oxigênio de um furanosil por um átomo de não oxigênio (por exemplo, carbono, enxofre ou nitrogênio); ou uma mudança no número de átomos e uma substituição do oxigênio. Essas estruturas também podem compreender substituições correspondentes àquelas descritas para frações de açúcar substituídas (por exemplo, substitutos de açúcar bicíclico carbocíclico de 6 membros compreendendo opcionalmente substituintes adicionais). Substitutos do açúcar também incluem substituições de açúcar mais complexo (por exemplo, sistemas de não anel do ácido nucleico do peptídeo). Os substitutos do açúcar incluem, sem limitação, morfolino, ciclohexenila e ciclohexitol.

[0063] Como usado aqui, a expressão "porção de açúcar bicíclico" significa uma porção de açúcar modificada compreendendo um anel de 4 a 7 membros (incluindo, mas não se limitando a um furanosil) compreendendo uma ponte que conecta dois átomos do anel de 4 a 7 membros para formar um segundo anel, resultando numa estrutura bicíclica. Em determinadas modalidades, o anel de 4 a 7 membros é um anel de açúcar. Em determinadas modalidades, o anel de 4 a 7 membros é um furanosil. Em certas modalidades, a ponte conecta o carbono 2' e o carbono 4' do furanosil.

[0064] Como usado aqui, o termo "nucleotídeo" se refere a um nucleosídeo compreende ainda um grupo de ligação do fosfato. Como usado aqui, "nucleosídeos ligados" podem ou não estar ligados por ligações fosfato e, assim, incluem, mas não estão limitados a, "nucleotídeos ligados". Como usado aqui, "nucleosídeos ligados" são nucleosídeos que estão conectados a uma sequência contínua (isto é, nenhum

nucleosídeo adicional está presente entre aqueles que estão ligados).

[0065] Como usado aqui, o termo "ácido nucleico" refere-se a moléculas compostas por nucleotídeos monoméricos. Um ácido nucleico inclui ácidos ribonucleicos (RNA), ácidos desoxirribonucleicos (DNA), ácidos nucleicos de fita única (ssDNA), ácidos nucleicos de fita dupla (dsDNA), pequenos ácidos ribonucleicos de interferência (siRNA), e microRNAs (miRNA). Um ácido nucleico também pode compreender qualquer combinação destes elementos em uma única molécula.

[0066] Como usado aqui, o termo "nucleotídeo" se refere a um nucleosídeo compreende ainda um grupo de ligação do fosfato. Como usado aqui, "nucleosídeos ligados" podem ou não estar ligados por ligações fosfato e, assim, incluem, mas não estão limitados a, "nucleotídeos ligados". Como usado aqui, "nucleosídeos ligados" são nucleosídeos que estão conectados a uma sequência contínua (isto é, nenhum nucleosídeo adicional está presente entre aqueles que estão ligados).

[0067] Como usado aqui, o termo "nucleobase" se refere a um grupo de átomos que pode estar ligado a uma porção de açúcar para criar um nucleosídeo que é capaz de se incorporar a um oligonucleotídeo e em que o grupo de átomos é capaz de se ligar a uma nucleobase de ocorrência natural complementar de outro oligonucleotídeo ou ácido nucleico. As nucleobases podem ocorrer naturalmente ou podem ser modificadas. Como usado aqui, o termo "sequência de nucleobases" significa a ordem de nucleobases contíguas independente de qualquer açúcar, ligação ou modificação de nucleobase.

[0068] Como usados aqui, "nucleobase não modificada" ou "nucleobase de ocorrência natural" significam nucleobases heterocíclicas de ocorrência natural do RNA ou DNA: as bases purínicas adenina (A) e guanina (G), e as bases pirimidínicas timina (T), citosina (C) (incluindo 5-metil C) e uracila (U).

[0069] Como usado aqui, o termo "nucleobase modificada" se refere

a qualquer nucleobase que não tenha ocorrência natural.

[0070] Como usado aqui, o termo "nucleosídeo modificado" se refere a um nucleosídeo que consiste em pelo menos uma modificação química em comparação com os nucleosídeos do RNA ou DNA de ocorrência natural. Os nucleosídeos modificados compõem uma porção de açúcar modificada e/ou uma nucleobase modificada.

[0071] Como usado aqui, "nucleosídeo bicíclico" ou "BNA" se refere a um nucleosídeo que consiste em uma porção de açúcar bicíclica.

[0072] Como usado aqui, "nucleosídeo de etila restrito" ou "cEt" refere-se a um nucleosídeo que compreende uma porção de açúcar bicíclico compreendendo uma ponte de 4'-$CH(CH_3)$-O-2'.

[0073] Como usado aqui, o termo "nucleosídeo de ácido nucleico bloqueado" ou "LNA" se refere a um nucleosídeo que compreende uma porção de açúcar bicíclico compreendendo uma ponte de CH 4'2-O-2'.

[0074] Como usado aqui, "nucleosídeo substituído em 2'" significa a um nucleosídeo que compreende um substituinte na posição 2' diferente de H ou OH. Salvo indicação em contrário, um nucleosídeo substituído em 2' não é um nucleosídeo bicíclico.

[0075] Como usado aqui, "desoxirribonucleosídeo" significa um nucleosídeo que compreende uma porção de açúcar de furanosil 2'-H, como encontrado nos desoxirribonucleosídeos de ocorrência natural (DNA). Em determinadas modalidades, um 2-desoxinucleosídeo pode compreender uma nucleobase modificada ou pode compreender uma nucleobase de RNA (por exemplo, uracila).

[0076] Conforme usado aqui, "oligonucleotídeo" significa um composto compreendendo uma pluralidade de nucleosídeos ligados. Em certas modalidades, um oligonucleotídeo compreende um ou mais ribonucleosídeos (RNA) não modificados e/ou desoxirribonucleosídeos (DNA) não modificados e/ou um ou mais nucleosídeos modificados.

[0077] Como usado aqui, "oligonucleosídeo" se refere a um oligonucleotídeo em que nenhuma das ligações de internucleosídeo contém um átomo de fósforo. Como usado aqui, oligonucleotídeos incluem oligonucleosídeos.

[0078] Como usado aqui, "oligonucleotídeo modificado" se refere a um oligonucleotídeo que consiste em pelo menos um nucleosídeo modificado e/ou pelo menos uma ligação de internucleosídeo modificado.

[0079] Como usado aqui, "ligação" ou "grupo de ligação" significa um grupo de átomos que se ligam a dois ou mais grupos de átomos.

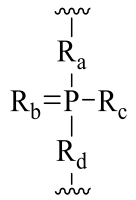
[0080] Como usado aqui, "ligação internucleosídica" significa uma ligação covalente entre nucleosídeos adjacentes em um oligonucleotídeo.

[0081] Como usado aqui, "ligação internucleosídica de ocorrência natural" significa uma ligação fosfodiéster 3' a 5'.

[0082] Como usado aqui, "ligação internucleosídica modificada" significa qualquer ligação internucleosídica diferente da ligação internucleosídica de ocorrência natural.

[0083] Como usado aqui, "ligação internucleosídica terminal" significa a ligação entre os últimos dois nucleosídeos de um oligonucleotídeo ou da respectiva região definida.

[0084] Como usado aqui, o "grupo de ligação de fósforo" significa um grupo de ligação que consiste em um átomo de fósforo. Grupos de ligação de fósforo incluem, sem limitação, grupos que têm a fórmula:



em que:

[0085] R_a e R_d são cada um, independentemente, O, S, CH_2, NH, ou NJ_1 em que J_1 é alquila C_1-C_6 ou alquila C_1-C_6 substituída;

[0086] R_b é O ou S;

[0087] Rc é OH, SH, alquila C1-C6, alquila substituída C1-C6, alcóxi C1-C6, alcóxi, alcóxi substituído, amina ou amina substituída C1-C6; e

[0088] J_1 is R_b é O ou S.

[0089] Os grupos de ligação de fósforo incluem, sem limitação, fosfodiéster, fosforotioato, fosforodiotioato, fosfonato, fosforoamidato, fosforotioamidato, tionoalquil-fosfonato, fosfotriésteres, tionoalquilfosfotriéster e boranofosfato.

[0090] Como usado aqui, "grupo de ligação de fósforo" siginfica um grupo de ligação de fósforo que liga diretamente dois nucleosídeos.

[0091] Como usado aqui, "grupo de ligação fósforo não internucleosídeo" se refere a um grupo de ligação fósforo que não se liga diretamente a dois nucleosídeos. Em determinadas modalidades, um grupo de ligação fósforo não internucleosídeo liga um nucleosídeo a um grupo diferente de um nucleosídeo. Em determinadas modalidades, um grupo de ligação fósforo não internucleosídeo liga dois grupos, sendo que nenhum deles é um nucleosídeo.

[0092] Como usado aqui, "grupo de ligação neutro" se refere a um grupo de ligação não é carregado. Os grupos de ligação neutros incluem, entre outros, fosfotriésteres, metilfosfonatos, MMI (- CH_2-N (CH_3) - O-), 3-amida (-CH_2-C(=O)-N(H)-), 4-amida (-CH_2-N(H)-C(=O)-), formacetal (-O-CH_2-O-) e tioformacetal (-S-CH_2-O-). Outros grupos de ligação neutros incluem ligações não iônicas, compreendendo siloxano (dialquilsiloxano), éster carboxilato, carboxamidas, sulfeto, éster sulfonato e amidas (ver, por exemplo: Carbohydrate Modifications in Antisense Research; Y.S. Sanghvi e P.D. Cook Eds. ACS Symposium Series 580; Capítulos 3 e 4, (pp. 40-65)). Outros grupos de ligação neutros incluem ligações não iônicas, compreendendo partes do componente N, O, S e CH_2 misturadas.

[0093] Como usado aqui, "grupo de ligação neutro de internucleosídeo" se refere a um grupo de ligação neutro que liga diretamente dois

nucleosídeos.

[0094] Como usado aqui, "grupo de ligação neutro de não internucleosídeo" se refere a um grupo de ligação neutro que não se liga diretamente a dois nucleosídeos. Em determinadas modalidades, um grupo de ligação neutro de não internucleosídeo liga um nucleosídeo a um grupo diferente de um nucleosídeo. Em determinadas modalidades, um grupo de ligação neutro de não internucleosídeo liga dois grupos, sendo que nenhum deles é um nucleosídeo.

[0095] Como usado aqui, "composto oligomérico" se refere a uma estrutura polimérica que compreende duas ou mais subestruturas. Em determinadas modalidades, um composto oligomérico compreende um oligonucleotídeo. Em determinadas modalidades, um composto oligomérico compreende um ou mais grupos conjugados e/ou grupos terminais. Em determinadas modalidades, um composto oligomérico consiste em um oligonucleotídeo. Compostos oligoméricos incluem também ácidos nucleicos de ocorrência natural. Em determinadas modalidades, um composto oligomérico compreende uma estrutura principal de uma ou mais subunidades monoméricas ligadas onde cada subunidade monomérica está direta ou indiretamente afixada a uma porção de base heterocíclica. Em determinadas modalidades, os compostos oligoméricos também podem incluir subunidades monoméricas que não estão ligadas a uma porção de base heterocíclica fornecendo, assim, sítios abásicos. Em determinadas modalidades, as ligações juntam subunidades monoméricas, frações ou substitutos de açúcar e as frações de base heterocíclica podem ser independentemente modificadas. Em determinadas modalidades, a unidade de açúcar de ligação, que pode ou não incluir uma base heterocíclica, pode ser substituída por um mimético como monômeros em ácidos nucleicos de peptídeo.

[0096] Como usado aqui, "grupo terminal" se refere a um ou mais átomo incorporado à extremidade 3' ou à extremidade 5' ou a ambas

extremidades de um oligonucleotídeo. Em determinadas modalidades, um grupo terminal é um grupo conjugado. Em determinadas modalidades, um grupo terminal compreende um ou mais nucleosídeos do grupo terminal.

[0097] Como usado aqui, "conjugado" ou "grupo conjugado" se refere a um átomo ou grupo de átomos ligados a um oligonucleotídeo ou composto oligomérico. Em geral, grupos conjugados modificam uma ou mais propriedades do composto ao qual estão afixados, incluindo, entre outros, propriedades de farmacodinâmica, farmacocinética, absorção, distribuição celular, absorção celular, carga e/ou depuração.

[0098] Como usado aqui, "ligador conjugado" ou "ligador" no contexto de um grupo de conjugado representa uma parte de um grupo de conjugado que consiste em qualquer átomo ou grupo de átomos e que liga covalentemente (1) um oligonucleotídeo a outra parte do grupo de conjugado ou (2) duas ou mais partes do grupo conjugado.

[0099] Os grupos conjugados são mostrados aqui como radicais, fornecendo uma ligação para a formação de ligação covalente com um composto oligomérico como um oligonucleotídeo antissenso. Em determinadas modalidades, o ponto de ligação em um composto oligomérico é o átomo de oxigênio 3' do grupo 3'-hidroxila do nucleosídeo terminal 3' do composto oligomérico. Em determinadas modalidades, o ponto de ligação ao composto oligomérico é o átomo de oxigênio 5' do grupo 5'-hidroxila do nucleosídeo terminal 5' do composto oligomérico. Em determinadas modalidades, a ligação para a formação da ligação com um composto oligomérico é uma ligação clivável. Em determinadas modalidades, essa ligação clivável constitui toda ou parte de uma porção clivável.

[00100] Em determinadas modalidades, os grupos conjugados compreendem uma porção clivável (por exemplo, uma ligação clivável ou um nucleosídeo clivável) e uma parte do agrupamento de carboidrato,

como uma parte do agrupamento GalNAc. Essa parte do agrupamento do carboidrato compreende: uma porção de direcionamento e, opcionalmente, um ligador de conjugado. Em determinadas modalidades, a parte do agrupamento de carboidrato é identificada pelo número e identidade do ligante. Por exemplo, em determinadas modalidades, a parte do agrupamento do carboidrato compreende 3 grupos GalNAc e é designada "GalNAc3". Em determinadas modalidades, a parte do agrupamento de carboidrato compreende 4 grupos GalNAc e é designada "GalNAc4". Partes do agrupamento de carboidrato específicas (tendo ligante específico, grupos de ramificação e conjugados) são descritas aqui e designadas pelo numeral romano seguido por subscrito "a". Portanto, "GalNac3-1um" se refere a uma parte do agrupamento de carboidrato específico de um grupo de conjugado tendo 3 grupos GalNac e ligante identificado especificamente grupos de ramificação e grupos de ligação. Esse fragmento de agrupamento do carboidrato está afixado a um composto oligomérico via porção clivável, como uma ligação clivável ou nucleosídeo clivável.

[00101] Como usado aqui, "porção clivável" se refere a uma ligação ou grupo que é capaz de ser quebrado em condições fisiológicas. Em determinadas modalidades, uma porção clivável está no interior de compartimentos celulares ou subcelulares, como um lisossomo. Em determinadas modalidades, uma porção clicável é clivada por enzimas endógenas, como as nucleases. Em determinadas modalidades, uma porção clivável compreende um grupo de átomos com um, dois, três, quatro ou mais de quatro ligações cliváveis.

[00102] Como usado aqui, "ligação clivável" se refere a qualquer ligação química capaz de ser quebrada. Em determinadas modalidades, a ligação clivável é selecionada dentre: uma amida, uma poliamida, um éster, um éter, um ou ambos ésteres de um fosfodiéster, um éster de fosfato, um carbamato, um dissulfeto ou um peptídeo.

[00103] Como usado aqui, "agrupamento de carboidrato" se refere a um composto que tem um ou mais resíduos de carboidrato afixados a um grupo andaime ou a um grupo ligador. (ver, por exemplo, Maier et al., "Synthesis of Antisense Oligonucleotides Conjugated to a Multivalent Carbohydrate Cluster for Cellular Targeting," Bioconjugate Chemistry, 2003, (14): 18-29, que está incorporado aqui por referência em sua totalidade, ou Rensen et al, "Design and Synthesis of Novel N-Acetylgalactosamine-Terminated Glycolipids forTargeting of Lipoproteins to the Hepatic Asiaglycoprotein Receptor," J. Med. Chem. 2004, (47): 5798-5808, para exemplos de agrupamentos conjugados de carboidrato).

[00104] Como usado aqui, "carboidrato modificado" se refere a qualquer carboidrato que tem uma ou mais modificações químicas relativas a carboidratos de ocorrência natural.

[00105] Como usado aqui, "derivado de carboidrato" se refere a qualquer composto que pode ser sintetizado usando um carboidrato como matéria-prima ou intermediário.

[00106] Como usado aqui, "carboidrato" se refere a um carboidrato de ocorrência natural, um carboidrato modificado ou um derivado do carboidrato.

[00107] Como usado aqui, "grupo de proteção" se refere a qualquer composto ou grupo de proteção conhecido pelos versados na técnica. Exemplos não limitantes de grupos de proteção podem ser encontrados em "Protective Groups in Organic Chemistry", T. W. Greene, P. G. M. Wuts, ISBN 0-471-62301-6, John Wiley & Sons, Inc, Nova York, o qual está incorporado a este documento por referência na íntegra.

[00108] Como usado aqui, "de fita única" se refere a um composto oligomérico que não é hibridizado ao seu complemento e que não possui autocomplementaridade suficiente para formar um duplex auto-estável.

[00109] Como usado aqui, "de fita dupla" se refere a um par de compostos oligoméricos que são hibridizados a um outro ou um composto oligomérico autocomplementar único que forma uma estrutura hairpin. Em determinadas modalidades, um composto oligomérico de fita dupla compreende um primeiro e um segundo composto oligomérico.

[00110] Como usado aqui, "composto antissenso" se refere a um composto que compreende ou que consiste em um oligonucleotídeo, sendo que, pelo menos uma parte dele é complementar ao ácido nucleico alvo que é capaz de hibridizar, resultando em pelo menos uma atividade antissenso.

[00111] Como usado aqui, "atividade antissenso" se refere a qualquer atividade detectável e/ou mudança mensurável atribuível à hibridização de um composto antissenso para seu ácido nucleico alvo. Em determinadas modalidades, a atividade antissenso inclui modulação da quantidade ou atividade de uma transcrição do ácido nucleico alvo (por exemplo, mRNA). Em determinadas modalidades, a atividade antissenso inclui modulação da junção do pré-mRNA.

[00112] Como usado aqui, "composto antissenso à base de RNase H" se refere a um composto antissenso em que pelo menos alguma atividade antissenso do composto antissenso é atribuível à hibridação do composto antissenso para um ácido nucléico alvo e clivagem subsequente do ácido nucleico alvo pela RNase H.

[00113] Como usado aqui, "composto antissenso à base de RISC" se refere a um composto antissenso em que pelo menos alguma atividade antissenso do composto antissenso é atribuída ao Complexo de Silenciamento Induzido do RNA (RISC).

[00114] Como usado aqui, "detectar" ou "medir" significa que um teste ou ensaio para detecção ou medição é realizado. Essa detecção e/ou medição pode resulta em um valor zero. Assim, se um teste para detecção ou medição resultar na constatação de nenhuma atividade

(atividade zero), a etapa de detecção ou medição da atividade, no entanto, foi realizada.

[00115] Como usado aqui, "atividade detectável e/ou mensurável" se refere a uma atividade estatisticamente significativa que não seja equivalente a zero.

[00116] Como usado aqui, "essencialmente inalterado" se refere a pouca ou nenhuma alteração em um determinado parâmetro, especificamente em relação a outro parâmetro que muda muito mais. Em determinadas modalidades, um parâmetro é essencialmente inalterado quando muda em menos de 5%. Em determinadas modalidades, um parâmetro é essencialmente inalterado se ele muda menos de duas vezes enquanto outro parâmetro muda pelo menos dez vezes. Por exemplo, em determinadas modalidades, uma atividade antissenso é uma mudança na quantidade de um ácido nucleico alvo. Em determinadas modalidades, a quantidade de ácido nucleico não alvo é essencialmente inalterada se ela muda muito menos do que o ácido nucleico alvo, mas a mudança não precisa ser zero.

[00117] Como usado aqui, "expressão" se refere ao processo pelo qual um gene resulta, em última análise, em uma proteína. Expressão inclui, entre outros, transcrição, modificação pós-transcricional (por exemplo, junção, poliadenilação, adição de 5'-cap) e tradução.

[00118] Como usado aqui, "ácido nucleico alvo" se refere a uma molécula de ácido nucleico à qual um composto antissenso destina-se a hibridizar para resultar em uma atividade antissenso desejada. Oligonucleotídeos antissenso têm complementaridade suficiente para seus ácidos nucleicos alvo para permitir a hibridação em condições fisiológicas.

[00119] Como usado aqui, "complementaridade da nucleobase" ou "complementaridade" quando em referência às nucleobases se refere a uma nucleobase capaz de se emparelhar com outra nucleobase. Por

exemplo, no DNA, a adenina (A) é complementar à timina (T). Por exemplo, no RNA, a adenina (A) é complementar à uracila (U). Em certas modalidades, nucleobase complementar se refere a uma nucleobase de um composto antissenso que é capaz de se emparelhar com uma nucleobase do seu ácido nucleico alvo. Por exemplo, se uma nucleobase em uma determinada posição de um composto antissenso for capaz de fazer ligação de hidrogênio com uma nucleobase em uma determinada posição de um ácido nucleico alvo, então a posição da ligação de hidrogênio entre o oligonucleotídeo e o ácido nucleico alvo são considerados complementares nesse par de nucleobase. As nucleobases que compreendem determinadas modificações podem manter a capacidade de se emparelhar com uma nucleobase equivalente e, assim, são ainda capazes da complementaridade de base.

[00120] Como usado aqui, "não complementar", em relação às nucleobases, se refere a um par de nucleobases que não forma ligações de hidrogênio com outro.

[00121] Como usado aqui, "complementar", em relação aos compostos oligoméricos (por exemplo, nucleosídeos ligados, oligonucleotídeos ou ácidos nucleicos) se refere à capacidade desses compostos oligoméricos ou suas regiões para hibridização para um outro composto oligomérico ou sua região através da complementaridade da nucleobase. Compostos oligoméricos complementares não precisam apresentar complementaridade de nucleobase em cada nucleosídeo. Pelo contrário, algumas incompatibilidades são toleradas. Em determinadas modalidades, compostos oligoméricos complementares ou regiões são complementares em 70% das nucleobases (70% complementares). Em determinadas modalidades, compostos oligoméricos complementares ou regiões são 80% complementares. Em determinadas modalidades, compostos oligoméricos complementares ou regiões são 90% complementares. Em determinadas modalidades, compostos oligoméricos

complementares ou regiões são 95% complementares. Em determinadas modalidades, compostos oligoméricos complementares ou regiões são 100% complementares.

[00122] Como usado aqui, "incompatibilidade" se refere a uma nucleobase de um primeiro composto oligomérico que não é capaz de se emparelhar com uma nucleobase em uma posição correspondente de um segundo composto oligomérico, quando o primeiro e o segundo composto oligomérico estão alinhados. Um ou ambos do primeiro e segundo compostos oligoméricos podem ser oligonucleotídeos.

[00123] Como usado aqui, "hibridização" se refere ao emparelhamento de compostos oligoméricos complementares (por exemplo, um composto antissenso e seu ácido nucleico alvo). Enquanto não houver limitação a um mecanismo específico, o mecanismo mais comum de emparelhamento envolve a ligação de hidrogênio, que pode ser ligação de hidrogênio Watson-Crick, Hoogsteen ou Hoogsteen reversa entre nucleobases complementares.

[00124] Como usado aqui, "hibridiza especificamente" se refere à capacidade de um composto oligomérico de hibridizar em um sítio de ácido nucleico com maior afinidade do que hibridizar em outro sítio de ácido nucleico.

[00125] Como usado aqui, "totalmente complementar", em relação a um oligonucleotídeo ou à porção do mesmo, significa que cada base do oligonucleotídeo ou da porção do mesmo é capaz de se emparelhar com uma nucleobase de um ácido nucleico complementar ou porção contígua do mesmo. Assim, uma região totalmente complementar não compreende incompatibilidades nem nucleobases não hibridizadas em qualquer fita.

[00126] Como usado aqui, "complementaridade percentual" se refere à porcentagem de nucleobases de um composto oligomérico que seja

complementar a uma parte de comprimento equivalente de ácido nucleico alvo. a complementaridade percentual é calculada pela divisão do número de nucleobases do composto oligomérico que seja complementar às nucleobases nas posições correspondentes no ácido nucleico alvo pelo comprimento total do composto oligomérico.

[00127] Como usado aqui, "identidade percentual" se refere ao número de nucleobases em um primeiro ácido nucleico que é do mesmo tipo (independente de modificação química) que as nucleobases nas posições correspondentes em um segundo ácido nucleico, dividido pelo número total de nucleobases no primeiro ácido nucleico.

[00128] Como usado aqui, "modulação" se refere a uma mudança da quantidade ou qualidade de uma molécula, função ou atividade, em comparação com a quantidade ou qualidade de uma molécula, função ou atividade antes da modulação. Por exemplo, a modulação inclui a mudança, ou o aumento (estímulo ou indução) ou a diminuição (inibição ou redução) da expressão gênica. Como outro exemplo, a modulação da expressão pode incluir uma alteração na seleção do sítio de splice do processamento de pré-mRNA, resultando em uma alteração na quantidade absoluta ou relativa de um determinado variante de splice em comparação com a quantidade na ausência de modulação.

[00129] Como usado aqui, "motivo químico" se refere a um padrão de modificações químicas em um oligonucleotídeo ou em uma região do mesmo. Os motivos podem ser definidos pelas modificações em determinados nucleosídeos e/ou certos grupos de ligação de um oligonucleotídeo.

[00130] Como usado aqui, "motivo do nucleosídeo" se refere a um padrão de modificações do nucleosídeo em um oligonucleotídeo ou em uma região do mesmo. As ligações desse oligonucleotídeo podem ser modificadas ou não modificadas. Salvo indicação em contrário, os motivos descritos aqui apenas nucleosídeos destinados a serem motivos

de nucleosídeos. Assim, nesses casos, as ligações não são limitadas.

[00131] Como usado aqui, "motivo do açúcar" se refere a um padrão de modificações do açúcar em um oligonucleotídeo ou em uma região do mesmo.

[00132] Como usado aqui, "motivo da ligação" se refere a um padrão de modificações da ligação em um oligonucleotídeo ou em uma região do mesmo. Os nucleosídeos desse oligonucleotídeo podem ser modificados ou não modificados. Salvo indicação em contrário, os motivos descritos aqui são apenas ligações destinadas a serem motivos de ligação. Assim, nesses casos, os nucleosídeos não são limitados.

[00133] Como usado aqui, "motivo de modificação da nucleobase" se refere a um padrão de modificações de nucleobases ao longo de um oligonucleotídeo. Salvo indicação em contrário, um motivo de modificação da nucleobase é independente da sequência de nucleobase.

[00134] Como usado aqui, "motivo de sequência" se refere a um padrão de nucleobases dispostos ao longo de um oligonucleotídeo ou parte do mesmo. Salvo indicação em contrário, um motivo de sequência é independente de modificações químicas e, portanto, pode ter qualquer combinação de modificações químicas, inclusive não ter modificações químicas.

[00135] Como usado aqui, "tipo de modificação", em relação a um nucleosídeo ou um nucleosídeo de um "tipo" se refere à modificação química de um nucleosídeo e inclui nucleosídeos modificados e não modificados. Portanto, salvo indicação em contrário, um "nucleosídeo com uma modificação do primeiro tipo" pode ser um nucleosídeo não modificado.

[00136] Como usado aqui, "diferentemente modificado" se refere às modificações químicas ou substituintes químicos que são diferentes uns dos outros, incluindo ausência de modificações. Assim, por exemplo, um nucleosídeo MOE e um nucleosídeo de DNA não modificado são

"diferentemente modificados", embora o nucleosídeo do DNA não seja modificado. Da mesma forma, DNA e RNA são "diferentemente modificados", embora ambos sejam nucleosídeos não modificados de ocorrência natural. Os nucleosídeos que são os mesmos, mas por compreenderem nucleobases diferentes não são diferentemente modificados. Por exemplo, um nucleosídeo que compreende um açúcar modificado 2'-OMe e uma nucleobase adenina não modificada e um nucleosídeo compreendendo um açúcar modificado 2'-OMe e uma nucleobase timina não modificada não são diferentemente modificados.

[00137] Como usado aqui, "o mesmo tipo de modificações" se refere às modificações que são iguais entre elas, incluindo a ausência de modificações. Assim, por exemplo, dois nucleosídeos de DNA não modificados têm "o mesmo tipo de modificação", embora o nucleosídeo de DNA não seja modificado. Esses nucleosídeos que têm o mesmo tipo de modificação podem incluir nucleobases diferentes.

[00138] Como usado aqui, "regiões separadas" se refere às partes de um oligonucleotídeo em que as modificações químicas ou o motivo das modificações químicas de quaisquer partes vizinhas incluem pelo menos uma diferença para permitir que regiões separadas se distinguam uma da outra.

[00139] Como usado aqui, "transportadora ou diluente farmaceuticamente aceitável" se refere a qualquer substância apropriada para uso na administração de um animal. Em determinadas modalidades, uma transportadora ou diluente farmaceuticamente aceitável é uma solução salina estéril. Em determinadas modalidades, essa solução salina é uma solução salina de qualidade farmacêutica.

[00140] Como usado aqui, o termo "distúrbio metabólico" se refere a uma doença ou condição caracterizada principalmente pela desregulação do metabolismo - o conjunto complexo de reações químicas associadas à degradação de alimentos para produzir energia.

[00141] Como usado aqui, o termo "distúrbio cardiovascular" se refere a uma doença ou condição caracterizada principalmente pela função prejudicada do coração ou dos vasos sanguíneos.

[00142] Como usado aqui, o termo "sistema de anel mono ou policíclico" deve incluir todos os sistemas de anel selecionados a partir de sistemas de anel de radical simples ou policíclico em que os anéis são fundidos ou ligados e deve incluir também sistemas de anel simples e mistos individualmente selecionados a partir de arila alifática, alicíclico, heteroarila, aralquila, arilalquila, heterocíclico, heteroarila, heteroaromático e heteroarilalquila. Essas estruturas mono e policíclicas podem conter anéis tendo o mesmo nível de saturação ou tendo cada um, de maneira independente, diferentes graus de saturação incluindo totalmente saturados, parcialmente saturados ou totalmente insaturados. Cada anel pode compreender átomos do anel selecionados a partir de C, N, O e S para dar origem a anéis heterocíclicos, bem como anéis que compreendem apenas anel apenas com átomos de C que podem estar presentes em um motivo misto, como por exemplo, benzimidazol, em que um anel tem apenas átomos de carbono anel e o anel fundido tem dois átomos de nitrogênio. O sistema de anel mono ou policíclico pode ser ainda substituído por grupos substituintes, como por exemplo, ftalimida que tem dois grupos =O afixados a um dos anéis. Os sistemas de anel mono ou policíclico podem ser afixados a moléculas de origem usando várias estratégias como diretamente através de um átomo do anel, fundido através de vários átomos do anel, através de um grupo substituinte ou através de uma porção de ligação bifuncional.

[00143] Como usado aqui, "profármaco" se refere a uma forma menos ativa ou inativa de um composto que, quando administrado a um assunto, é metabolizado para formar o composto ativo ou mais ativo (por exemplo, fármacos).

[00144] Como usado aqui, "substituinte" e "grupo substituinte" se refere a um átomo ou grupo que substitui o átomo ou grupo de um composto nomeado de origem. Por exemplo, um substituinte de um nucleosídeo modificado é qualquer átomo ou grupo que difere do átomo ou do grupo encontrado em um nucleosídeo de ocorrência natural (por exemplo, um substituinte 2' modificado é qualquer átomo ou grupo na posição 2' de um nucleosídeo diferente de H ou OH). Os grupos substituintes podem ser protegidos ou desprotegidos. Em determinadas modalidades, os compostos de presente divulgação têm substituintes em uma ou em mais de uma posição do composto de origem. Os substituintes também podem ser substituídos ainda por outros grupos substituintes e podem ser afixados diretamente ou através de um grupo de ligação como um grupo alquila ou hidrocarbila a um composto de origem.

[00145] Da mesma forma, como usado aqui, "substituinte", em relação a um grupo funcional químico, se refere a um átomo ou grupo de átomos que difere do átomo ou do grupo de átomos normalmente presente no grupo funcional mencionado. Em determinadas modalidades, um substituinte substitui um átomo de hidrogênio do grupo funcional (por exemplo, em determinadas incorporações, o substituinte de um grupo metila substituído é um átomo ou grupo diferente do hidrogênio que substitui um dos átomos de hidrogênio de um grupo metila não substituído). A menos que indicado o contrário, os grupos passíveis para uso como substituintes incluem, sem limitação, halogênio, hidroxila, alquila, alquenila, alquinila, acila (-C(O)R_{aa}), carboxila (-C(O)O-R_{aa}), grupos alifáticos, grupos alicíclicos, alcóxi, óxi substituído (-O-R_{aa}), arila, aralquila, radical heterocíclico, heteroarila, heteroarilalquila, amino (-N(R_{bb})(R_{cc})), imino(=NR_{bb}), amido (-C(O)N(R_{bb})(R_{cc}) ou -N(R_{bb})C(O)R_{aa}), azido (-N_3), nitro (-NO_2), ciano (-CN), carbamido (-OC(O)N(R_{bb})(R_{cc}) ou -N(R_{bb})C(O)OR_{aa}), ureído (-N(R_{bb})C(O)N(R_{bb})(R_{cc})), tioureído

(-N(R_{bb})C(S)N(R_{bb})(R_{cc})), guanidinila (-N(R_{bb})C(=NR_{bb})N(R_{bb})(R_{cc})), amidinila (-C(=NR_{bb})N(R_{bb})(R_{cc}) ou -N(R_{bb})C(=NR_{bb})(R_{aa})), tiol (-SR_{bb}), sulfinila (-S(O)R_{bb}), sulfonila (-S(O)2R_{bb}) e sulfonamidila (-S(O)2N(R_{bb})(R_{cc}) ou -N(R_{bb})S(O)2R_{bb}). Onde cada R_{aa}, R_{bb} e R_{cc} são, de forma independente, H, e um grupo funcional químico opcionalmente ligado ou um outro grupo substituinte por uma lista preferencial incluindo, entre outros, alquila, alquenila, alquinila, alifático, alcóxi, acila, arila, aralquila, heteroarila, alicíclico, heterocíclico e heteroarilalaquila. Os substituintes selecionados nos compostos descritos aqui estão presentes em grau recursivo.

[00146] Como usado aqui, "alquila" se refere um radical hidrocarboneto saturado linear ou ramificado que contém até vinte e quatro átomos de carbono. Exemplos de grupos alquila incluem, entre outros, metila, etila, propila, butila, isopropila, n-hexila, octila, decila, dodecila e similares. Os grupos alquila incluem tipicamente de 1 a cerca de 24 átomos de carbono, mais tipicamente de 1 a cerca de 12 átomos de carbono (alquila C1- C12), sendo que de 1 a cerca de 6 átomos de carbono é mais preferencial.

[00147] Como usado aqui, "alquenil" se refere a um radical de uma cadeia de hidrocarboneto linear ou ramificada que contém até vinte e quatro átomos de carbono e que tem pelo menos uma ligação dupla de carbono-carbono. Exemplos de grupos alquenila incluem, entre outros, etenila, propenila, butenila, 1-metil-2-buten-1-ila, dienos como 1,3-butadieno e afins. Os grupos alquenil incluem tipicamente de 2 a cerca de 24 átomos de carbono, mais tipicamente de 2 a cerca de 12 átomos de carbono, sendo que de 2 a cerca de 6 átomos de carbono é mais preferencial. Grupos alquenila usados aqui podem incluir ainda, opcionalmente, um ou mais grupos substituintes.

[00148] Como usado aqui, "alquinila" se refere a um radical de uma cadeia de hidrocarboneto linear ou ramificada que contém até vinte e

quatro átomos de carbono e que tem pelo menos uma ligação tripla de carbono-carbono. Exemplos de grupos alquinila incluem, entre outros, etinila, 1-propinila, 1-butinila e similares. Os grupos alquinila incluem tipicamente de 2 a cerca de 24 átomos de carbono, mais tipicamente de 2 a cerca de 12 átomos de carbono, sendo que de 2 a cerca de 6 átomos de carbono é mais preferencial. Grupos alquinila usados aqui podem incluir ainda, opcionalmente, um ou mais grupos substituintes.

[00149] Como usado aqui, "acila" se refere a um radical formado pela remoção de um grupo hidroxila de um ácido orgânico e que tem fórmula geral -C(O)-X onde X é normalmente alifático, alicíclico ou aromático. Os exemplos incluem carbonilas alifáticas, carbonilas aromáticas, sulfonilas alifáticas, sulfinilas aromáticas, sulfinilas alifáticas, fosfatos aromáticos, fosfatos alifáticos e similares. Grupos acila usados aqui podem incluir ainda, opcionalmente, um ou mais grupos substituintes.

[00150] Como usado aqui, "alicíclico" se refere a um sistema de anel cíclico, em que o anel é alifático. O sistema de anel pode compreender um ou mais anéis, em que pelo menos um anel é alifático. Alicíclicos preferenciais incluem anéis com cerca de 5 a cerca de 9 átomos de carbono no anel. Alicíclicos usados aqui podem incluir ainda, opcionalmente, um ou mais grupos substituintes.

[00151] Como usado aqui, "alifático" se refere a um radical de hidrocarboneto linear ou ramificado contendo até vinte e quatro átomos de carbono, em que a saturação entre quaisquer dois átomos de carbono é uma ligação simples, dupla ou tripla. O grupo alifático contém, preferencialmente, de 1 a cerca de 24 átomos de carbono, mais tipicamente de 1 a cerca de 12 átomos de carbono, sendo que de 1 a cerca de 6 átomos de carbono é mais preferencial. A cadeia linear ou ramificada de um grupo alifático pode ser interrompida por um ou mais heteroátomos que incluem nitrogênio, oxigênio, enxofre e fósforo. Esses grupos

alifáticos interrompidos por heteroátomos incluem, entre outros, polialcóxis, como polialcaleno glicóis, poliaminas e poliminas. Grupos alifáticos usados aqui podem incluir ainda, opcionalmente, um ou mais grupos substituintes.

[00152] Como usado aqui, "alcóxi" se refere a um radical formado entre um grupo alquila e um átomo de oxigênio, em que o átomo de oxigênio é usado para afixar o grupo alcóxi a uma molécula de origem. Exemplos de grupos alcóxi incluem, sem limitação, metóxi, etóxi, n-propóxi, isopropóxi, n-butóxi, sec-butóxi, terc-butóxi, n-pentóxi, neopentóxi, n-hexóxi e similares. Grupos alcóxi usados aqui podem incluir ainda, opcionalmente, um ou mais grupos substituintes.

[00153] Como usado aqui, "aminoalquila" se refere um radical alquila C1-C12 substituído por amina. A parte da alquila do radical forma uma ligação covalente com uma molécula de origem. O grupo amina pode estar localizado em qualquer posição e o grupo de aminoalquila pode ser substituído por um grupo substituinte nas partes alquila e/ou amina.

[00154] Como usado aqui, "aralquila" e "arilalquila" se refere a um grupo aromático que é ligado covalentemente a um radical alquila C1-C12 . A parte do radical alquila do grupo aralquila (ou arilalquila) resultante forma uma ligação covalente com uma molécula de origem. Os exemplos incluem, entre outros, benzila, fenetila e similares Os grupos aralquila usados aqui podem incluir ainda, opcionalmente, grupos substituintes afixados a alquila, arila ou a ambos os grupos que formam o grupo radical.

[00155] Como usado aqui, "arila" e "aromático" se refere a radicais de um sistema de anel carboxílico mono ou policíclico com um ou mais anéis aromáticos. Os exemplos de grupos arila incluem, entre outros, fenila, naftila, tetra-hidronaftila, indanila, indenila e similares. Os sistemas de anel arila preferenciais têm cerca de 5 a cerca de 20 átomos de carbono em um ou mais anéis. Grupos arila usados aqui podem incluir

ainda, opcionalmente, um ou mais grupos substituintes.

[00156] Como usados aqui, os termos "halo" e "halogênio" se referem a um átomo selecionado do flúor, cloro, bromo e iodo.

[00157] Como usado aqui, "heteroarila" e "heteroaromático" se referem a um radical que compreende um sistema de anel aromático mono ou policíclico, um sistema de anel ou um sistema de anel fundido em que pelo menos um dos anéis seja aromático e inclua um ou mais heteroátomos. Heteroarila também deve incluir sistemas de anel fundidos incluindo sistemas em que um ou mais anéis fundidos não contêm heteroátomos. Os grupos heteroarila incluem tipicamente um átomo do anel selecionado do enxofre, nitrogênio ou oxigênio. Exemplos de grupos de heteroarila incluem, entre outros, piridinila, pirazinila, pirimidinila, pirrolila, pirazolila, imidazolila, tiazolila, oxazolila, iso-oxazolila, tiadiazolila, oxadiazolila, tiofenila, furanila, quinolinila, isoquinolinila, benzimidazolila, benzo-oxazolila, quinoxalinila e similares. Os radicais heteroarila podem ser afixados a uma molécula de origem diretamente ou através de uma porção de ligação como um grupo alifático ou heteroátomo. Grupos heteroarila usados aqui podem incluir ainda, opcionalmente, um ou mais grupos substituintes.

[00158] Como usado aqui, "composto conjugado" se refere a quaisquer átomos, grupo de átomos ou grupo de átomos ligados adequados para serem usados como um grupo conjugado. Em determinadas modalidades, os compostos conjugados podem possuir ou conferir uma ou mais propriedades do composto ao qual estão afixados, incluindo, entre outros, propriedades de farmacodinâmica, farmacocinética, absorção, distribuição celular, absorção celular, carga e/ou depuração.

[00159] Como usado aqui, salvo se indicado ou modificado de outro modo, o termo "de fita dupla" se refere a dois compostos oligoméricos separados que são hibridizados a outro. Esses compostos de fita dupla

podem ter um ou mais nucleosídeos não hibridizantes em uma ou ambas as extremidades de uma ou ambas as fitas (overhangs) e/ou um ou mais nucleosídeos não hibridizantes internos (incompatibilidades) desde que exista complementaridade suficiente para manter a hibridização em condições fisiologicamente relevantes.

[00160] Como usado aqui, o termo "sítio alvo 5'" refere-se ao nucleotídeo de um ácido nucleico alvo que é complementar ao nucleotídeo mais extremo em 5' de um composto antissenso específico.

[00161] Como usado aqui, o termo "cerca de" se refere a dentro de ± 10% de um valor. Por exemplo, se é afirmado, "um marcador pode ser aumentado em cerca de 50%", está implícito que o marcador pode ser aumentado entre 45%-55%.

[00162] Como usado aqui, "administrado concomitantemente" refere-se à coadministração de dois agentes de qualquer forma na qual os efeitos farmacológicos de ambos são manifestados no paciente ao mesmo tempo. A administração concomitante não exige que os ambos os agentes sejam administrados numa única composição farmacêutica, na mesma forma de dosagem, ou pela mesma via de administração. Os efeitos de ambos os agentes não precisam se manisfestar ao mesmo tempo. Os efeitos precisam apenas ser sobrepostos por um período de tempo e não precisam ser coextensivos.

[00163] Como usado aqui, "administrar" ou "administração" significa fornecer um agente farmacêutico a um indivíduo, e inclui, mas não está limitado a, administração por um médico e autoadministração. A administração de um agente farmacêutico a um indivíduo pode ser contínua, crônica, curta ou intermitente. A administração pode ser parenteral ou não parenteral.

[00164] Como usado aqui, "agente" significa uma substância ativa que pode fornecer um benefício terapêutico quando administrado a um

animal. "Primeiro agente" significa um composto terapêutico da invenção. Por exemplo, um primeiro agente pode ser um oligonucleotídeo antissenso que direciona apoCIII. "Segundo agente" significa um segundo composto terapêutico da invenção (por exemplo, um segundo oligonucleotídeo antissenso que direciona apoCIII) e/ou um composto terapêutico de não apoCIII.

[00165] Como usado aqui, "melhora" ou "melhorar" ou "melhorando" se refere a uma diminuição de pelo menos um indicador, sinal, ou sintoma de uma doença, distúrbio, ou condição associada. A gravidade dos indicadores pode ser determinada por medidas subjetivas ou objetivas, que são conhecidas pelos versados na técnica.

[00166] Como usado aqui, "animal" refere-se a um humano ou animal não humano, incluindo, mas não limitado a, camundongos, ratos, coelhos, cães, gatos, porcos e primatas não humanos, incluindo, mas não se limitando a, macacos e chimpanzés.

[00167] Como usado aqui, "ApoCIII", "Apoliproteína C-III" ou "ApoC3" significa qualquer sequência de ácido nucleico ou de proteína que codifica ApoCIII. Por exemplo, em certas modalidades, a apo(a) inclui uma sequência de DNA que codifica ApoCIII, uma sequência de RNA transcrita a partir do DNA que codifica ApoCIII (incluindo o DNA genômico, compreendendo os íntrons e éxons), e uma sequência de mRNA que codifica ApoCIII ou uma sequência de peptídeo que codifica ApoCIII.

[00168] Como usado aqui, "ácido nucleico de ApoCIII" significa qualquer ácido nucleico que codifica ApoCIII. Por exemplo, em certas modalidades, um ácido nucleico de ApoCIII inclui uma sequência de DNA que codifica ApoCIII, uma sequência de RNA transcrita a partir do DNA que codifica ApoCIII (incluindo o DNA genômico, compreendendo os íntrons e éxons), e uma sequência de mRNA que codifica ApoCIII.

[00169] Como usado aqui, "inibidor específico de ApoCIII" refere-se

a qualquer agente capaz de inibir especificamente a expressão do mRNA de ApoCIII e/ou a expressão ou a atividade da proteína ApoCIII a nível molecular. Por exemplo, os inibidores específicos de ApoCIII incluem ácidos nucleicos (incluindo compostos antissenso), peptídeos, anticorpos, moléculas pequenas, e outros agentes capazes de inibir a expressão do mRNA de ApoCIII e/ou da proteína de ApoCIII. Em certas modalidades, o ácido nucleico é um composto antissenso. Em certas modalidades, o composto antissenso é um oligonucleotídeo que direciona ApoCIII. Em determinadas modalidades, o oligonucleotide que direciona ApoCIII é um oligonucleotídeo modificado que direciona ApoCIII. Em determinadas modalidades, o oligonucleotídeo que direciona ApoCIII é um oligonucleotídoe modificado que direciona ApoCIII com um grupo conjugado. Em determinadas modalidades, o oligonucleotide que direciona ApoCIII tem uma sequência, conforme indicado em SEQ ID NOs:19-96, 209-221 ou outra sequência (por exemplo, como aquelas divulgadas na Publicação PCT WO 2004/093783 ou Publicação PCT WO 2012/149495, todas incorporadas por referência a este documento). Em determinadas modalidades, pela modulação específica do nível de mRNA de ApoCIII e/ou expressão da proteína de ApoCIII, os inibidores específicos de ApoCIII podem afetar componentes da via lipogência ou glicogênica. De forma similar, em certas modalidades, os inibidores específicos de ApoCIII podem afetar outros processos moleculares em um animal.

[00170] Como usado aqui, "mRNA de ApoCIII" significa um mRNA que codifica uma proteína de ApoCIII.

[00171] Como usado aqui, "proteína de ApoCIII" significa qualquer sequência de proteína que codifica ApoCIII.

[00172] Como usado aqui, "aterosclerose" significa um endurecimento das artérias que afetam artérias de tamanho médio e grande e é caracterizada pela presença de depósitos graxos. Os depósitos graxos

são denominados "ateromas" ou "placas", que consistem principalmente em colesterol e outras gorduras, cálcio e tecido da cicatriz, e danificam o forro das artérias.

[00173] Como usado aqui, "doença cardíaca coronariana (CHD)" significa estreitar os vasos sanguíneos pequenos que fornecem sangue e oxigênio ao coração, que é frequentemente um resultado da aterosclerose.

[00174] Como usado aqui, "diabetes mellitus" ou "diabetes" é uma síndrome caracterizada por metabolismo desordenado e teor de açúcar no sangue altamente elevado (hiperglicemia) resultantes de níveis insuficientes de insulina ou sensibilidade à insulina reduzida. Os sintomas característicos são produção excessiva de urina (poliúria) devido aos altos níveis de glicose sanguínea, sede excessiva e maior ingestão de líquidos (polidipsia) que tenta compensar a urinação aumentada, visão turva devido aos efeitos de glicose sanguínea elevada na óptica ocular, perda de peso inexplicada e letargia.

[00175] Como usado aqui, "dislipidemia diabética" ou "diabetes tipo 2 com dislipidemia" significa uma condição caracterizada pelo diabetes tipo 2, HDL-C reduzido, triglicerídeos elevados, e pequenas partículas de LDL densas elevadas.

[00176] Como usado aqui, "diluente" significa um ingrediente em uma composição que não tem atividade farmacológica, mas é farmaceuticamente necessário ou desejável. Por exemplo, o diluente em uma composição injetada pode ser um líquido, por exemplo, solução salina.

[00177] Como usado aqui, "dislipidemia" refere-se a um distúrbio do metabolismo lipídico e/ou de lipoproteína, incluindo a superprodução ou deficiência de lipídios e/ou de lipoproteína. As dislipidemias podem se manifestar pela elevação de lipídios tais como quilomícron, colesterol e triglicerídeos, bem como lipoproteínas, tal como colesterol da lipoproteína de baixa densidade (LDL).

[00178] Como usado aqui, "unidade de dosagem" significa uma forma na qual um agente farmacêutico é fornecido, por exemplo, pílula, comprimido, ou outra unidade de dosagem conhecida na técnica. Em determinadas modalidades, uma unidade de dosagem é um frasco que contém o oligonucleotídeo antissenso liofilizado. Em determinadas modalidades, uma unidade de dosagem é um frasco que contém o oligonucleotídeo antissenso reconstituído.

[00179] Como usado aqui, "dose" significa uma quantidade especificada de um agente farmacêutico fornecido numa administração única, ou num período de empo especificado. Em determinadas modalidades, uma dose pode ser administrada em um, dois ou mais bolus, comprimidos ou injeções. Por exemplo, em determinadas modalidades onde a administração subcutânea é desejada, a dose desejada requer um volume não facilmente acomodado por uma única injeção, portanto, duas ou mais injeções podem ser usadas para obter a dose desejada. Em determinadas modalidades, o agente farmacêutico é administrado por infusão durante um período de tempo estendido ou continuamente. As doses podem ser indicadas como a quantidade de agente farmacêutico por hora, dia, semana ou mês. As doses podem também ser indicadas como mg/kg ou g/kg.

[00180] Como usado aqui, "quantidade eficaz" ou "quantidade terapeuticamente eficaz" significa a quantidade de agente farmacêutico ativo suficiente para efetuar um resultado fisiológico desejado em um indivíduo em necessidade do agente. A quantidade eficaz pode varia dentre os indivíduos, dependendo da saúde e condição física do indivíduo a ser tratado, o grupo taxonômico dos indivíduos a serem tratados, a formulação da composição, avaliação da condição médica do indivíduo, e outros fatores relevantes.

[00181] Como usado aqui, o termo "Fredrickson Tipo I" também é conhecido como "deficiência de lipoproteína lipase", "LPLD", "Síndrome

de Quilomicronemia Familiar" ou "FCS" e existe em várias formas: Tipo 1a (também conhecida como síndrome de Buerger-Gruestz) é uma deficiência de lipoproteína lipase comumente devido a uma deficiência de LPL ou ApoC-II alterada; Tipo Ib (também conhecido como deficiência de apoproteína CII familiar) é uma condição causada pela falta da apoproteína CII do ativador de lipoproteína lipase; e Tipo Ic é uma quilomicronemia que se deve à circulação do inibidor da lipoproteína lipase. O Tipo I é uma doença rara que se apresenta, geralmente, na infância. É caracterizada por elevações severas em quilomícrons e níveis de TG extremamente elevados (que sempre fica bem acima de 1000 mg/dL e que, não raro, sobe para 10.000 mg/dL ou mais) com episódios de dor abdominal, pancreatite aguda recorrente, xantomas cutâneos eruptivos e hepatoesplenomegalia. Os pacientes raramente desenvolvem aterosclerose, talvez porque suas partículas de lipoproteína do plasma são muito grandes para que entrem na íntima arterial (Nordestgaard et al., J LipidRes, 1988, 29:1491-1500; Nordestgaard et al., Arteriosclerosis, 1988, 8:421-428). O Tipo I é, geralmente, causado por mutações do gene LPL ou da ApoC-II do cofator do gene, resultando na incapacidade de indivíduos afetados de produzir LPL funcionalmente ativa insuficiente. Os pacientes são homozigotos para essas mutações ou heterozigotos compostos. Fredrickson Tipo I também pode ser devido a mutações no GPIHBP1, APOA5, LMF1 ou outros genes que acarretam em LPL disfuncional. Brunzell, In: Pagon RA, Adam MP, Bird TD, Dolan CR, Fong CT, Stephens K, editores. GeneReviews™ [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2013.12 Out 1999 [atualizado em 15 Dez 2011]. Além disso, Fredrickson Tipo I, em alguns casos, pode ser devido à presença de inibidores da LPL (por exemplo, anticorpos anti-LPL) em um indivíduo causando LPL disfuncional. A prevalência de Fredrickson Tipo I é aproximadamente 1 em 1.000.000 na população em geral e é muito mais elevada na África do Sul e leste de

Quebec como resultado de um efeito fundador. Os pacientes respondem minimamente ou não respondem de maneira nenhuma a fármacos que diminuem o TG (Tremblay et al., J Clin Lipiodol, 2011, 5:37-44; Brisson et al., Pharmacogenet Genom, 2010, 20:742-747) e, portanto, a restrição de gordura na dieta em 20 gramas/dia ou menos é usada para controlar os sintomas deste distúrbio raro.

[00182] Como usado aqui, "totalmente complementar" ou "100% complementar" significa que cada nucleobase de uma sequência de nucleobase de um primeiro ácido nucleico tem uma nucleobase complementar numa segunda sequência de nucleobase de um segundo ácido nucleico. Em certas modalidades, um primeiro ácido nucleico é um composto antissenso e um segundo ácido nucleico é um ácido nucleico alvo.

[00183] Como usado aqui, "glicose" é um monossacarídeo usado pelas células como uma fonte de energia e intermediário inflamatório. "Glicose plasmática" refere-se à glicose presente no plasma.

[00184] Como usado aqui, "lipoproteína-C de alta densidade" ou "HDL-C" significa colesterol associado a partículas de lipoproteína de alta densidade. A concentração de HDL-C no soro (ou plasma) é normalmente quantificada em mg/dL ou nmol/L. "HDL-C do soro" e "HDL-C do plasma" significam HDL-C no soro e no plasma, respectivamente.

[00185] Como usado aqui, "inibidor da HMG-CoA redutase" significa um agente que age através da inibição da enzima HMG-CoA redutase, tal como atorvastatina, rosuvastatina, fluvastatina, lovastatina, pravastatina e sinvastatina.

[00186] Como usado aqui, "hipercolesterolemia" significa uma condição caracterizada pelo colesterol elevado ou colesterol circulante (do plasma), LDL-colesterol e VLDL-colesterol, como por diretrizes do Relatório de Painel Perito do Programa Educacional de Colesterol Nacional (NCEP) de Detecção, Avaliação do Tratamento de colesterol alto em adultos (vide, Arch. Int. Med. (1988) 148, 36-39).

[00187] Como usado aqui, "hiperlipidemia" ou "hiperlipidemia" é uma condição caracterizada por lipídios séricos elevados ou lipídios circulantes (plasma). Esta condição manifesta uma concentração anormalmente alta de gorduras. As frações de lipídio no sangue circulante são colesterol, lipoproteínas de baixa densidade, lipoproteínas de densidade muito baixa, quilomícrons e triglicerídeos. A classificação de Fredrickson de hiperlipidemias é baseada no padrão de TG e partículas de lipoproteína rica em colesterol, conforme medido por eletroforese ou ultracentrifugação e é comumente usada para caracterizar causas primárias de hiperlipidemias tal como hipertrigliceridemia (Fredrickson and Lee, Circulation, 1965, 31:321-327; Fredrickson et al., New Eng J Med, 1967, 276 (1): 34-42).

[00188] Como usado aqui, "hipertrigliceridemia" significa uma condição caracterizada por níveis elevados de triglicérides. Hipertrigliceridemia é uma consequência do aumento da produção e/ou da redução ou demora do catabolismo de lipoproteínas ricas em triglicerídeo (TG): VLDL e, em menor medida, quilomícrons (CM). Sua etiologia inclui fatores primários (ou seja, causas genéticas) e secundários (outras causas subjacentes tais como diabetes, síndrome metabólica/resistência à insulina, obesidade, inatividade física, fumar cigarro, álcool adicional e uma dieta muito alta em carboidratos) ou, o mais frequentemente, uma combinação de ambos (Yuan et al. CMAJ, 2007, 176:1113-1120). Hipertrigliceridemia é um traço clínico comum associado ao aumento do risco de doença cardiometabólica (Hegele et al. 2009, Hum Mol Genet, 18: 4189-4194; Hegele and Pollex 2009, Mol Cell Biochem, 326: 35-43), bem como da ocorrência de pancreatite aguda nas formas mais graves (Toskes 1990, Gastroenterol Clin North Am, 19: 783-791; Gaudet et al. 2010, Atherosclerosis Supplements, 11: 55-60; Catapano et al. 2011, Atherosclerosis, 217S: S1-S44; Tremblay et al. 2011, J Clin Lipidol, 5:

37-44). Exemplos de doença cardiometabólica incluem, entre outros, diabetes, síndrome metabólica/resistência à insulina e distúrbios genéticos como síndrome de quilomicronemia familiar (FCS), hiperlipidemia combinada familiar e hipertrigliceridemia familiar. Os níveis de TG elevados limítrofes (150-199 mg/dL) são comumente encontrados na população geral e são um componente comum dos estados da síndrome metabólica/resistência à insulina. O mesmo é verdadeiro para níveis elevados de TG (200-499 mg/dL), exceto que já que os níveis plasmáticos de TG aumentam, os fatores genéticos subjacentes desempenham um papel etiológico cada vez mais importante. Níveis muito elevados de TG (≥500 mg/dL) são mais frequentemente associados a níveis de CM também elevados, e são acompanhados pelo aumento do risco para pancreatite aguda. O risco de pancreatite é considerado clinicamente significativo se os níveis de TG excederem 880 mg/dL (> 10 mmol) e as diretrizes de 2011 da European Atherosclerosis Society/European Societyof Cardiology (EAS/ESC) afirmam que as ações necessárias para prevenir a pancreatite aguda são obrigatórias (Catapano et al. 2011, Atherosclerosis, 217S: S1-S44). De acordo com as diretrizes da EAS/ESC 2011, a hipertrigliceridemia é a causa de aproximadamente 10% dos casos de pancreatite e o desenvolvimento de pancreatite pode ocorrer em níveis de TG entre 440-880 mg/dL. Com base em evidências de estudos clínicos que demonstram que níveis elevados de TG são um fator de risco independente para CVD aterosclerótica, as diretrizes do III Painel de Tratamento de Adultos do Programa de Educação de Colesterol Nacional (NCEP 2002, Circulation, 106: 3143-421) e da Associação Americana de Diabetes (ADA 2008, Diabetes Care, 31: S12-S54.) recomendam um nível de TG alvo de menos de 150 mg/dL para reduzir o risco cardiovascular.

[00189] Como usado aqui, "identificar" ou "selecionar um animal com doença metabólica ou cardiovascular", significa identificar ou selecionar

um indivíduo propenso a ou que foi diagnosticado com uma doença metabólica, uma doença cardiovascular, ou uma síndrome metabólica; ou identificar ou selecionar um indivíduo que tem qualquer sintoma de uma doença metabólica, doença cardiovascular, ou síndrome metabólica incluindo, mas não limitado a, hipercolesterolemia, hiperglicemia, hiperlipidemia, hipertrigliceridemia, resistência à insulina aumentada pela hipertensão, sensibilidade à insulina reduzida, peso corporal acima do normal, e/ou teor de gordura corporal acima do normal ou qualquer combinação dos mesmos. Essa identificação pode ser realizada por qualquer método, incluindo mas não limitado a, testes ou avaliações clínicas padrão, tais como medição do soro ou colesterol circulante (plasma), medição do soro ou glicose no sangue circulante (plasma), medição do soro ou triglicerídeos circulantes (plasma), medição da pressão arterial, medição do teor de gordura corporal, medição do peso corporal, e similares.

[00190] Como usado aqui, "resultado cardiovascular melhorado" significa uma redução na ocorrência de eventos cardiovasculares adversos, ou o risco da mesma. Exemplos de eventos cardiovasculares adversos incluem, sem limitação, morte, reinfarto, derrame, choque cardiogênico, edema pulmonar, parada cardíaca, e disritmia atrial.

[00191] Como usado aqui, "imediatamente adjacente" significa que não há elementos intermediários entre os elementos imediatamente adjacentes, por exemplo, entre regiões, segmentos, nucleotídeos e/ou nucleosídeos.

[00192] Como usado aqui, "aumento de HDL" ou "elevação de HDL" significa o aumento do nível de HDL em um animal após a administração pelo menos um composto da invenção, em comparação com o nível de HDL em um animal não administrado com nenhum composto.

[00193] Como usado aqui, "indivíduo" ou "indivíduo" ou "animal" significa um animal humano ou não humano selecionado para tratamento

ou terapia.

[00194] Como usado aqui, "indivíduo em necessidade do mesmo" se refere a um animal humano ou um animal não humano selecionado para tratamento ou terapia que esteja em necessidade de tal tratamento ou terapia.

[00195] Como usado aqui, "induzir", "inibir", "potencializar", "elevar", "aumentar", "diminuir", "reduzir" ou similares denotam diferenças quantitativas entre dois estados. Por exemplo, "uma quantidade eficaz para inibir a atividade ou a expressão de apoCIII" significa que o nível de atividade ou expressão de apoCIII em uma amostra tratada diferirá a partir do nível de atividade ou expressão de apoCIII em uma amostra não tratada. Tais termos são aplicados a, por exemplo, níveis de expressão, e níveis de atividade.

[00196] Como usado aqui, "condição inflamatória" se refere a uma doença, estado de doença, síndrome, ou outra condição resultando na inflamação. Por exemplo, a artrite reumatoide e a fibrose hepática são condições inflamatórias. Outros exemplos de condições inflamatórias incluem sepse, isquemia do miocárdio/lesão de reperfusão, síndrome de desconforto respiratório do adulto, nefrite, rejeição ao enxerto, doença inflamatória intestinal, esclerose múltipla, arteriosclerose, aterosclerose e vasculite.

[00197] Como usado aqui, "inibição da expressão ou atividade" refere-se a uma redução ou bloqueio da expressão ou atividade de um RNA ou proteína e não necessariamente indica uma eliminação total da expressão ou atividade.

[00198] Como usado aqui, "resistência à insulina" é definida como a condição na qual quantidades normais de insulina são inadequadas para produzir uma resposta normal à insulina a partir das células de gordura, do músculo e do fígado. Resistência à insulina nas células de gordura resulta na hidrólise dos triglicérides armazenados, o que eleva

os ácidos graxos livres no plasma sanguíneo. A resistência à insulina no músculo reduz a absorção de glicose, enquanto a resistência à insulina no fígado reduz o armazenamento de glicose, com ambos os efeitos servindo para elevar a glicose sanguínea. Altos níveis plasmáticos de insulina e glicose devido à resistência à insulina frequentemente levam à síndrome metabólica e a diabetes tipo 2.

[00199] Como usado aqui, "sensibilidade à insulina" é uma medida do quão eficazmente um indivíduo processa a glicose. Um indivíduo tendo alta sensibilidade à insulina processa eficazmente a glicose, enquanto que um indivíduo com baixa sensibilidade à insulina não processa eficazmente a glicose.

[00200] Como usado aqui, "redução de lipídios" significa uma redução em um ou mais lipídios (por exemplo, LDL, VLDL) em um indivíduo. "Elevação de lipídios" significa um aumento em um lipídio (por exemplo, HDL) em um indivíduo. A redução de lipídios ou a elevação de lipídios pode ocorrer com uma ou mais doses ao longo do tempo.

[00201] Como usado aqui, "terapia de redução lipídica" ou "agente redutor de lipídios" significa um regime terapêutico fornecido a um indivíduo para reduzir um ou mais lipídios em um indivíduo. Em certas modalidades, uma terapia de redução de lipídios é fornecida para reduzir uma ou mais de apo(a), apoCIII, CETP, apoB, colesterol total, LDL-C, VLDL-C, IDL-C, não HDL-C, triglicerídeos, pequenas partículas densas de LDL, e LP(a) em um indivíduo. Exemplos de terapia de redução de lipídios incluem, mas não estão limitados a, inibidores de apoB, estatinas, fibratos e inibidores de MTP.

[00202] Como usado aqui, "lipoproteína", tais como VLDL, LDL e HDL, se refere a um grupo de proteínas encontradas no soro, no plasma e no linfonodo e é importante para o transporte do lipídio. A composição química de cada lipoproteína difere, por exemplo, em que a HDL tem uma proporção mais alta de proteína versus lipídio, considerando que a

VLDL tem uma proporção mais baixa de proteína versus lipídio.

[00203] Como usado aqui, "Lipoproteína Lipase" ou "LPL" refere-se a uma enzima que hidrolisa os TGs encontrados em lipoproteínas, como CM ou VLDL, em ácidos graxos livres e monoacilgliceróis. LPL requer apo C-II como um cofator para funcionar na hidrólise de TGs. A LPL é produzida principalmente no músculo esquelético, tecido adiposo e músculo cardíaco. A hidrólise e a remoção de TG de CM e VLDL protege normalmente contra o aumento pós-prandial excessivo na massa de CM e TG.

[00204] Como usado aqui, os termos "deficiente de lipoproteína lipase", "deficiência de lipoproteína lipase" ou "deficiência de LPL" ou "LPLD" também são conhecidos como "Dislipidemia Fredrickson Tipo I", "quilomicronemia", "Síndrome de Quilomicronemia Familiar" ou "FCS". Embora indivíduos com LPLD geralmente não apresentem LPL ou atividade de LPL necessária para a degradação efetiva de ácidos graxos como TGs, esses indivíduos ainda podem ter uma atividade de LPL mínima ou expressar um nível mínimo de LPL. Em alguns casos, um indivíduo com LPLD pode expressar LPL ou ter atividade de LPL de até cerca ou no máximo 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% ou 1% de atividade. Em outros casos, o indivíduo com LPLD não tem LPL mensurável ou atividade de LPL. Uma modalidade de LPLD engloba indivíduos com "hiperlipoproteinemia tipo Ia" (também conhecido como "Fredrickson Tipo Ia") e refere-se à incapacidade dos indivíduos para produzir enzimas lipoproteína lipase funcionais suficientes e necessárias para a degradação eficaz de ácidos graxos como TGs. A incapacidade de degradação de TGs acarreta em hipertrigliceridemia no indivíduo e, muitas vezes, mais de 12 horas após as refeições, hyierTG e quilomicronemia estão ainda presentes e visíveis como lipemia. O Tipo Ia é comumente causado por uma ou mais mutações no gene da LPL. Conforme divulgado aqui,

LPLD também engloba indivíduos que têm lipoproteína lipase disfuncional como aqueles indivíduos com "hiperlipoproteinemia tipo Ib" (também conhecida como "Fredrickson Tipo Ib") e "hiperlipoproteinemia tipo Ic" (também conhecida como "Fredrickson tipo Ic"). O Tipo Ib é causado pela falta de apoproteína C-II do ativador da lipoproteína lipase. O Tipo Ic é devido a um inibidor circulante da lipoproteína lipase. Assim como indivíduos com o Tipo 1a, indivíduos com o Tipo 1b/1c sofrem de uma incapacidade de degradar TGs acarretando em hipertrigliceridemia e hiperTG e quilomicronemia que estão presentes e são visíveis como lipemia, muitas vezes, mais de 12 horas após as refeições. Em determinadas modalidades, LPLD está associada a pelo menos uma mutação no gene da LPL como P207L, G188L ou D9N ou outras mutações que afetam a LPL (Brunzell, In: Pagon RA, Adam MP, Bird TD, Dolan CR, Fong CT, Stephens K, editores. GeneReviews™ [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2013.12 Out 1999 [atualizado em 15 Dez 2011].

[00205] Como usado aqui, "lipoproteína-colesterol de baixa densidade (LDL-C)" significa colesterol transportado em partículas de lipoproteína de baixa densidade. A concentração de LDL-C no soro (ou plasma) é normalmente quantificada em mg/dL ou nmol/L. "LDL-C do soro" e "LDL-C do plasma" significam LDL-C no soro e no plasma, respectivamente.

[00206] Como usado aqui, "principais fatores de risco" referem-se aos fatores que contribuem para um alto risco de uma doença ou condição específica. Em certas modalidades, os principais fatores de risco para doença cardíaca coronariana incluem, sem limitação, tabagismo, hipertensão, LDL alta, HDL-C baixa, histórico familiar de doença cardíaca coronariana, idade, e outros fatores divulgados aqui.

[00207] Como usado aqui, "distúrbio metabólico" ou "doença metabólica" se refere a uma condição caracterizada por uma alteração ou

distúrbio na função metabólica. "Metabólico" e "metabolismo" são termos bem conhecidos na técnica e geralmente incluem a gama inteira de processos bioquímicos que ocorrem dentro de um organismo vivo. Distúrbios metabólicos incluem, mas não estão limitados a, hiperglicemia, pré-diabetes, diabetes (tipo 1 e tipo 2), obesidade, resistência à insulina, síndrome metabólica e dislipidemia devido ao diabetes tipo 2.

[00208] Como usado aqui, "síndrome metabólica" significa uma condição caracterizada por um agrupamento de lipídios e fatores de risco cardiovasculares não lipídicos de origem metabólica. Em determinadas modalidades, a síndrome metabólica é identificada pela presença de quaisquer 3 dos seguintes fatores: circunferência da cintura maior que 102 cm em homens ou maior que 88 cm em mulheres; triglicérides séricos de pelo menos 150 mg/dL; HDL-C menor que 40 mg/dL em homens ou menor que 50 mg/dL em mulheres; pressão sanguínea de pelo menos 130/85 mmHg; e glicose em jejum de pelo menos 110 mg/dL. Esses determinantes podem ser facilmente medidos na prática clínica (JAMA, 2001, 285: 2486-2497).

[00209] "Administração parentérica" significa administração através de injeção ou infusão. A administração parentérica inclui administração subcutânea, administração intravenosa, administração intramuscular, administração intra-arterial, administração intraperitoneal, ou administração intracraniana, por exemplo, administração intratecal ou intracerebroventricular. A administração pode ser contínua, crônica, curta ou intermitente.

[00210] Como usado aqui, "peptídeo" significa uma molécula formada pela ligação de pelo menos dois aminoácidos por ligações de amida. Peptídeo refere-se a polipeptídeos e proteínas.

[00211] Como usado aqui, "agente farmacêutico" significa uma substância que proporciona um benefício terapêutico quando administrada a

um indivíduo. Por exemplo, em certas modalidades, um oligonucleotídeo antissenso direcionado à apoCIII é um agente farmacêutico ativo.

[00212] Como usado aqui, "composição farmacêutica" ou "composição" significa uma mistura de substâncias adequadas para a administração a um indivíduo. Por exemplo, uma composição farmacêutica pode compreender um ou mais agentes ativos e um veículo farmacêutico, por exemplo, uma solução aquosa estéril.

[00213] Como usado aqui, "derivado farmaceuticamente aceitável" engloba derivados dos compostos descritos aqui tais como solvatos, hidratos, ésteres, profármacos, polimorfos, isômeros, variantes isotipicamente marcadas, sais farmaceuticamente aceitáveis e outros derivados conhecidos na técnica.

[00214] Como usado aqui, "sais farmaceuticamente aceitáveis" significa sais fisiologicamente e farmaceuticamente aceitáveis de compostos antissenso, ou seja, sais que mantêm a atividade biológica desejada do composto pai e não transmitem efeitos toxicológicos indesejáveis aos mesmos. O termo "sal farmaceuticamente aceitável" ou "sal" inclui um sal preparado a partir de ácidos ou bases não tóxicos farmaceuticamente aceitáveis, incluindo ácidos e bases inorgânicos ou orgânicos. "Sais farmaceuticamente aceitáveis" dos compostos descritos aqui podem ser preparados por métodos bem conhecidos na técnica. Para uma revisão dos sais farmaceuticamente aceitáveis, vide Stahl and Wermuth, Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use (Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2002). Os sais de sódio dos oligonucleotídeos antissenso são úteis e são bem aceitos para a administração terapêutica em seres humanos. Nesse sentido, em uma modalidade, os compostos descritos aqui estão sob a forma de um sal de sódio.

[00215] Como usado aqui, "porção" significa um número definido de nucleobases contíguas (isto é, ligadas) de um ácido nucleico. Em deter-

minadas modalidades, uma porção é um número definido de nucleobases contíguas de um ácido nucleico alvo. Em determinadas modalidades, uma porção é um número definido de nucleobases contíguas de um composto antissenso.

[00216] Como usado aqui, "prevenir" ou "prevenção" se refere ao retardamento ou prevenção do aparecimento ou do desenvolvimento de uma doença, distúrbio, ou condição por um período de tempo de minutos a indefinidamente. Prevenir também significa reduzir o risco de desenvolvimento de uma doença, distúrbio ou condição.

[00217] Como usado aqui, "elevar" significa aumentar em quantidade. Por exemplo, elevar níveis de HDL do plasma significa aumentar a quantidade de HDL no plasma.

[00218] Como usado aqui, "reduzir" significa reduzir a uma extensão, tamanho, quantidade, ou número menor. Por exemplo, reduzir os níveis de triglicerídeo do plasma significa reduzir a quantidade de triglicerídeo no plasma.

[00219] Como usado aqui, "região" ou "região alvo" é definida como uma porção do ácido nucleico alvo que tem pelo menos uma estrutura, função, ou característica identificável. Por exemplo, uma região alvo pode abranger uma 3' UTR, uma 5' UTR, um éxon, um íntron, uma junção éxon/íntron, uma região de codificação, uma região de iniciação da tradução, região de terminação da tradução, ou outra região de ácido nucleico definida. As regiões estruturalmente definidas para apoCIII podem ser obtidas pelo número de acesso de bancos de dados de sequência tal como NCBI e tais informações são incorporadas aqui por referência. Em certas modalidades, uma região alvo pode abranger a sequência de um sítio alvo 5' de um segmento alvo dentro da região alvo para um sítio alvo 3' de outro segmento alvo dentro da região alvo.

[00220] Como usado aqui, "segundo agente" ou "segundo agente terapêutico" significa um agente que pode ser usado em combinação com

um "primeiro agente". Um segundo agente terapêutico pode incluir, mas não está limitado a, oligonucleotídeos antissenso que direcionam apo(a) ou apoCIII. Um segundo agente pode também incluir anticorpos anti-apoCIII, inibidores de peptídeo de apoCIII, agentes redutores de colesterol, agentes redutores de lipídio, agentes redutores de glicose e agentes anti-inflamatórios.

[00221] Como usado aqui, "segmentos" são definidos como subporções menores de regiões dentro de um ácido nucleico. Por exemplo, um "segmento alvo" significa a sequência de nucleotídeos de um ácido nucleico alvo à qual um ou mais compostos antissenso são direcionados. "Sítio alvo 5'" refere-se ao nucleotídeo mais extremo em 5' de um segmento alvo. "Sítio alvo 3'" se refere ao nucleotídeo 3'-terminal de um segmento alvo. Alternativamente, um "sítio de iniciação" pode se referir ao nucleotídeo 5'-terminal de um segmento alvo e um "sítio de parada" se refere ao nucleotídeo 3'-terminal de um segmento alvo. Um segmento alvo pode também começar no "sítio de iniciação" de uma sequência e extremidade no "sítio de parada" de outra sequência.

[00222] Como usado aqui, "estatina" significa um agente que inibe a atividade da HMG-CoA redutase.

[00223] Como usado aqui, "administração subcutânea" significa a administração logo abaixo da pele.

[00224] Como usado aqui, "indivíduo" significa um animal humano ou não humano selecionado para tratamento ou terapia.

[00225] Como usado aqui, "sintoma de doença ou distúrbio cardiovascular" significa um fenômeno que se eleva a partir de e acompanha a doença ou distúrbio cardiovascular e serve como uma indicação deste. Por exemplo, angina; dor no peito; falta de fôlego; palpitações; fraqueza; tonturas; náuseas; sudorese; taquicardia; bradicardia; arritmia; fibrilação atrial; inchaço nas extremidades inferiores; cianose; cansaço; desmaio; dormência da face; dormência dos membros; claudicação ou cólicas dos

músculos; inchaço do abdômen; ou febre são sintomas de doença ou distúrbio cardiovascular.

[00226] Como usado aqui, "direcionamento" ou "direcionado" significa o processo de projeto e seleção de um composto antissenso que se hibridizará em um ácido nucleico alvo e induzir um efeito desejado.

[00227] Como usado aqui, "quantidade terapeuticamente eficaz" significa uma quantidade de um agente farmacêutico que fornece um benefício terapêutico a um indivíduo.

[00228] Como usado aqui, "mudança terapêutica do estilo de vida" significa mudanças na dieta e no estilo de vida pretendidas para diminuir a massa de gordura/tecido adiposo e/ou o colesterol. Essa mudança pode reduzir o risco de desenvolver doença cardíaca e pode incluir recomendações para a ingestão na dieta de calorias diárias totais, gordura total, gordura saturada, gordura poli-insaturada, gordura monoinsaturada, carboidrato, proteína, colesterol, fibra insolúvel, bem como recomendações de atividade física.

[00229] Como usado aqui, "tratar" ou "tratamento" se refere à administração de um composto descrito aqui para efetuar uma alteração ou melhora de uma doença, distúrbio, ou condição.

[00230] Como usado aqui, "triglicéride" ou "TG" significa um lipídio ou gordura neutra consistindo em glicerol combinado com três moléculas de ácido graxo.

[00231] Como usado aqui, "diabetes tipo 2," (também conhecido como "diabetes mellitus tipo 2", "diabetes mellitus, tipo 2", "diabetes não dependente de insulina, NIDDM", "diabetes relacionado à obesidade", ou "diabetes do adulto") é um distúrbio metabólico que é principalmente caracterizado por resistência à insulina, deficiência de insulina relativa, e hiperglicemia.

[00232] ***Determinadas Modalidades***

[00233] Certas modalidades fornecem compostos e métodos que diminuem a expressão de mRNA de ApoCIII e expressão de proteína. Em certas modalidades, o composto é um inibidor específico de ApoCIII para tratar, prevenir, ou melhorar uma doença associada à ApoCIII. Em certas modalidades, o composto antissenso é um oligonucleotídeo antissenso que direciona ApoCIII. Em determinadas modalidades, o composto é um oligonucleotídeo que direciona ApoCIII e um grupo conjugado.

[00234] Em determinadas modalidades, um composto compreende um siRNA ou oligonucleotídeo antissenso direcionado à Apoliproteína C-III (ApoC-III) conhecida na técnica e um grupo de conjugado aqui descrito. Exemplos de oligonucleotídeos antissenso direcionados à ApoC-III adequados para conjugação incluem, entre outros, aqueles divulgados na Publicação do Pedido de Patente US Nº 2013/0317085, a qual é incorporada por referência na sua totalidade. Em determinadas modalidades, um composto compreende um oligonucleotídeo antissenso que possui uma sequência de nucleobases de quaisquer SEQ ID NOs 19-96 e 209-221 divulgadas em US 2013/0317085 e um grupo de conjugado aqui descrito. As sequências de nucleobases de todas as SEQ ID NOs referenciadas anteriormente estão incorporadas por referência aqui.

[00235] Em determinadas modalidades, o oligonucleotídeo modificado com o grupo de conjugado tem uma sequência de nucleobase que compreende pelo menos 8 nucleobases contíguas de uma sequência selecionada a partir de qualquer sequência divulgada em Patente U.S. 7.598.227, Patente U.S. 7.750.141 Publicação PCT WO 2004/093783 ou Publicação PCT WO 2012/149495, todas incorporadas por referência aqui. Em determinadas modalidades, o oligonucleotídeo modificado tem uma sequência selecionada a partir de qualquer sequência divulgada em Patente U.S. 7.598.227, Patente U.S. 7.750.141, Publicação

PCT WO 2004/093783 ou Publicação PCT WO 2012/149495, todas incorporadas por referência aqui.

[00236] Certas modalidades fornecem um composto compreendendo um oligonucleotídeo modificado que direciona ApoCIII e um grupo conjugado, em que o oligonucleotídeo modificado consiste em 12 a 30 nucleosídeos ligados e compreende: Em certas modalidades, o oligonucleotídeo modificado com o grupo de conjugado consiste em 15 a 30, 18 a 24, 19 a 22, 13 a 25, 14 a 25, 15 a 25 nucleosídeos ligados. Em certas modalidades, o oligonucleotídeo modificado com o grupo de conjugado compreende pelo menos 12, pelo menos 13, pelo menos 14, pelo menos 15, pelo menos 16, pelo menos 17, pelo menos 18, pelo menos 19, pelo menos 20, pelo menos 21, pelo menos 22, pelo menos 23, pelo menos 24, pelo menos 25, pelo menos 26, pelo menos 27, pelo menos 28, pelo menos 29 ou 30 nucleosídeos ligados. Em certas modalidades, o oligonucleotídeo modificado com o grupo de conjugado consiste em 20 nucleosídeos ligados.

[00237] Determinadas modalidades fornecem um composto que compreende oligonucleotídeo modificado com um grupo de conjugado que direciona ApoCIII e tem uma sequência complementar a quaisquer sequências estabelecidas no Acesso GENBANK Nº NM_000040.1 (incorporado a este documento como SEQ ID NO: 1; Acesso GENBANK NT_033899 truncado a partir de nucleotídeos 20262640 a 20266603 (incorporados aqui como SEQ ID NO: 2) e/ou Nº de Acesso GENBANK NT_035088 trucado a partir dos nucleotídeos 6238608 a 6242565 (incorporado a este documento como SEQ ID NO: 3). Em determinadas modalidades, o oligonucleotídeo modificado é pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos, 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 100% complementar a qualquer uma das SEQ ID NOs: 1-3. Em determinadas modalidades, o composto compreende um oligonucleotídeo modificado que direciona

ApoCIII e um grupo conjugado, em que o oligonucleotídeo modificado compreende pelo menos 8, pelo menos 9, pelo menos 10, pelo menos 11, pelo menos 12, pelo menos 13, pelo menos 14, pelo menos 15, pelo menos 16, 17, pelo menos, pelo menos 18, pelo menos 19 ou 20 nucleobases contíguas complementares a uma porção de comprimento equivalente de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1-3. Em determinadas modalidades, o composto compreende um oligonucleotídeo modificado que direciona segmento de ApoCIII e um grupo conjugado, em que o oligonucleotídeo modificado compreende pelo menos 8, pelo menos 9, pelo menos 10, pelo menos 11, pelo menos 12, pelo menos 13, pelo menos 14, pelo menos 15, pelo menos 16, 17, pelo menos, pelo menos 18, pelo menos 19 ou 20 nucleobases contíguas complementares a uma porção de quaisquer segmentos alvo mostrados nas Tabelas 121 e 124. Nas tabelas, "Sítio de Iniciação" se refere ao nucleotídeo 5'-terminal de um segmento alvo e um "Sítio de Parada" se refere ao nucleotídeo 3'-terminal de um segmento alvo. Um segmento alvo pode variar do sítio de iniciação ao sítio de parada de casa sequência listada nas tabelas. Alternativamente, o segmento alvo pode variar a partir do sítio de iniciação de uma sequência e extremidade no sítio de parada de outra sequência. Por exemplo, como mostrado nas tabelas, um segmento alvo pode variar de 3533 a 3522 o sítio de iniciação para o sítio de parada de SEQ ID NO: 87. Em outro exemplo, como mostrado nas tabelas, um segmento alvo pode variar de 3514 a 3558 o sítio de iniciação de SEQ ID NO: 83 para o sítio de parada de SEQ ID NO: 88. Em determinadas modalidades, o composto antissenso compreende pelo menos 8 nucleobases da sequência de SEQ ID NO: 87. Em determinadas modalidades, o composto antissenso compreende a sequência de SEQ ID NO: 87. Em determinadas modalidades, o composto antissenso consiste na sequência de SEQ ID NO: 87. Em determinadas modalidades, o composto antissenso é ISIS 304801.

[00238] Certas modalidades fornecem um composto compreendendo um oligonucleotídeo modificado que direciona ApoCIII e um grupo conjugado, em que a sequência de nucleobase do oligonucleotídeo modificado é pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou 100% complementar a alguma das SEQ ID NO: 1-3. Certas modalidades fornecem um composto compreendendo um oligonucleotídeo modificado que direciona ApoCIII e um grupo conjugado, em que a sequência de nucleobase do oligonucleotídeo modificado é pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou 100% complementar a algum dos segmentos alvo divulgados aqui.

[00239] Certas modalidades fornecem um composto compreendendo um oligonucleotídeo modificado que direciona ApoCIII e um grupo conjugado, em que o oligonucleotídeo modificado consiste em 12 a 30 nucleosídeos ligados e compreende uma sequência de nucleobase compreendendo uma porção de pelo menos 8, pelo menos 9, pelo menos 10, pelo menos 11, pelo menos 12, pelo menos 13, pelo menos 14, pelo menos 15, pelo menos 16, pelo menos 17, pelo menos 18, pelo menos 19, ou 20 nucleobases contíguas complementares a uma porção de comprimento igual das nucleobases 3533 a 3552 da SEQ NO: 3, em que a sequência de nucleobase do oligonucleotídeo modificado é pelo menos 80% complementar à SEQ ID NO: 3.

[00240] Certas modalidades fornecem um composto compreendendo um oligonucleotídeo modificado que direciona ApoCIII e um grupo conjugado, em que o oligonucleotídeo consiste em 12 a 30 nucleosídeos ligados e compreendendo uma sequência de nucleobase compreendendo uma porção de pelo menos 8, pelo menos 9, pelo menos 10, pelo menos 11, pelo menos 12, pelo menos 13, pelo menos 14, pelo menos 15, pelo menos 16, pelo menos 17, pelo menos 18, pelo menos 19, pelo menos 20, pelo menos 21, pelo menos 22, pelo menos 23, pelo menos 24, pelo menos 25, pelo menos 26, pelo menos 27, pelo

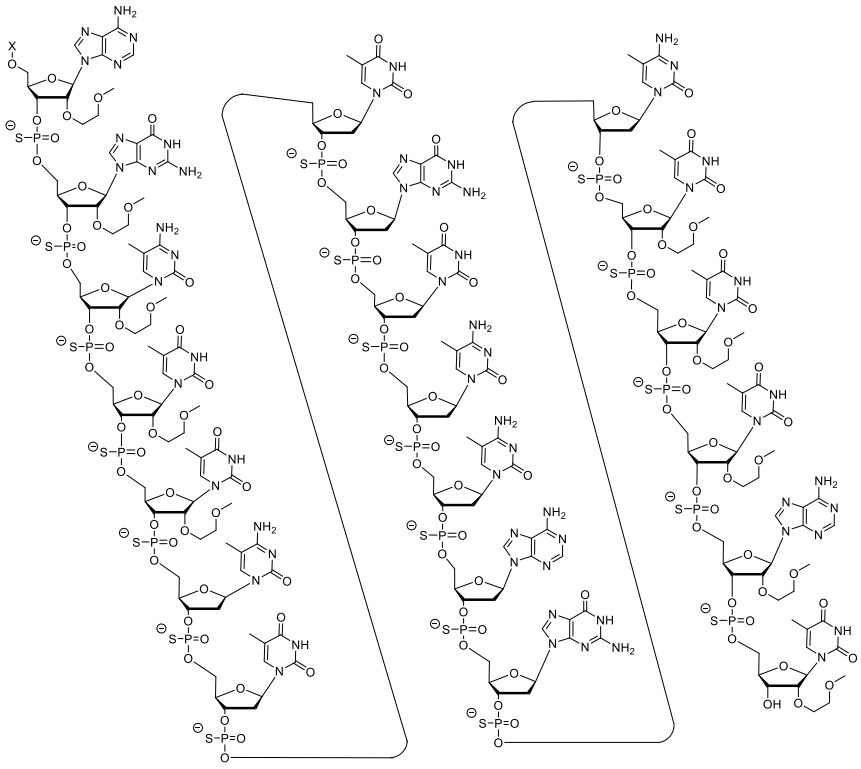
menos 28, pelo menos 29 ou 30 nucleobases contíguas complementares a uma porção de comprimento igual das nucleobases 3514 a 3558 de SEQ NO: 3, em que a sequência de nucleobase do oligonucleotídeo modificado é pelo menos 80% complementar à SEQ ID NO: 3.

[00241] Certas modalidades fornecem um composto compreendendo um oligonucleotídeo modificado que direciona ApoCIII e um grupo conjugado, em que o oligonucleotídeo modificado consiste em 12 a 30 nucleosídeos ligados e compreende uma sequência de nucleobase compreendendo uma porção de pelo menos 8, pelo menos 9, pelo menos 10, pelo menos 11, pelo menos 12, pelo menos 13, pelo menos 14, pelo menos 15, pelo menos 16, pelo menos 17, pelo menos 18, pelo menos 19, ou 20 nucleobases contíguas de quaisquer sequências de nucleobase da SEQ NOs: 19-96, 209-221. Em certas modalidades, o oligonucleotídeo modificado conjugado tem uma sequência de nucleobase compreendendo pelo menos 8 nucleobases contíguas de qualquer uma das sequências de nucleobase de SEQ ID NOs: 19-96, 209-221. Em determinadas modalidades, o composto consiste em quaisquer SEQ ID NOs: 19-96, 209-221 e um grupo conjugado.

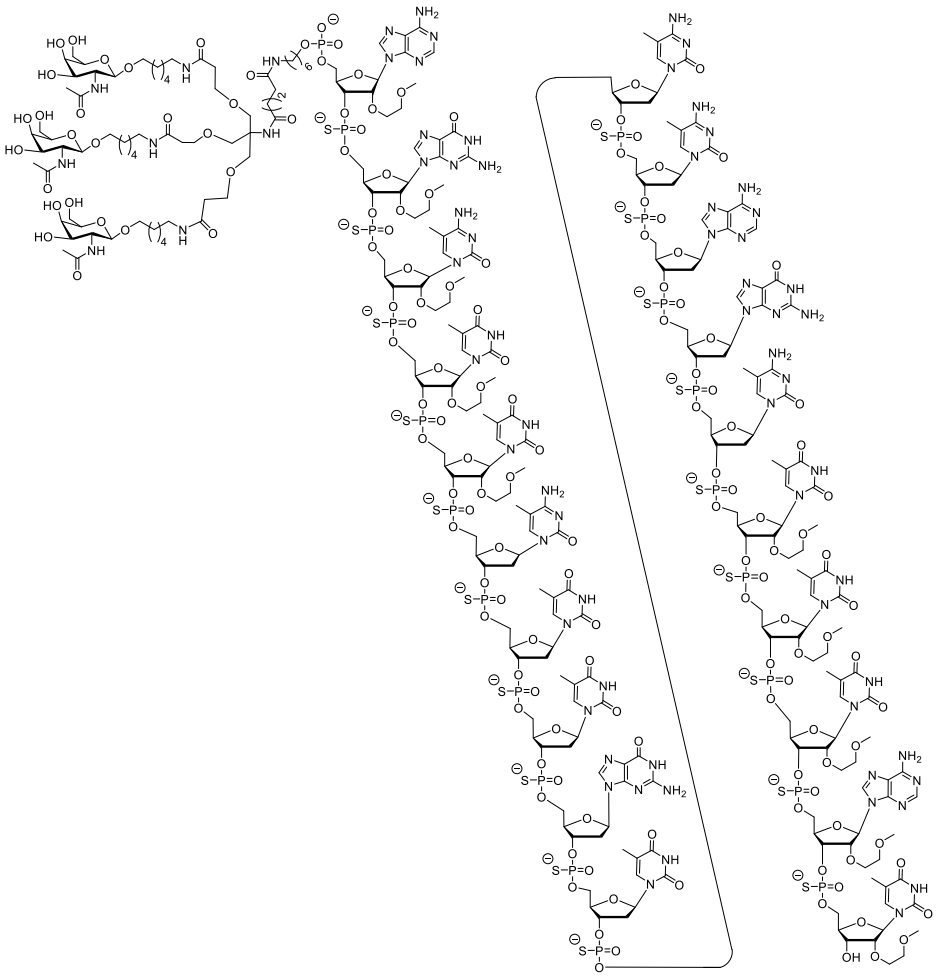
[00242] Certas modalidades fornecem um composto compreendendo um oligonucleotídeo modificado que direciona ApoCIII e um grupo conjugado, em que o oligonucleotídeo modificado consiste em 12 a 30 nucleosídeos ligados e compreende uma sequência de nucleobase compreendendo uma porção de pelo menos 8, pelo menos 9, pelo menos 10, pelo menos 11, pelo menos 12, pelo menos 13, pelo menos 14, pelo menos 15, pelo menos 16, pelo menos 17, pelo menos 18, pelo menos 19, ou 20 nucleobases contíguas de quaisquer sequências de nucleobase da SEQ NO: 87. Em certas modalidades, o oligonucleotídeo modificado com o grupo de conjugado tem uma sequência de nucleobase compreendendo pelo menos 8 nucleobases contíguas da sequência de nucleobase de SEQ ID NO: 87. Em determinadas modalidades,

o composto consiste em SEQ ID NO: 87 e um grupo conjugado.

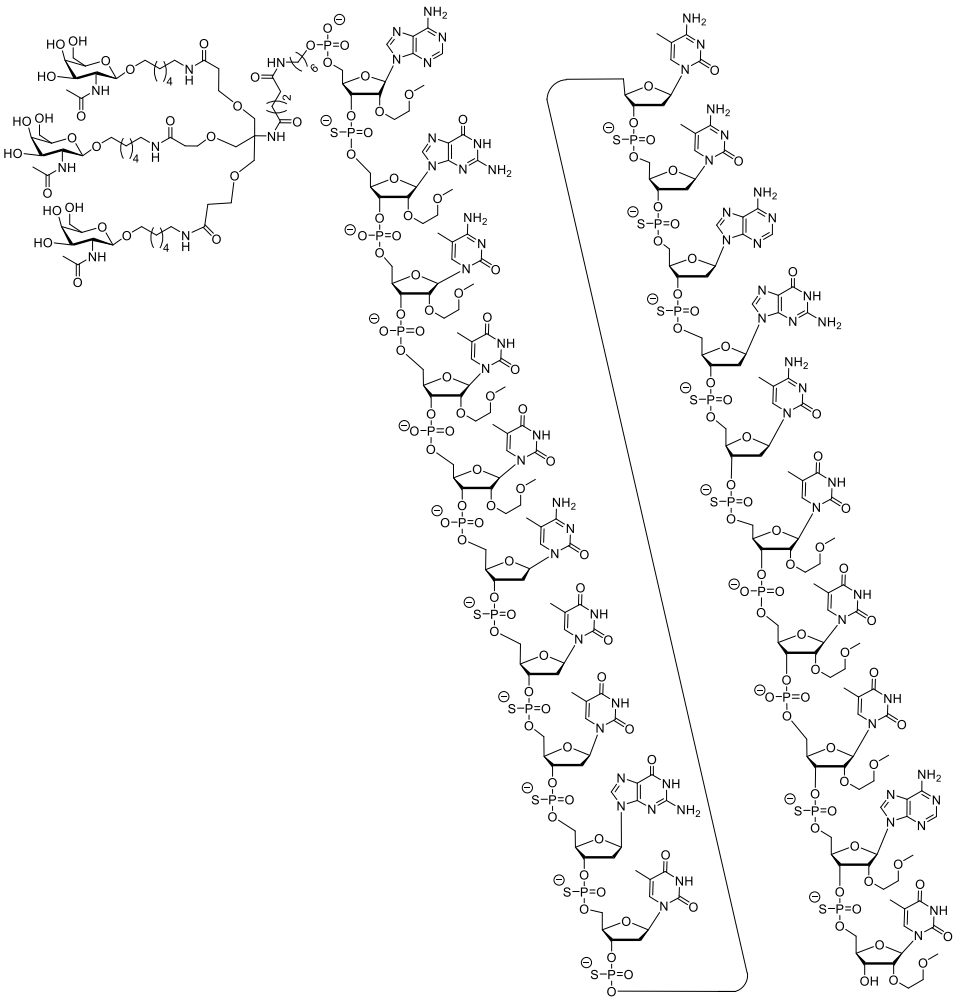
[00243] Em determinadas modalidades, a presente divulgação fornece compostos antissenso conjugados representados pela seguinte estrutura. Em determinadas modalidades, o composto antissenso compreende um oligonucleotídeo modificado ISIS 304801 com 5'-X, onde X é um grupo de conjugado que compreende GalNAc. Em determinadas modalidades, o composto antissenso consiste em um oligonucleotídeo modificado com ISIS 304801 com 5'-X, onde X é um grupo de conjugado que compreende GalNAc.



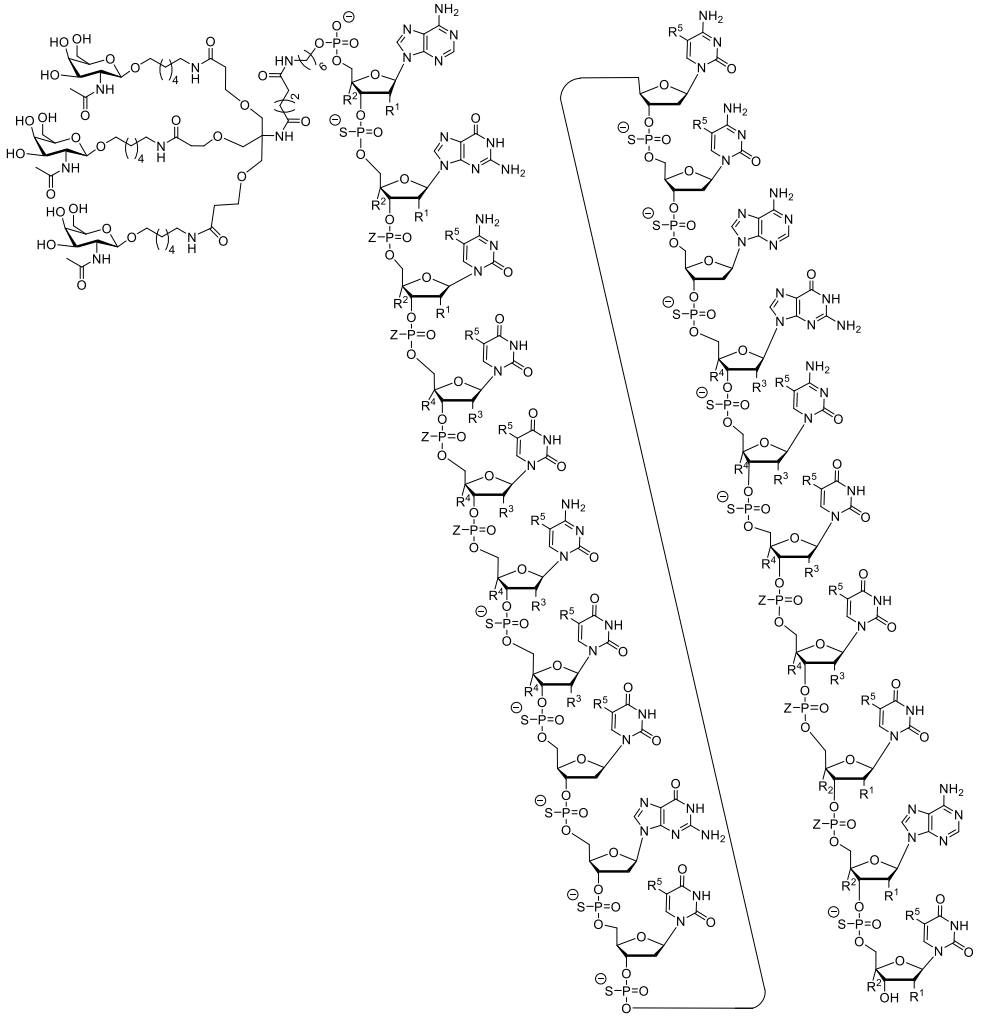
[00244] Em determinadas modalidades, a presente divulgação fornece compostos antissenso conjugados representados pela seguinte estrutura. Em determinadas modalidades, o composto antissenso compreende o oligonucleotídeo modificado conjugado ISIS 678354. Em determinadas modalidades, o composto antissenso consiste no oligonucleotídeo modificado conjugado ISIS 678354.



[00245] Em determinadas modalidades, a presente divulgação fornece compostos antissenso conjugados representados pela seguinte estrutura. Em determinadas modalidades, o composto antissenso compreende o oligonucleotídeo modificado conjugado ISIS 678357. Em determinadas modalidades, o composto antissenso consiste no oligonucleotídeo modificado conjugado ISIS 678357.



[00246] Em determinadas modalidades, a presente divulgação fornece compostos antissenso conjugados representados pela seguinte estrutura. Em determinadas modalidades, o composto antissenso compreende um oligonucleotídeo modificado com a sequência de nucleobase de SEQ ID NO: 87 com 5'-GalNAc com variabilidade no mods de açúcar das asas. Em determinadas modalidades, o composto antissenso consiste em um oligonucleotídeo modificado com a sequência de nucleobase de SEQ ID NO: 87 com 5'-GalNAc com variabilidade no mods de açúcar das asas.



[00247] onde R^1 é $-OCH_2CH_2OCH_3$ (MOE) e R^2 é H; ou R^1 e R^2 juntos formam uma ponte, onde R^1 é -O- eR^2 é $-CH_2-$, $-CH(CH_3)-$, ou $-CH_2CH_2-$, e R^1 e R^2 estão diretamente conectados de modo que a ponte resultante seja selecionada a partir de: $-O-CH_2-$, $-O-CH(CH_3)-$, e $-O-CH_2CH_2-$;

[00248] e para cada par de R^3 e R^4 no mesmo anel, independentemente para cada anel: qualquer R^3 seja selecionado de H e $-OCH_2CH_2OCH_3$ e R^4 seja H; ou R^3 e R^4, juntos, formem uma ponte, em que R^3 é -O-, e R^4 é $-CH_2-$, $-CH(CH_3)-$, ou $-CH_2CH_2-$ e R^3 e R^4 estão diretamente conectados, tal que a ponte resultante seja selecionada de: $-O-CH_2-$, $-O-CH(CH_3)-$, e $-O-CH_2CH_2-$;

[00249] e R5 seja selecionado de H e $-CH_3$;

[00250] e Z seja selecionado de S- e O-.

[00251] Certas modalidades fornecem um composto compreendendo um oligonucleotídeo modificado que direciona ApoCIII e um grupo conjugado, em que o oligonucleotídeo modificado tem fita simples.

[00252] Certas modalidades fornecem um composto compreendendo um oligonucleotídeo modificado que direciona ApoCIII e um grupo de conjugado em que pelo menos uma ligação internucleosídeos é uma ligação internucleosídea modificada. Em certas modalidades, a ligação internucleosídea modificada é uma ligação internucleosídea de fosforotioato. Em determinadas modalidades, pelo menos 1, pelo menos 2, pelo menos 3, pelo menos 4, pelo menos 5, 6, pelo menos, pelo menos 7, 8, pelo menos, pelo menos 9 ou pelo menos 10 ligações internucleosídeas do referido oligonucleotídeo modificado são ligações internucleosídeas de fosforotioato. Em certas modalidades, cada ligação internucleosídeos é uma ligação internucleosídeos de fosforotioato. Em determinadas modalidades, o oligonucleotídeo modificado compreende pelo menos 1, pelo menos 2, pelo menos 3, pelo menos 4, pelo menos 5, 6, pelo menos, pelo menos 7, 8, pelo menos, pelo menos 9 ou pelo menos 10 ligações internucleosídeas do referido oligonucleotídeo modificado são ligações internucleosídeas de fosforo fosforotioato. Em determinadas modalidades, cada ligação internucleosídica do oligonucleotídeo modificado é selecionada de uma ligação internucleosídica de fosfodiéster e uma ligação internucleosídica de fosforotioato.

[00253] Certas modalidades fornecem um composto compreendendo um oligonucleotídeo modificado que direciona ApoCIII e um grupo de conjugado em que pelo menos um nucleosídeo compreende uma ligação internucleosídea modificada. Em certas modalidades, a nucleobase modificada é uma 5-metilcitosina.

[00254] Certas modalidades fornecem um composto compreendendo um oligonucleotídeo modificado que direciona ApoCIII e grupo

conjugado, em que o oligonucleotídeo modificado compreende pelo menos um açúcar modificado. Em certas modalidades, o açúcar modificado é um açúcar bicíclico. Em certas modalidades, o açúcar modificado compreende uma 2'-O-metoxietila, uma etila restrita, um 3'-flúor-HNA ou uma ponte de 4'-$(CH_2)_n$-O-2', em que n é 1 ou 2.

[00255] Certas modalidades fornecem um composto compreendendo um oligonucleotídeo modificado que direciona ApoCIII e um grupo conjugado, em que o oligonucleotídeo modificado consiste em 12 a 30 nucleosídeos ligados e compreende: (a) um segmento de lacuna consistindo em desoxinucleosídeos ligados; (b) um segmento de asa 5' consistindo em nucleosídeos ligados; (c) um segmento de asa 3' consistindo em nucleosídeos ligados; e em que o segmento de lacuna é posicionado entre o segmento de asa 5' e o segmento de asa 3', em que cada nucleosídeo de cada segmento de asa compreende um açúcar modificado.

[00256] Certas modalidades fornecem um composto compreendendo um oligonucleotídeo modificado que direciona ApoCIII e um grupo conjugado, em que o oligonucleotídeo modificado consiste em 20 nucleosídeos ligados e compreende: (a) um segmento de lacuna consistindo em dez desoxinucleosídeos ligados; (b) um segmento de asa 5' consistindo em cinco nucleosídeos ligados; (c) um segmento de asa 3' consistindo em cinco nucleosídeos ligados; e em que o segmento de lacuna é posicionado entre o segmento de asa 5' e o segmento de asa 3', em que cada nucleosídeo de cada segmento de asa compreende um açúcar de 2'-O-metoxietila, em que cada ligação internucleosídeos é uma ligação de fosforotioato e em que cada resíduo de citosina é uma 5-metilcitosina.

[00257] Certas modalidades fornecem um composto compreendendo um oligonucleotídeo modificado que direciona ApoCIII e um grupo conjugado, em que o oligonucleotídeo modificado consiste em 20

nucleosídeos ligados e tem uma sequência de nucleobase compreendendo pelo menos 8 nucleobases contíguas de qualquer uma das SEQ ID NOs: 19-96, 209-221, em que o oligonucleotídeo modificado compreende: (a) um segmento de lacuna consistindo em dez desoxinucleosídeos ligados; (b) um segmento de asa 5' consistindo em cinco nucleosídeos ligados; (c) um segmento de asa 3' consistindo em cinco nucleosídeos ligados; e em que o segmento de lacuna é posicionado entre o segmento de asa 5' e o segmento de asa 3', em que cada nucleosídeo de cada segmento de asa compreende um açúcar de 2'-O-metoxietila, em que cada ligação internucleosídeos é uma ligação de fosforotioato e em que cada resíduo de citosina é uma 5-metilcitosina.

[00258] Certas modalidades fornecem um composto compreendendo um oligonucleotídeo modificado que direciona ApoCIII e um grupo conjugado, em que o oligonucleotídeo modificado consiste em 20 nucleosídeos ligados e tem uma sequência de nucleobase compreendendo pelo menos 8 nucleobases contíguas de qualquer uma das SEQ ID NO: 87, em que o oligonucleotídeo modificado compreende: (a) um segmento de lacuna consistindo em dez desoxinucleosídeos ligados; (b) um segmento de asa 5' consistindo em cinco nucleosídeos ligados; (c) um segmento de asa 3' consistindo em cinco nucleosídeos ligados; e em que o segmento de lacuna é posicionado entre o segmento de asa 5' e o segmento de asa 3', em que cada nucleosídeo de cada segmento de asa compreende um açúcar de 2'-O-metoxietila, em que cada ligação internucleosídeos é uma ligação de fosforotioato e em que cada resíduo de citosina é uma 5-metilcitosina.

[00259] Certas modalidades fornecem um oligonucleotídeo modificado que direciona ApoCIII e um grupo conjugado, em que o oligonucleotídeo modificado consiste em 20 nucleosídeos ligados com a sequência de nucleobase de SEQ ID NO: 87, em que o oligonucleotídeo modificado compreende: (a) um segmento de lacuna consistindo em dez

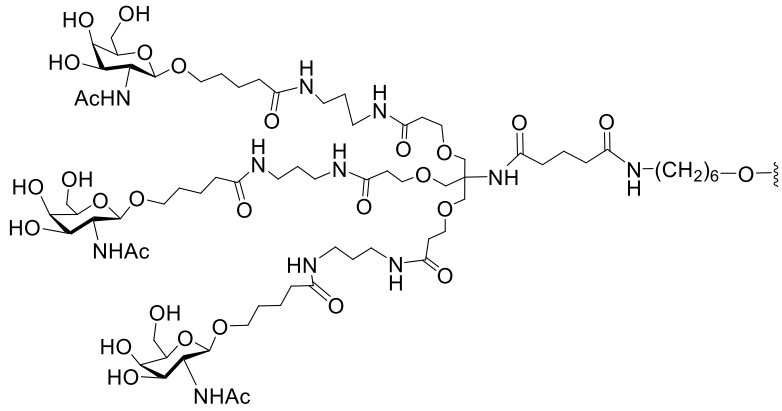
desoxinucleosídeos ligados; (b) um segmento de asa 5' consistindo em cinco nucleosídeos ligados; (c) um segmento de asa 3' consistindo em cinco nucleosídeos ligados; e em que o segmento de lacuna é posicionado entre o segmento de asa 5' e o segmento de asa 3', em que cada nucleosídeo de cada segmento de asa compreende um açúcar de 2'-O-metoxietila, em que cada ligação internucleosídeos é uma ligação de fosforotioato e em que cada resíduo de citosina é uma 5-metilcitosina.

[00260] Em certas modalidades, o grupo de conjugado está ligado ao oligonucleotídeo modificado na extremidade 5' do oligonucleotídeo modificado. Em certas modalidades, o grupo de conjugado está ligado ao oligonucleotídeo modificado na extremidade 3' do oligonucleotídeo modificado.

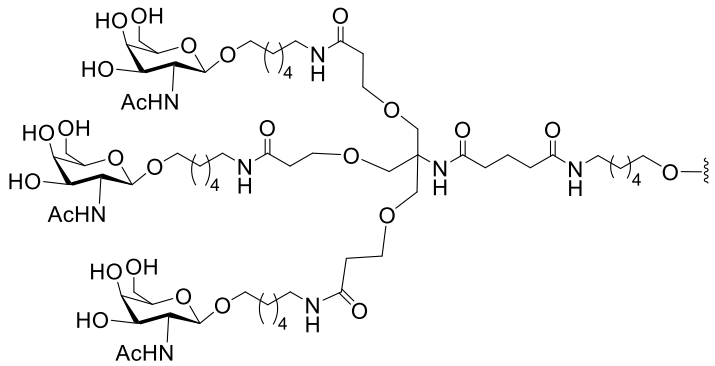
[00261] Em certas modalidades, o grupo de conjugado compreende exatamente um ligante. Em determinadas modalidades, um grupo de conjugado compreende um ou mais ligantes. Em certas modalidades, o grupo de conjugado compreende exatamente dois ligantes. Em determinadas modalidades, um grupo de conjugado compreende dois ou mais ligantes. Em determinadas modalidades, um grupo de conjugado compreende três ou mais ligantes. Em certas modalidades, o grupo de conjugado compreende exatamente três ligantes. Em certas modalidades, cada ligante é selecionado dentre: um polissacarídeo, polissacarídeo modificado, manose, galactose, um derivado de manose, um derivado de galactose, D-manopiranose, L-Manopiranose, D-Arabinose, L-Galactose, D-xilofuranose, L-xilofuranose, D-glicose, L-glicose, D-Galactose, L-Galactose, α-D-Manofuranose, β-D-Manofuranose, α-D-Manopiranose, β-D-Manopiranose, α-D-Glicopiranose, β-D-Glicopiranose, α-D-Glicofuranose, β-D-Glicofuranose, α-D-fructofuranose, α-D-fructopiranose, α-D-Galactopiranose, β -D-Galactopiranose, α-D-Galactofuranose, β -D-Galactofuranose, glicosamina, ácido siálico, α-D-galacto-

samina, N-Acetilgalactosamina, 2-Amino-3-O-[(R)-1-carboxietil]-2-desoxi-β-D-glicopiranose, 2-Desoxi-2-metilamino-L-glicopiranose, 4,6-Didesoxi-4-formamido-2,3-di-O-metil-D-manopiranose, 2-Desoxi-2-sulfoamino-D-glicopiranose, ácido N-Glicoloil-α-neuramínico, 5-tio-β-D-glicopiranose, 2,3,4-tri-O-acetil-1-tio-6-O-tritil-α-D-glicopiranosídeo de metila, 4-Tio-β-D-galactopiranose, 3,4,6,7-tetra-O-acetil-2-desoxi-1,5-ditio-α-D-glico-heptopiranosídeo de etila, 2,5-Anidro-D-alononitrila, ribose, D-ribose, D-4-tiorribose, L-ribose, L-4-tiorribose. Em determinadas modalidades, cada ligante é N-acetil galactosamina.

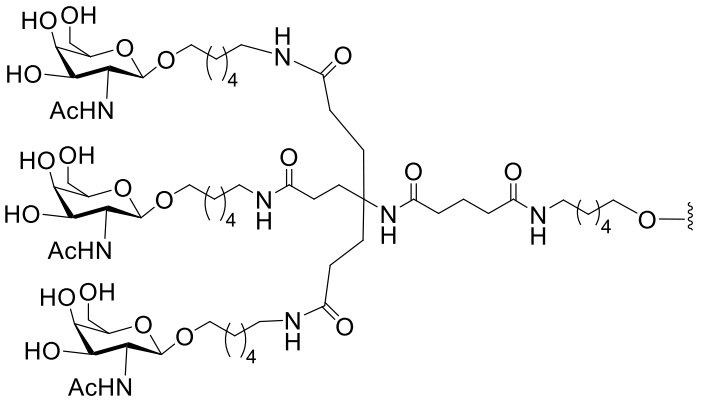
[00262] Em determinadas modalidades, o grupo de conjugado compreende:



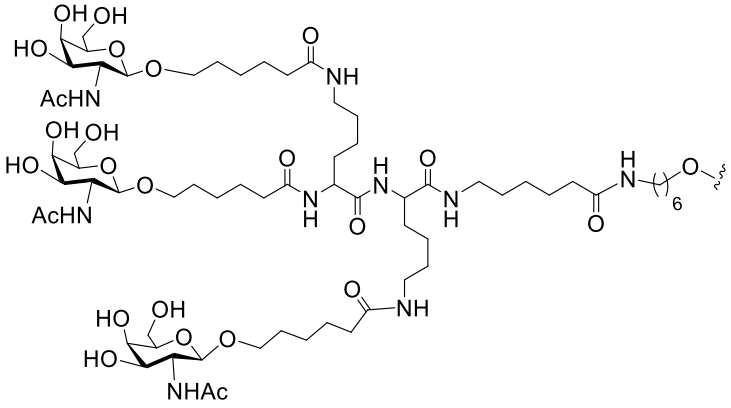
[00263] Em determinadas modalidades, o grupo de conjugado compreende:



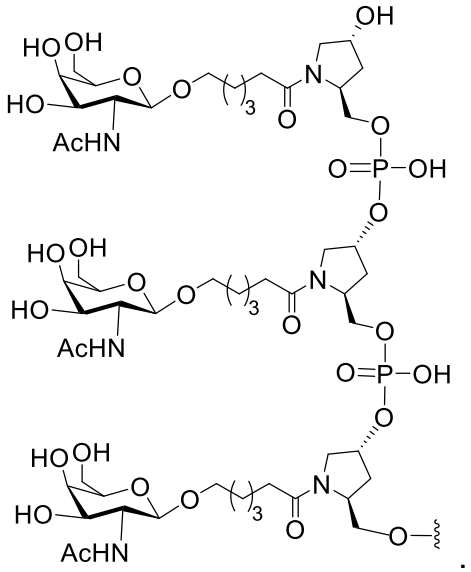
[00264] Em determinadas modalidades, o grupo de conjugado compreende:



[00265] Em determinadas modalidades, o grupo de conjugado compreende:



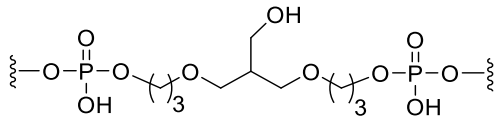
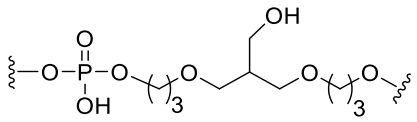
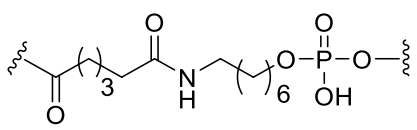
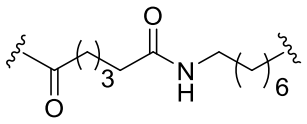
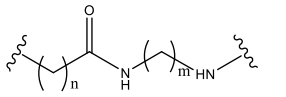
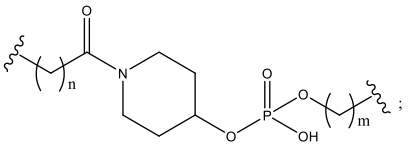
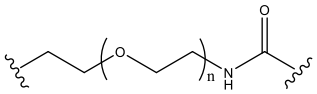
[00266] Em determinadas modalidades, o grupo de conjugado compreende:



[00267] Em determinadas modalidades, o grupo de conjugado compreende pelo menos um grupo de ligação fósforo ou grupo de ligação

neutro.

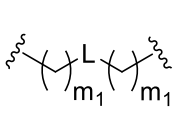
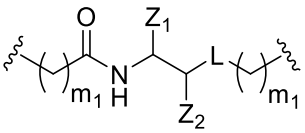
[00268] Em determinadas modalidades, um grupo de conjugado compreende uma estrutura selecionada entre os itens a seguir:


,


e

.

;

;

;

[00269] onde n é de 1 a 12; e

[00270] onde m é de 1 a 12.

[00271] Em determinadas modalidades, o grupo de conjugado tem um fixador com uma estrutura selecionada entre:


e


[00272] onde L é um grupo de ligação de fósforo ou um grupo de ligação neutro;

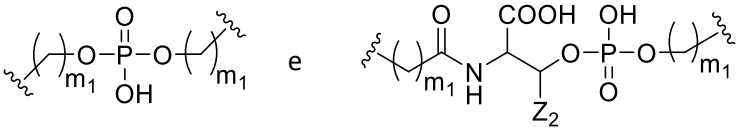
[00273] Z_1 é C(=O)O-R_2;

[00274] Z_2 é alquila H, C_1- C_6 ou alquila substituída C_1- C_6;

[00275] R_2 é H, C_1- C_6 ou alquila substituída C_1- C_6; e

[00276] cada m_1 é, independentemente, de 0 a 20, em que pelo menos um m_1 é maior que 0 para cada corrente.

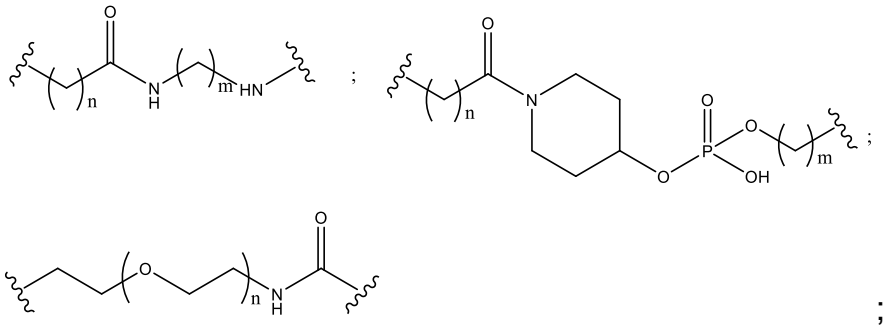
[00277] Em determinadas modalidades, o grupo de conjugado tem um fixador com uma estrutura selecionada entre:



[00278] em que Z_2 é H ou CH_3; e

[00279] cada m_1 é, independentemente, de 0 a 20, em que pelo menos um m_1 é maior que 0 para cada corrente.

[00280] Em determinadas modalidades, o grupo de conjugado tem um fixador com uma estrutura selecionada entre:



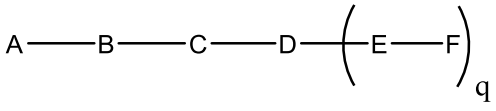
;

[00281] em que n é de 1 a 12; e

[00282] em que m é de 1 a 12.

[00283] Em determinadas modalidades, o grupo de conjugado está covalentemente anexado ao oligonucleotídeo modificado.

[00284] Em determinadas modalidades, o composto tem uma estrutura representada pela fórmula:



em que

[00285] A é o oligonucleotídeo modificado;

[00286] B é a porção clivável

[00287] C é o ligador do conjugado

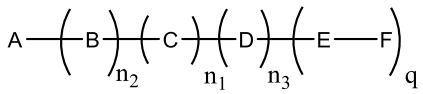
[00288] D é o grupo de ramificação

[00289] cada E é uma corrente;

[00290] cada F é um ligante; e

[00291] q é um número inteiro entre 1 e 5.

[00292] Em determinadas modalidades, o composto tem uma estrutura representada pela fórmula:



em que:

[00293] A é o oligonucleotídeo modificado;

[00294] B é a porção clivável

[00295] C é o ligador do conjugado

[00296] D é o grupo de ramificação

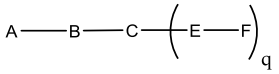
[00297] cada E é uma corrente;

[00298] cada F é um ligante;

[00299] cada n é, independentemente, 0 ou 1; e

[00300] q é um número inteiro entre 1 e 5.

[00301] Em determinadas modalidades, o composto tem uma estrutura representada pela fórmula:



em que

[00302] A é o oligonucleotídeo modificado;

[00303] B é a porção clivável;

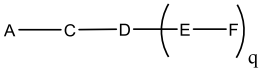
[00304] C é o ligador do conjugado;

[00305] cada E é uma corrente;

[00306] cada F é um ligante; e

[00307] q é um número inteiro entre 1 e 5.

[00308] Em determinadas modalidades, o composto tem uma estrutura representada pela fórmula:



em que

[00309] A é o oligonucleotídeo modificado;

[00310] C é o ligador do conjugado;

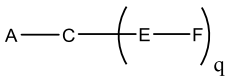
[00311] D é o grupo de ramificação;

[00312] cada E é uma corrente;

[00313] cada F é um ligante; e

[00314] q é um número inteiro entre 1 e 5.

[00315] Em determinadas modalidades, o composto tem uma estrutura representada pela fórmula:



em que

[00316] A é o oligonucleotídeo modificado;

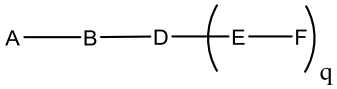
[00317] C é o ligador do conjugado;

[00318] cada E é uma corrente;

[00319] cada F é um ligante; e

[00320] q é um número inteiro entre 1 e 5.

[00321] Em determinadas modalidades, o composto tem uma estrutura representada pela fórmula:



em que

[00322] A é o oligonucleotídeo modificado;

[00323] B é a porção clivável;

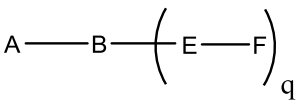
[00324] D é o grupo de ramificação;

[00325] cada E é uma corrente;

[00326] cada F é um ligante; e

[00327] q é um número inteiro entre 1 e 5.

[00328] Em determinadas modalidades, o composto tem uma estrutura representada pela fórmula:



em que

[00329] A é o oligonucleotídeo modificado;

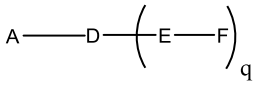
[00330] B é a porção clivável;

[00331] cada E é uma corrente;

[00332] cada F é um ligante; e

[00333] q é um número inteiro entre 1 e 5.

[00334] Em determinadas modalidades, o composto tem uma estrutura representada pela fórmula:



em que

[00335] A é o oligonucleotídeo modificado;

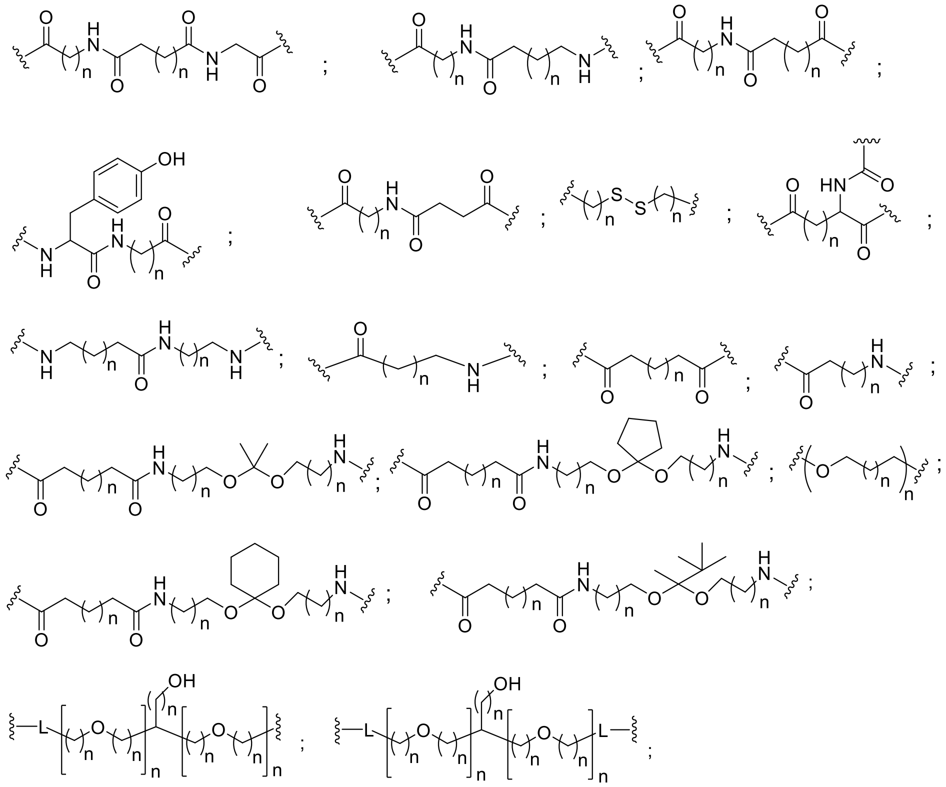
[00336] D é o grupo de ramificação;

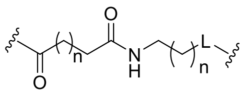
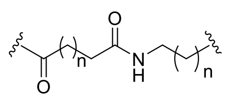
[00337] cada E é uma corrente;

[00338] cada F é um ligante; e

[00339] q é um número inteiro entre 1 e 5.

[00340] Em determinadas modalidades, um ligador do conjugado tem uma estrutura selecionada entre:

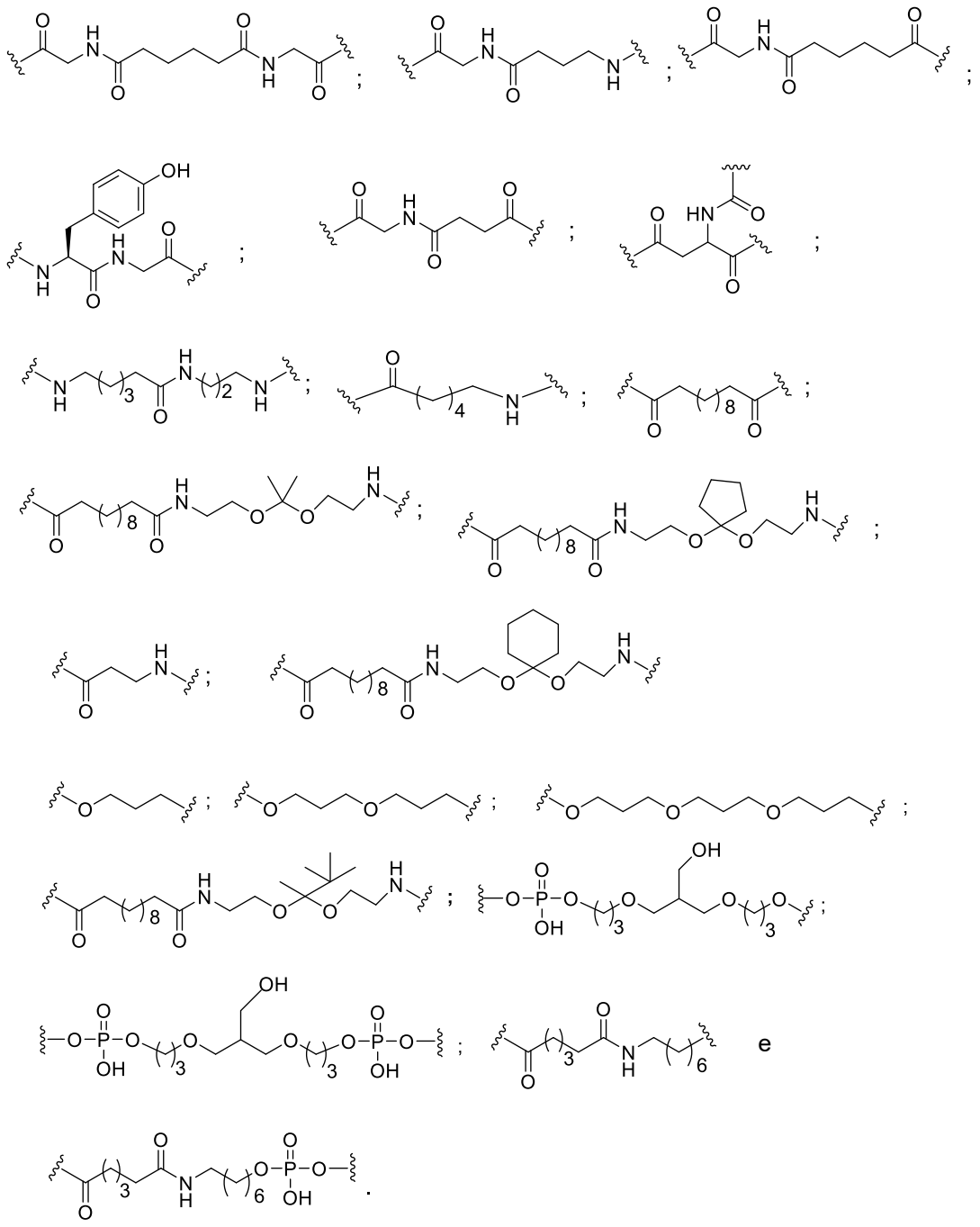


 e  .

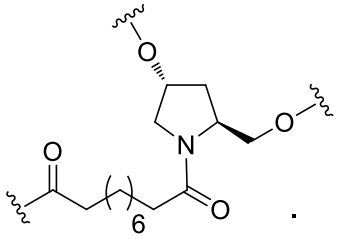
[00341] onde cada L é, independentemente, um grupo ligante fósforo ou um grupo ligante neutro; e

[00342] cada n é, independentemente, de 1 a 20.

[00343] Em determinadas modalidades, um ligador do conjugado tem uma estrutura selecionada entre:

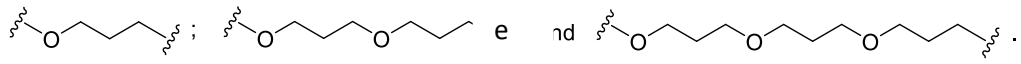


[00344] Em determinadas modalidades, o ligador do conjugado tem a seguinte estrutura:

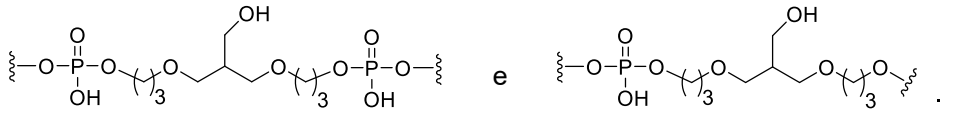


[00345] Em determinadas modalidades, um ligador do conjugado

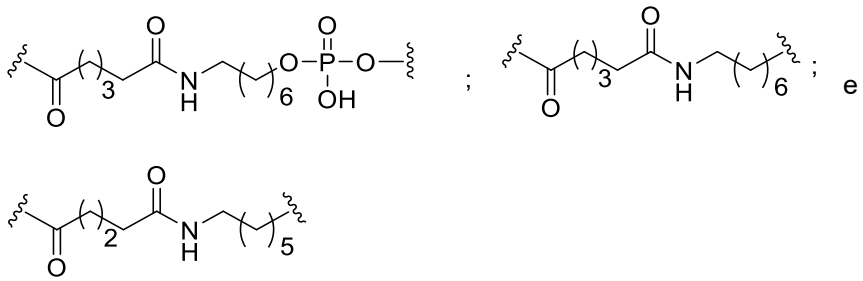
tem uma estrutura selecionada entre:



[00346] Em determinadas modalidades, um ligador do conjugado tem uma estrutura selecionada entre:



[00347] Em determinadas modalidades, um ligador do conjugado tem uma estrutura selecionada entre:



[00348] Em determinadas modalidades, ligador de conjugado compreende uma pirrolidina. Em determinadas modalidades, o ligador do conjugado não compreende uma pirrolidina.

[00349] Em determinadas modalidades, o ligador de conjugado compreende um PEG.

[00350] Em determinadas modalidades, o ligador de conjugado compreende uma amida. Em determinadas modalidades, o ligador de conjugado compreende pelo menos duas amidas. Em determinadas modalidades, o ligador de conjugado não compreende uma amida. Em determinadas modalidades, o ligador de conjugado compreende uma poliamida.

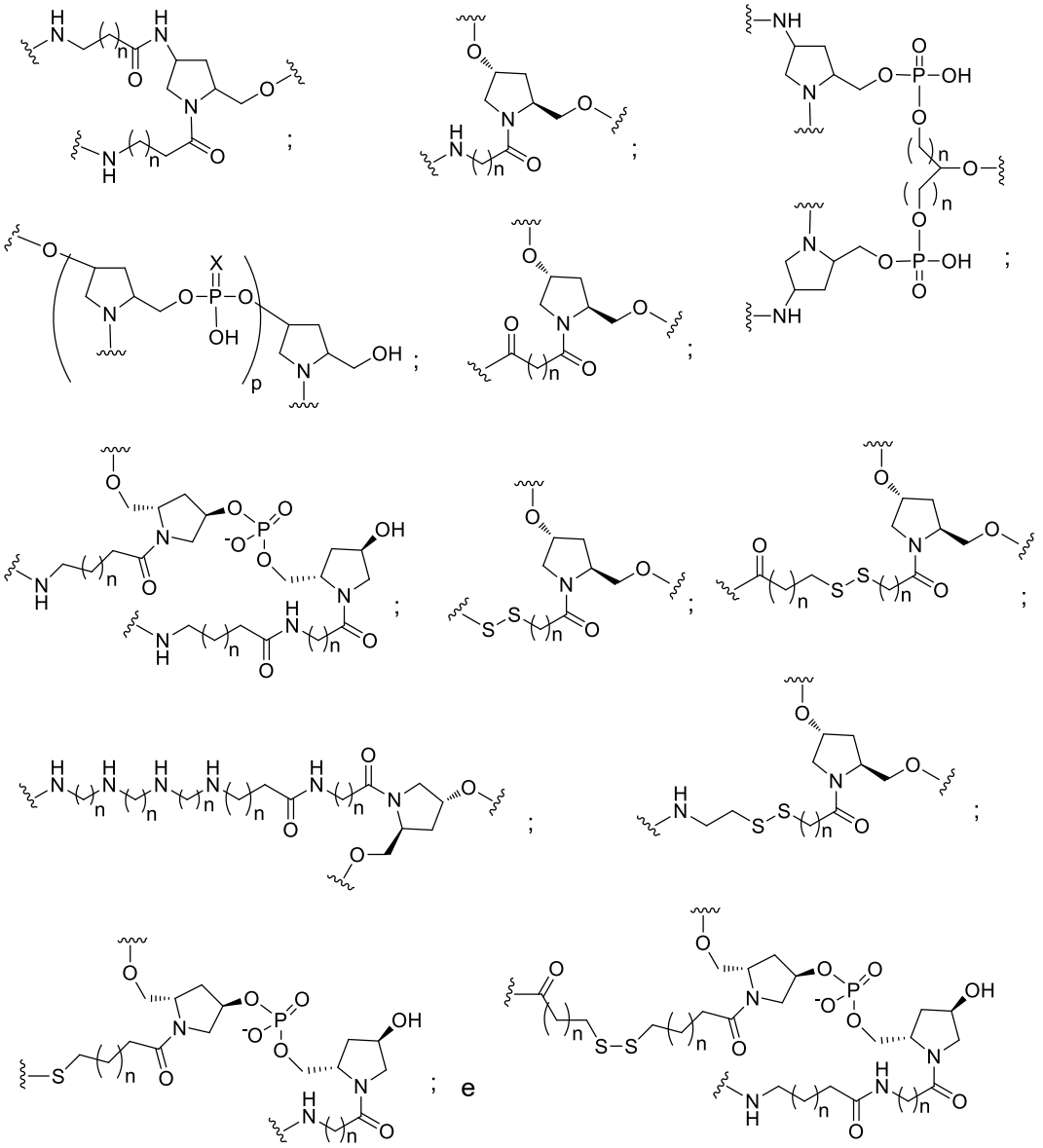
[00351] Em determinadas modalidades, o ligador de conjugado compreende uma amina.

[00352] Em determinadas modalidades, o ligador de conjugado compreende uma ou mais ligações de bissulfeto.

[00353] Em determinadas modalidades, o ligador de conjugado com-

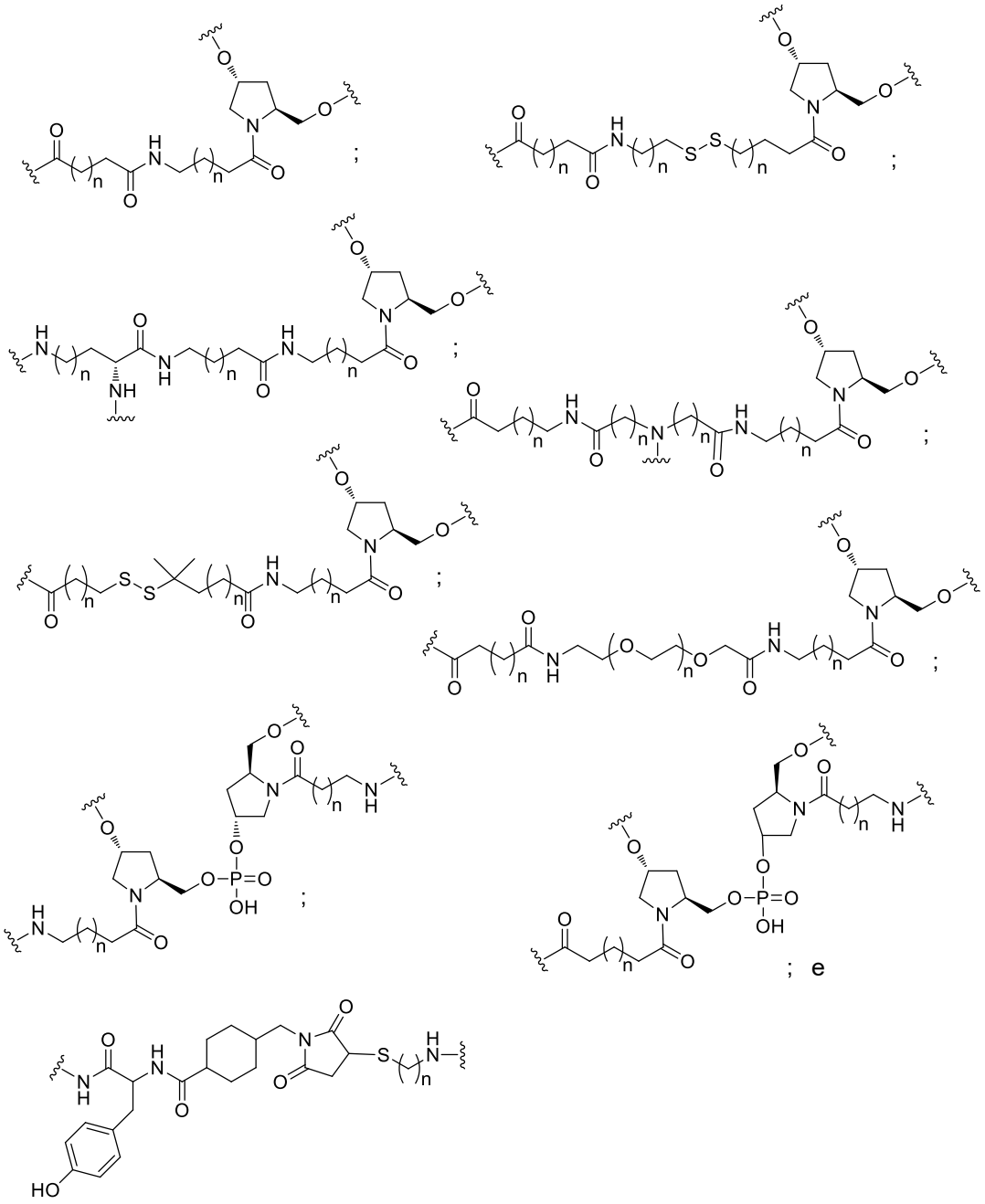
preende uma porção ligante de proteínas. Em determinadas modalidades, uma porção ligante de proteína compreende um lipídio. Em determinadas modalidades, a porção ligante de proteínas é selecionada dentre: colesterol, ácido cólico, ácido acético de adamantano, ácido 1-pireno butírico, di-hidrotestosterona, 1,3-Bis-O(hexadecil)glicerol, grupo geraniloxi-hexila, hexadecilglicerol, borneol, mentol, 1,3-propanodiol, grupo heptadecil, ácido palmítico, ácido mirístico, ácido O3-(oleoil)litocólico , ácido O3-(oleoil) colênico, dimetoxitritila ou fenoxazina), uma vitamina (por exemplo, folato, vitamina A, vitamina E, biotina, piridoxal), um peptídeo, um carboidrato (por exemplo, monossacarídeo, dissacarídeo, trissacarídeo, tetrassacarídeo, oligossacarídeo, polissacarídeo), um componente endossomolítico, um esteroide (por exemplo, uvaol, hecigenina, diosgenina), um terpeno (por exemplo, triterpeno, por exemplo, sarsasapogenina, friedelina, ácido litocólico derivatizado de epifriedelanol) ou um lipídio catiônico. Em determinadas modalidades, a porção ligante de proteínas é selecionada entre: um ácido graxo saturado ou insaturado de cadeia longa de C16 a C22, colesterol, ácido cólico, vitamina E, adamantano ou 1-pentafluoropropila.

[00354] Em determinadas modalidades, um ligador do conjugado tem uma estrutura selecionada entre:



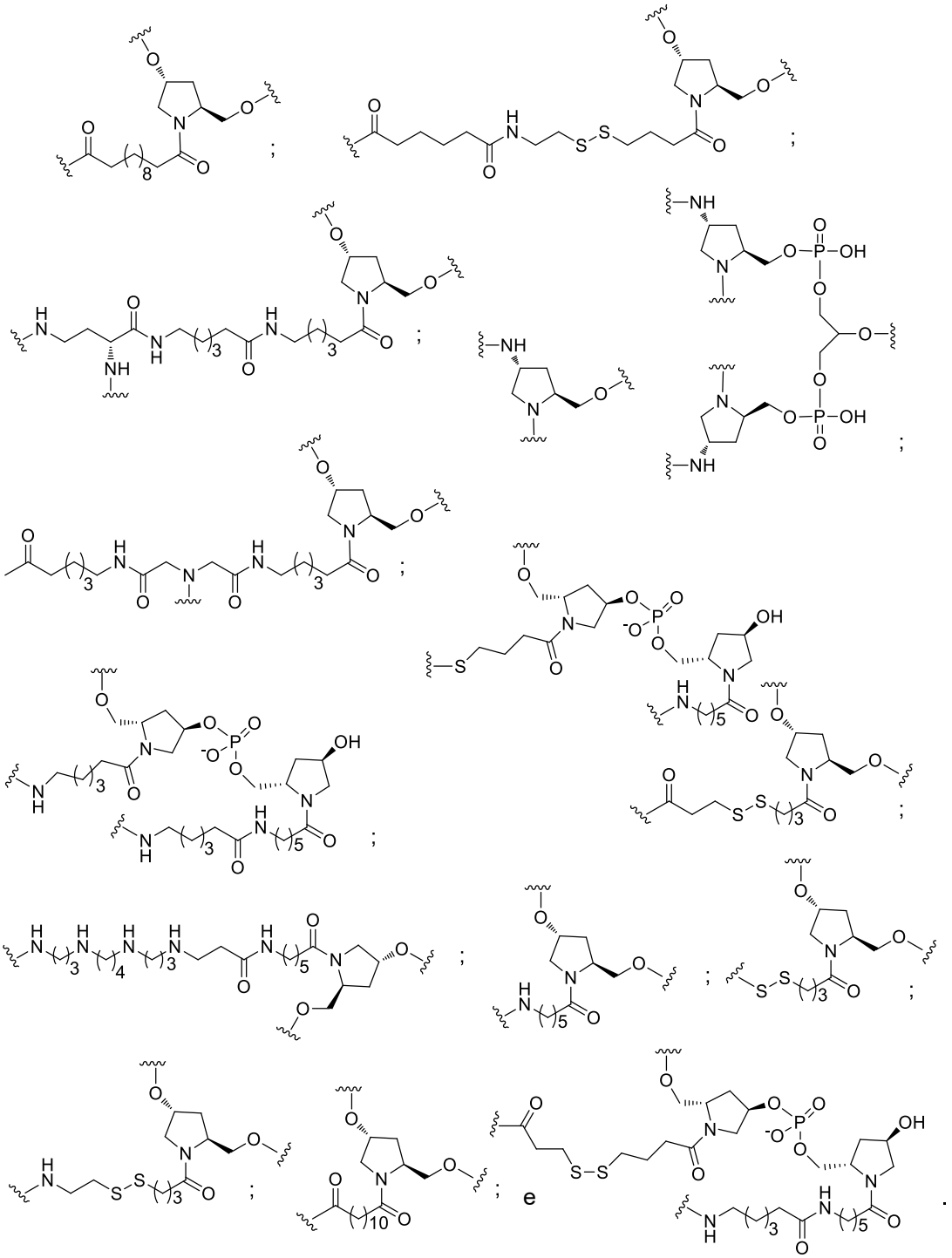
em que cada n é, independentemente, de 1 a 20; e p é de 1 a 6.

[00355] Em determinadas modalidades, um ligador do conjugado tem uma estrutura selecionada entre:

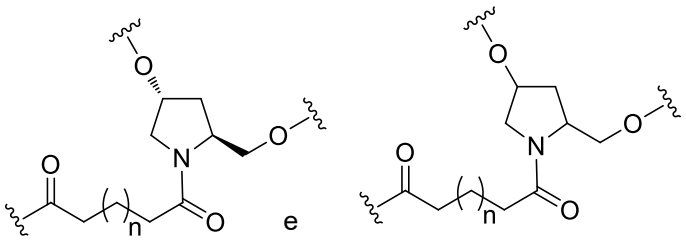


em que n é, independentemente, de 1 a 20.

[00356] Em determinadas modalidades, um ligador do conjugado tem uma estrutura selecionada entre:

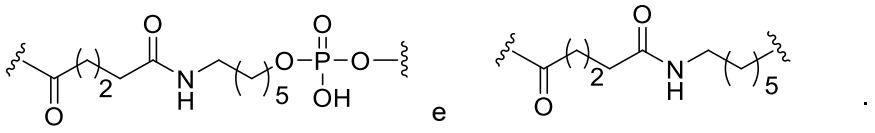


[00357] Em determinadas modalidades, um ligador do conjugado tem uma estrutura selecionada entre:

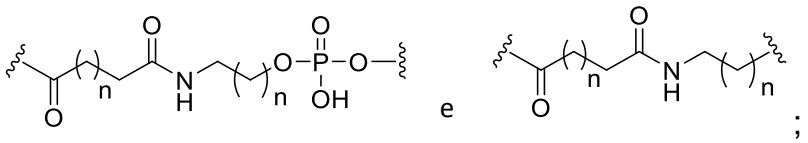


[00358] em que n é de 1 a 20.

[00359] Em determinadas modalidades, um ligador do conjugado tem uma estrutura selecionada entre:

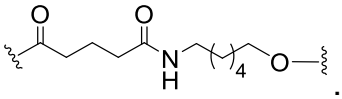
[00360]  .

[00361] Em determinadas modalidades, um ligador do conjugado tem uma estrutura selecionada entre:

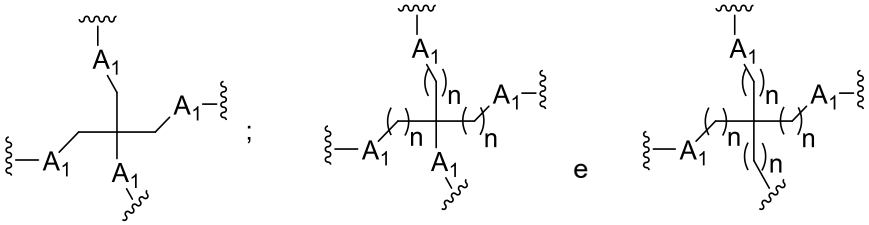
 ;

[00362] onde cada n é independentemente 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7.

[00363] Em determinadas modalidades, o ligador de conjugado tem a seguinte estrutura:

 .

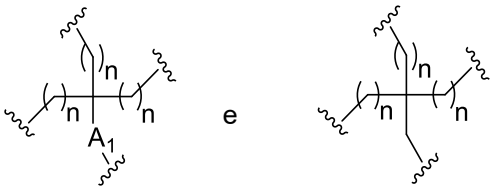
[00364] Em determinadas modalidades, o grupo de ramificação tem uma das seguintes estruturas:



[00365] em que cada A_1 é, independentemente, O, S, C=O ou NH; e

[00366] cada n é, independentemente, de 1 a 20.

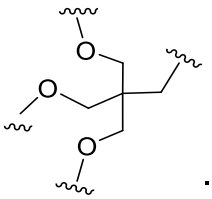
[00367] Em determinadas modalidades, o grupo de ramificação tem uma das seguintes estruturas:



[00368] em que cada A_1 é, independentemente, O, S, C=O ou NH; e

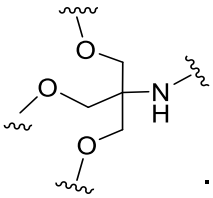
[00369] cada n é, independentemente, de 1 a 20.

[00370] Em determinadas modalidades, o grupo de ramificação tem a seguinte estrutura:



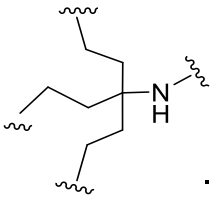
.

[00371] Em determinadas modalidades, o grupo de ramificação tem a seguinte estrutura:



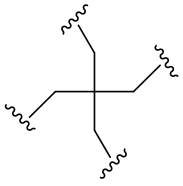
.

[00372] Em determinadas modalidades, o grupo de ramificação tem a seguinte estrutura:



.

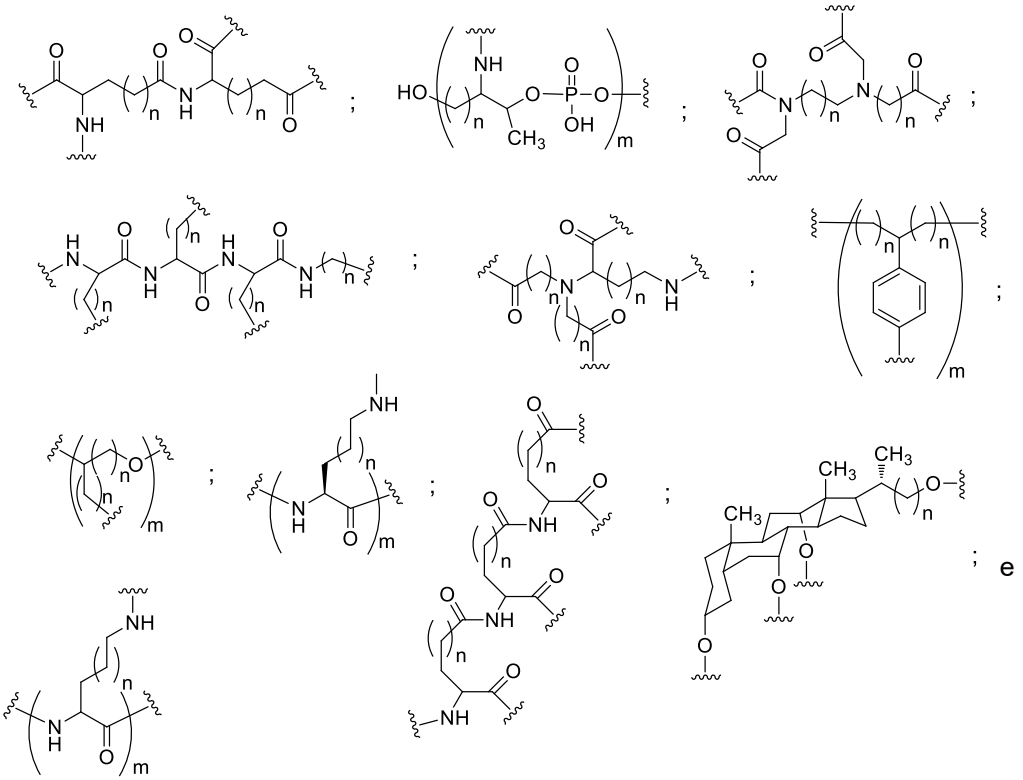
[00373] Em determinadas modalidades, o grupo de ramificação tem a seguinte estrutura:



.

[00374] Em determinadas modalidades, o grupo de ramificação compreende um éter.

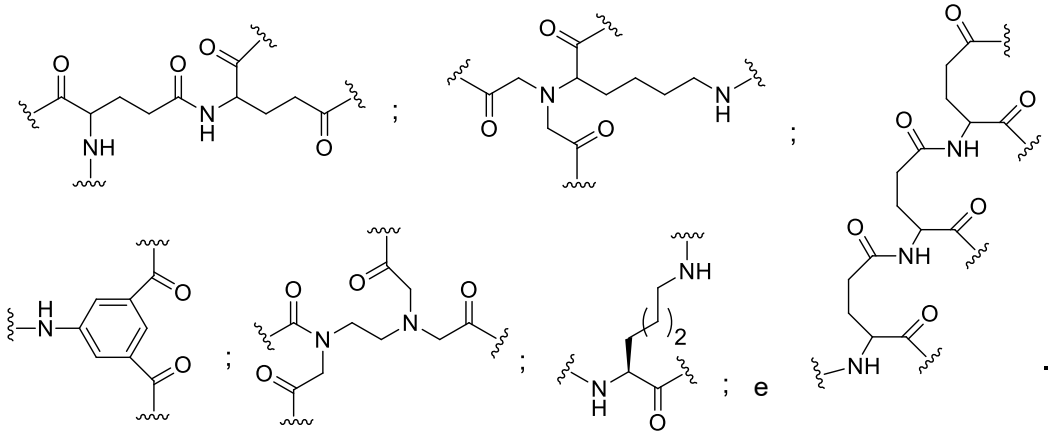
[00375] Em determinadas modalidades, o grupo de ramificação tem a seguinte estrutura:



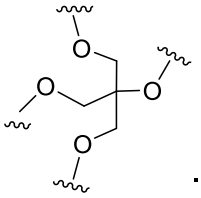
[00376] cada n é, independentemente, de 1 a 20; e

[00377] m é de 2 a 6.

[00378] Em determinadas modalidades, o grupo de ramificação tem a seguinte estrutura:

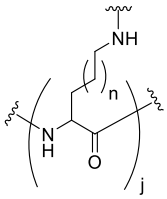


[00379] Em determinadas modalidades, o grupo de ramificação tem a seguinte estrutura:

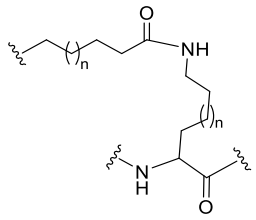


.

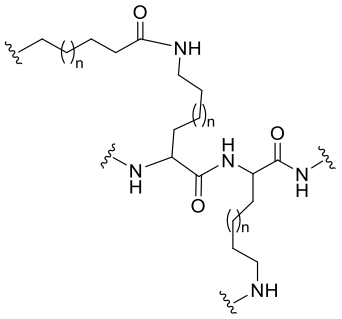
[00380] Em determinadas modalidades, o grupo de ramificação compreende:



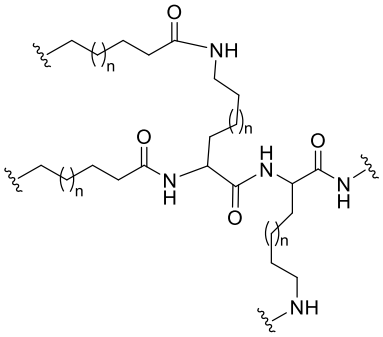
,



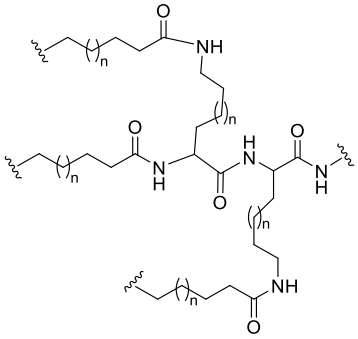
,



,



, ou

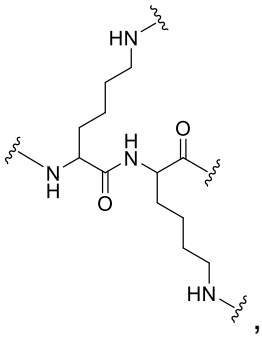


;

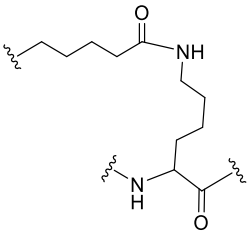
[00381] em que cada j é um número inteiro de 1 a 3; e

[00382] em que cada n é um número inteiro de 1 a 20.

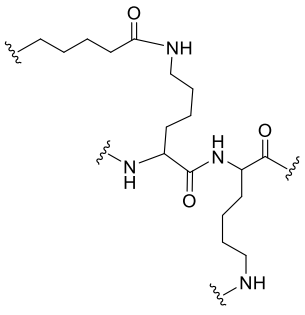
[00383] Em determinadas modalidades, o grupo de ramificação compreende:



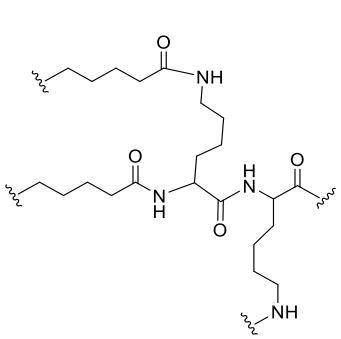
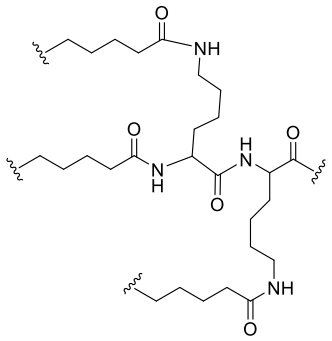
,



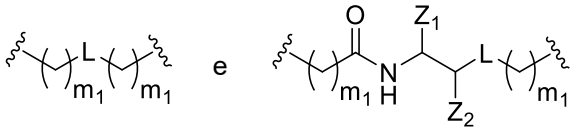
,



,


, ou 
.

[00384] Em determinadas modalidades, cada fixador é selecionado entre:



em que L é selecionado a partir de um grupo de ligação de fósforo e um grupo de ligação neutro;

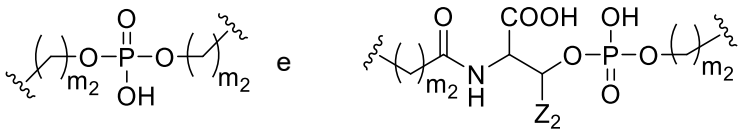
[00385] Z_1 é C(=O)O-R_2;

[00386] Z_2 é H, alquila C_1-C_6 ou alquila C_1-C_6 substituída;

[00387] R_2 é H, C_1- C_6 ou alquila substituída C_1- C_6; e

[00388] cada m_1 é, independentemente, de 0 a 20, em que pelo menos um m_1 é maior que 0 para cada corrente.

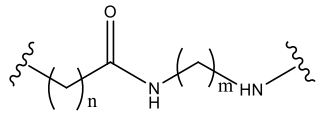
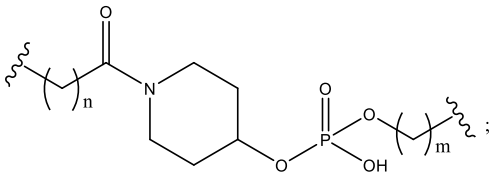
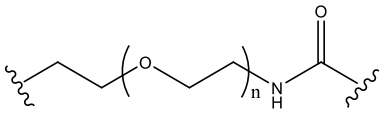
[00389] Em determinadas modalidades, cada fixador é selecionado entre:



[00390] em que Z_2 é H ou CH_3; e

[00391] cada m_2 é, independentemente, de 0 a 20, em que pelo menos um m_2 é maior que 0 para cada corrente.

[00392] Em determinadas modalidades, cada fixador é selecionado entre:


;

;

;

[00393] em que n é de 1 a 12; e

[00394] em que m é de 1 a 12.

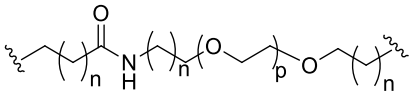
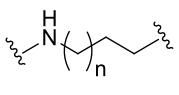
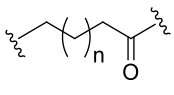
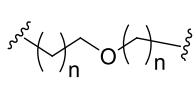
[00395] Em determinadas modalidades, pelo menos um fixador compreende etilenoglicol.

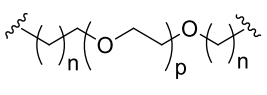
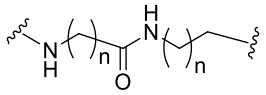
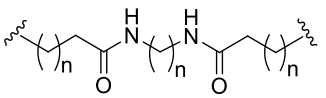
[00396] Em determinadas modalidades, cada fixador compreende uma amida. Em determinadas modalidades, pelo menos um fixador compreende uma poliamida.

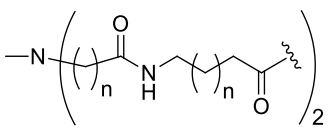
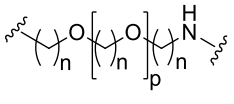
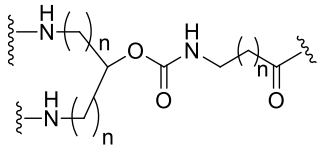
[00397] Em determinadas modalidades, cada fixador compreende uma amina.

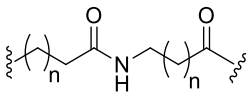
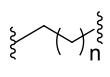
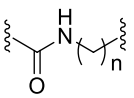
[00398] Em determinadas modalidades, pelo menos dois fixadores são diferentes um do outro. Em determinadas modalidades, todos os fixadores são os mesmos.

[00399] Em determinadas modalidades, cada fixador é selecionado entre:


;

;

;

;


;

;

;

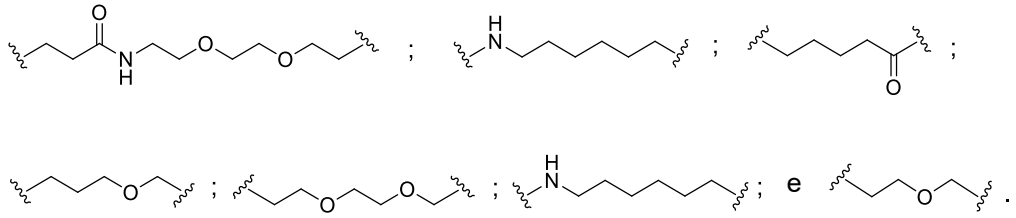

;

;

;


;

; a e


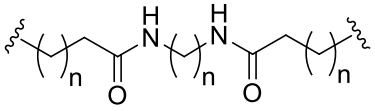
em que n é, independentemente, de 1 a 20; e

[00400] cada p é de 1 a cerca de 6.

[00401] Em determinadas modalidades, cada fixador é selecionado entre:

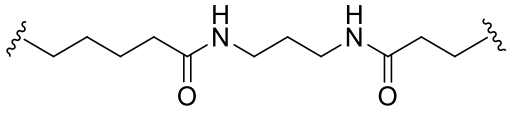


[00402] Em determinadas modalidades, cada fixador tem a seguinte estrutura:

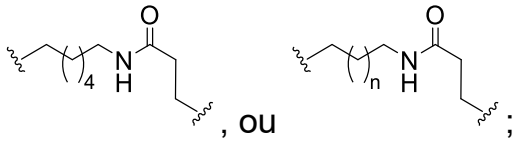


em que n é, independentemente, de 1 a 20.

[00403] Em determinadas modalidades, cada fixador tem a seguinte estrutura:

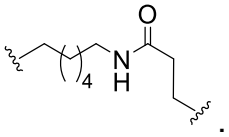


[00404] Em determinadas modalidades, o fixador tem uma estrutura selecionada entre:



em que cada n é, independentemente, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7.

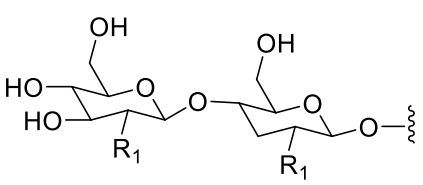
[00405] Em determinadas modalidades, o fixador tem uma estrutura selecionada entre:



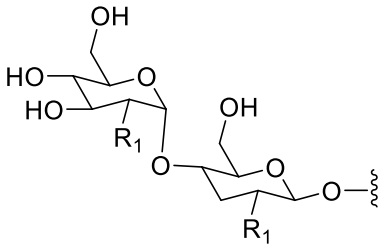
[00406] Em determinadas modalidades, o ligante é a galactose.

[00407] Em determinadas modalidades, o ligante é manose-6-fosfato.

[00408] Em determinadas modalidades, cada ligante é selecionado entre:

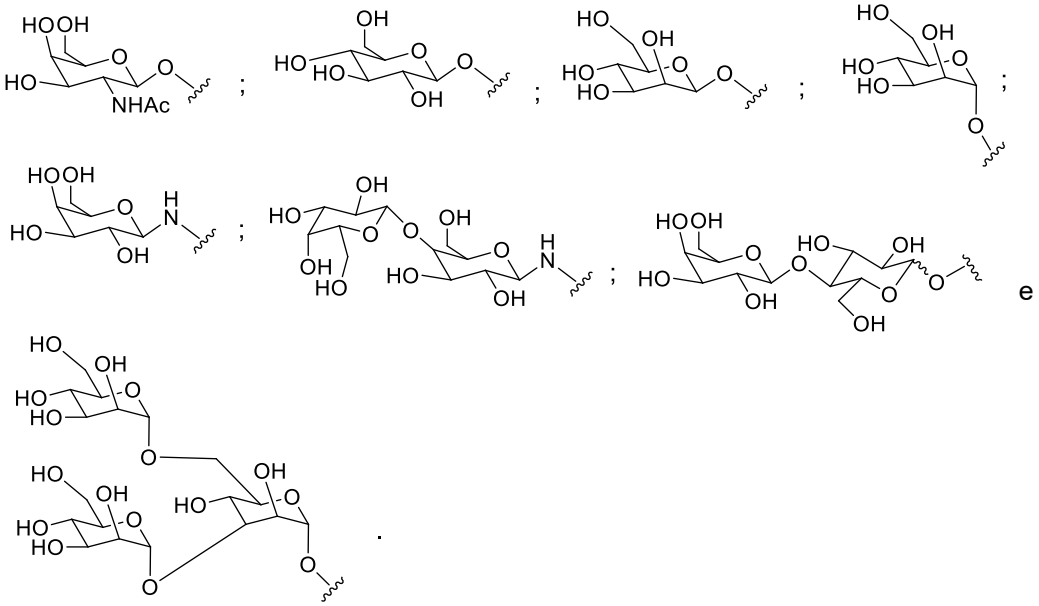


e



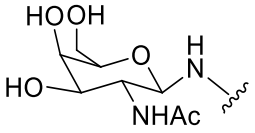
em que cada R_1 é selecionado de OH e NHCOOH.

[00409] Em determinadas modalidades, cada ligante é selecionado entre:



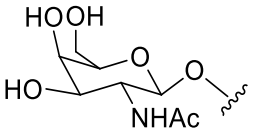
.

[00410] Em determinadas modalidades, cada ligante tem a seguinte estrutura:



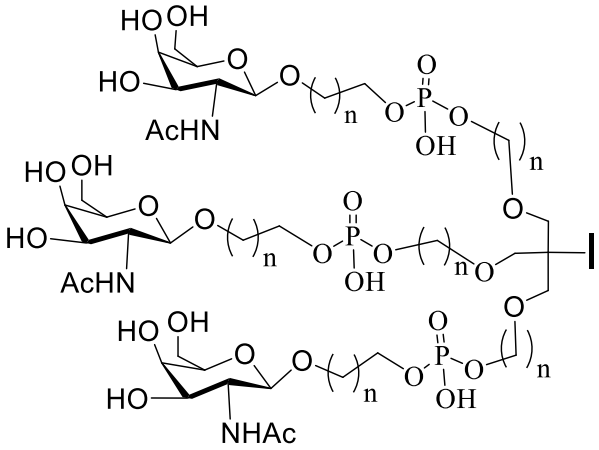
.

[00411] Em determinadas modalidades, cada ligante tem a seguinte estrutura:



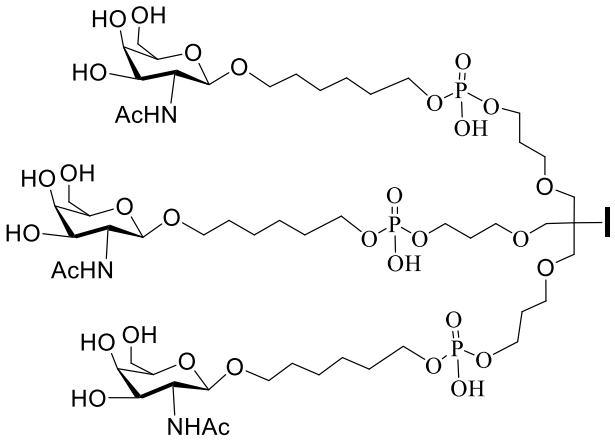
[00412] Em determinadas modalidades, o grupo de conjugado compreende uma porção de direcionamento de célula.

[00413] Em determinadas modalidades, o grupo de conjugado compreende uma porção de direcionado de célula com a seguinte estrutura:

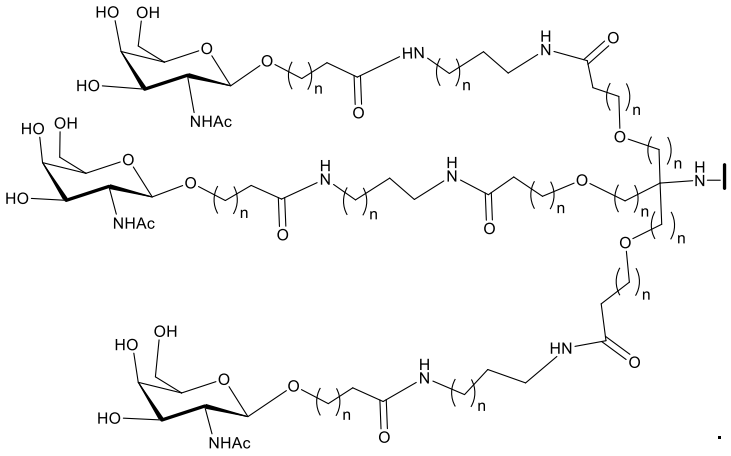


em que n é, independentemente, de 1 a 20.

[00414] Em determinadas modalidades, a porção de direcionamento de célula tem a seguinte estrutura:

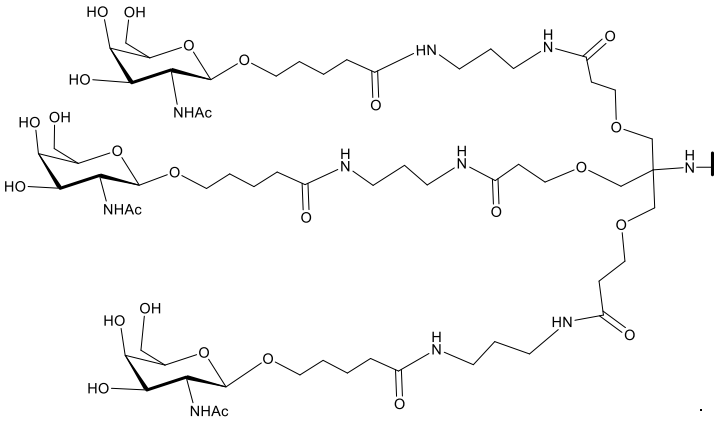


[00415] Em determinadas modalidades, a porção de direcionamento de célula tem a seguinte estrutura:

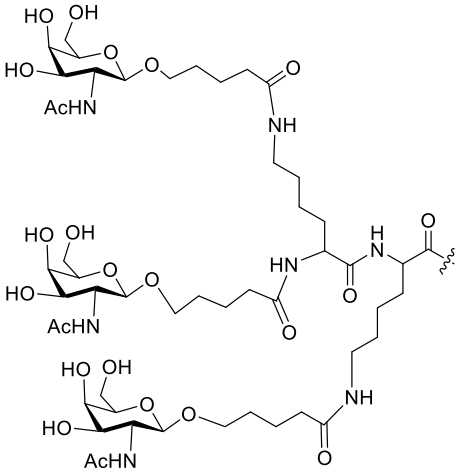


em que n é, independentemente, de 1 a 20.

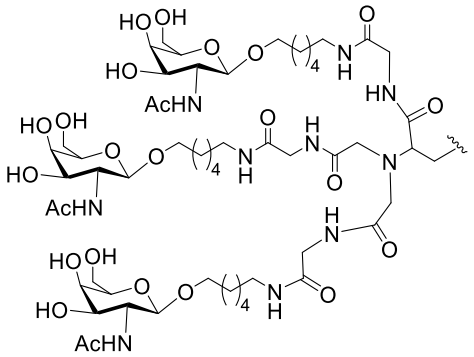
[00416] Em determinadas modalidades, a porção de direcionamento de célula tem a seguinte estrutura:



[00417] Em determinadas modalidades, a porção de direcionamento de célula compreende:

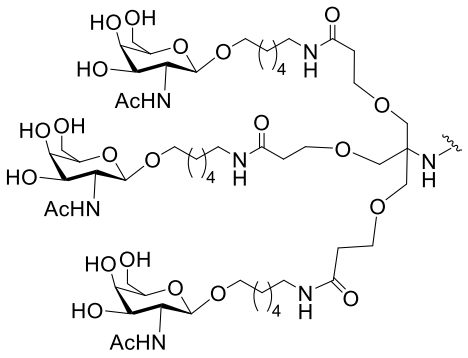


[00418] Em determinadas modalidades, a porção de direcionamento de célula compreende:



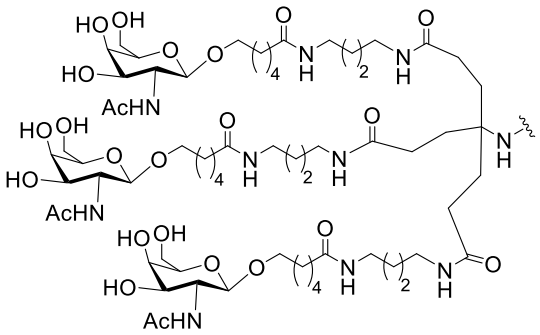
.

[00419] Em determinadas modalidades, a porção de direcionamento de célula tem a seguinte estrutura:



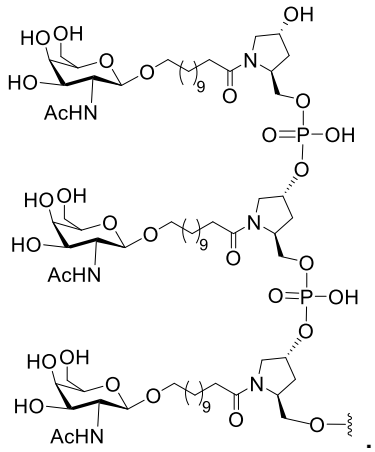
.

[00420] Em determinadas modalidades, a porção de direcionamento de célula tem a seguinte estrutura:

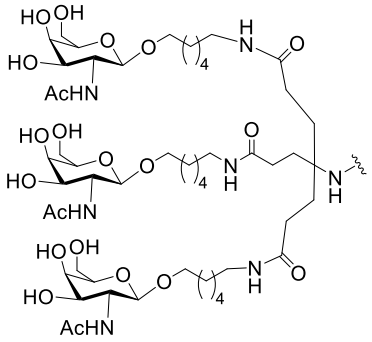


.

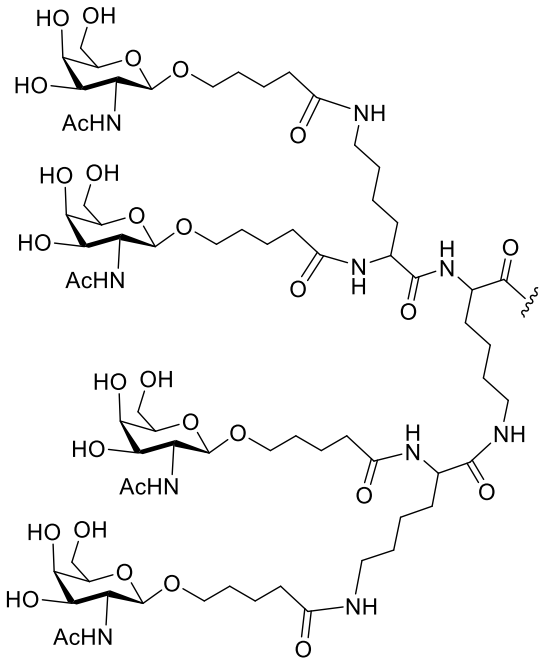
[00421] Em determinadas modalidades, a porção de direcionamento de célula compreende:



[00422] Em determinadas modalidades, a porção de direcionamento de célula tem a seguinte estrutura:



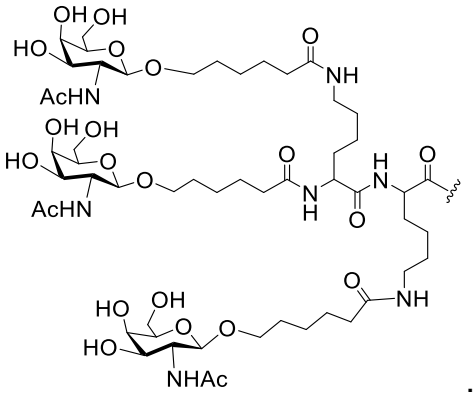
[00423] Em determinadas modalidades, a porção de direcionamento de célula compreende:



[00424] Em determinadas modalidades, a porção de direcionamento

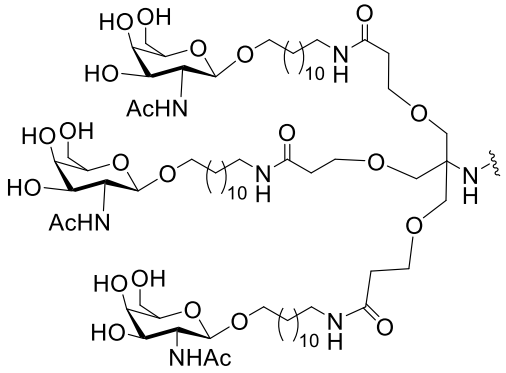
de célula compreende:

[00425] Em determinadas modalidades, a porção de direcionamento de célula compreende:



.

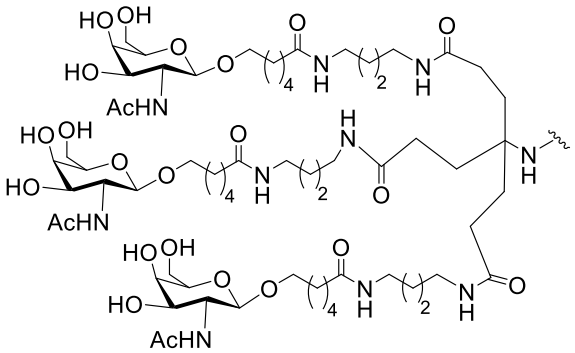
[00426] Em determinadas modalidades, a porção de direcionamento de célula tem a seguinte estrutura:



.

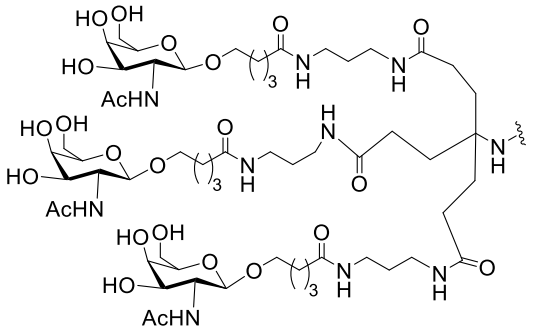
[00427] Em determinadas modalidades, a porção de direcionamento de célula tem a seguinte estrutura:

[00428] Em determinadas modalidades, a porção de direcionamento de célula tem a seguinte estrutura:

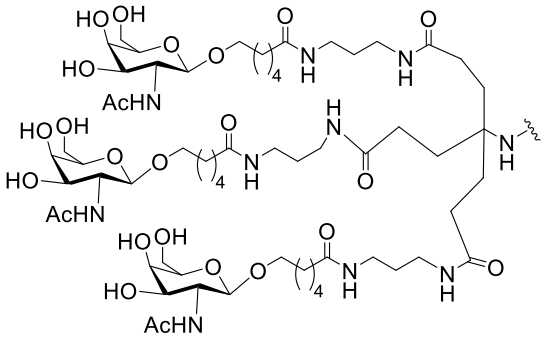


[00429] Em determinadas modalidades, a porção de direcionamento

de célula tem a seguinte estrutura:

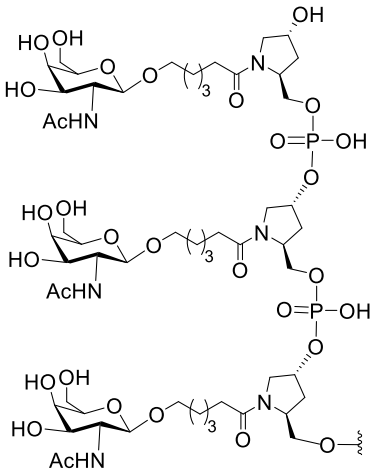


[00430] Em determinadas modalidades, a porção de direcionamento de célula tem a seguinte estrutura:

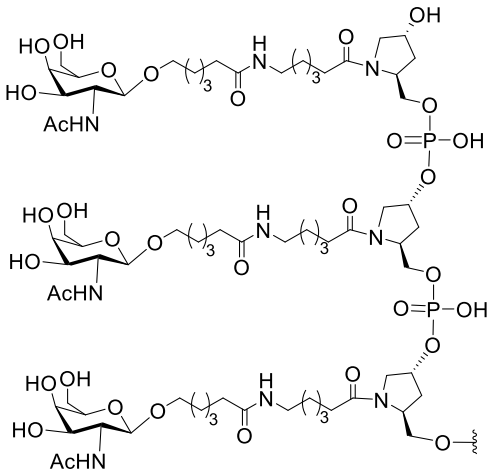


.

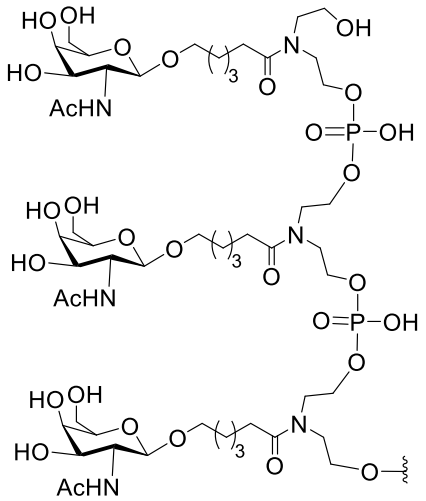
[00431] Em determinadas modalidades, a porção de direcionamento de célula compreende:



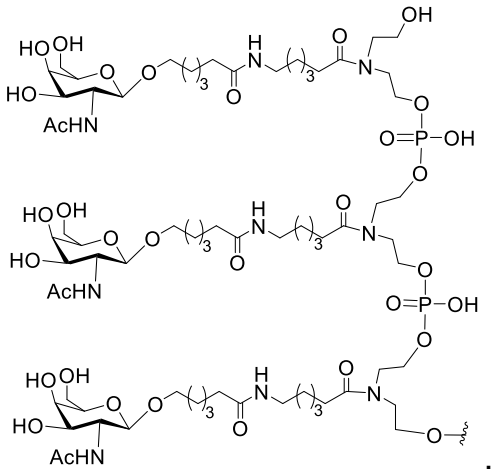
[00432] Em determinadas modalidades, a porção de direcionamento de célula compreende:



[00433] Em determinadas modalidades, a porção de direcionamento de célula compreende:



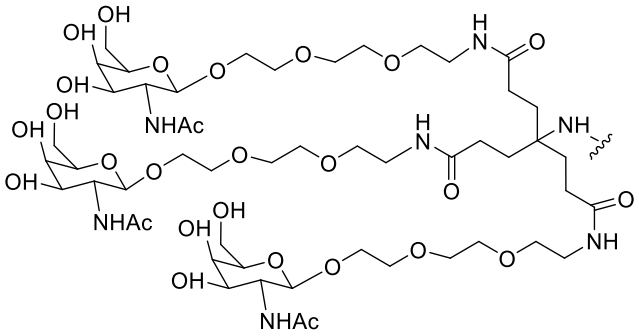
[00434] Em determinadas modalidades, a porção de direcionamento de célula compreende:



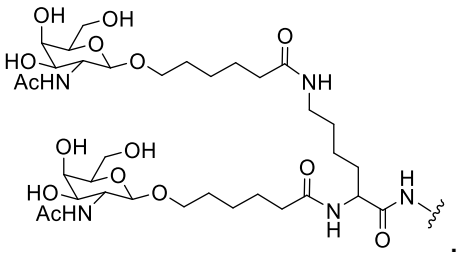
.

[00435] Em determinadas modalidades, a porção de direcionamento

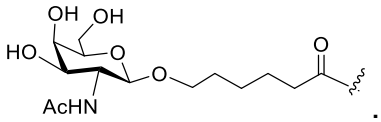
de célula tem a seguinte estrutura:



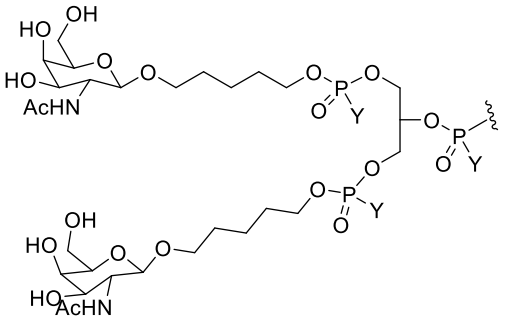
[00436] Em determinadas modalidades, a porção de direcionamento de célula compreende:



[00437] Em determinadas modalidades, a porção de direcionamento de célula tem a seguinte estrutura:

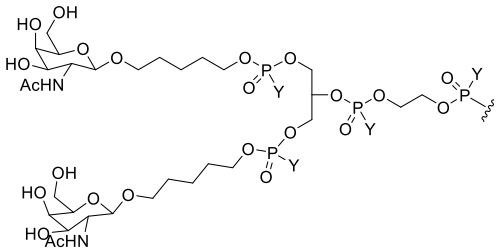


[00438] Em determinadas modalidades, a porção de direcionamento de célula compreende:



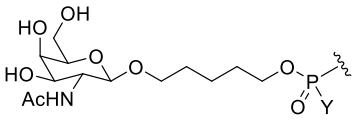
[00439] em que cada Y é selecionado de O, S, uma alquila C_1-C_{10} substituída ou não substituída, amino, amino substituído, azido, alquenila ou alquinila.

[00440] Em determinadas modalidades, o grupo de conjugado compreende:



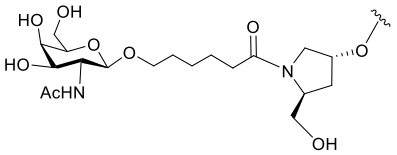
[00441] em que cada Y é selecionado de O, S, uma alquila C_1-C_{10} substituída ou não substituída, amino, amino substituído, azido, alquenila ou alquinila.

[00442] Em determinadas modalidades, a porção de direcionamento de célula tem a seguinte estrutura:

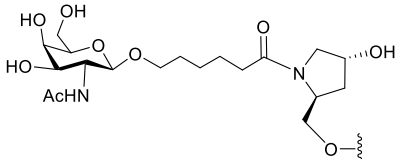


[00443] em que cada Y é selecionado de O, S, uma alquila C_1-C_{10} substituída ou não substituída, amino, amino substituído, azido, alquenila ou alquinila.

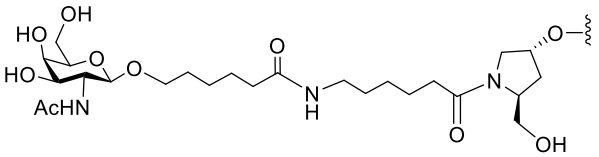
[00444] Em determinadas modalidades, o grupo de conjugado compreende:



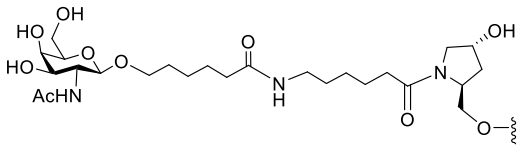
[00445] Em determinadas modalidades, o grupo de conjugado compreende:



[00446] Em determinadas modalidades, o grupo de conjugado compreende:



[00447] Em determinadas modalidades, o grupo de conjugado compreende:



[00448] Em determinadas modalidades, o grupo de conjugado compreende uma porção clivável selecionada entre: um fosfodiéster, uma amida ou um éster.

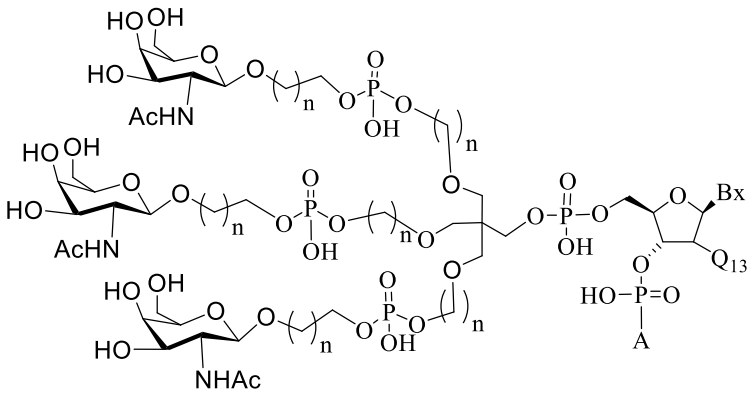
[00449] Em determinadas modalidades, o grupo de conjugado compreende uma porção clivável de fosfodiéster.

[00450] Em determinadas modalidades, o grupo do conjugado não compreende uma porção clivável, e em que o grupo do conjugado compreende uma ligação de fosforotioato entre o grupo do conjugado e o oligonucleotídeo.

[00451] Em determinadas modalidades, o grupo de conjugado compreende uma porção clivável de amida.

[00452] Em determinadas modalidades, o grupo de conjugado compreende uma porção clivável de éster.

[00453] Em determinadas modalidades, um composto tem a seguinte estrutura:



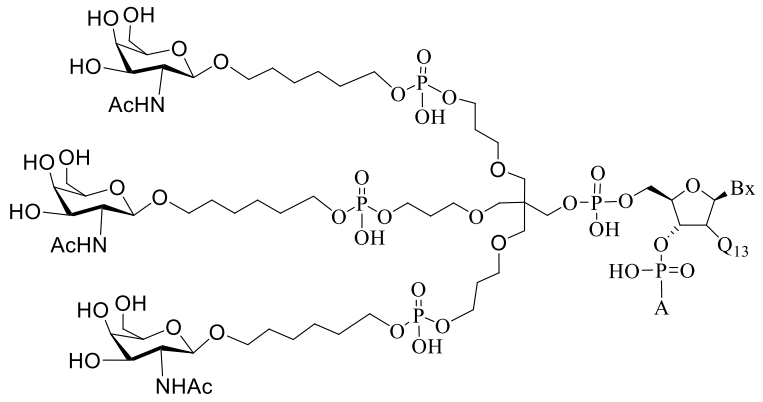
em que n é, independentemente, de 1 a 20;

[00454] Q_{13} é H ou $O(CH_2)_2$-OCH_3;

[00455] A é o oligonucleotídeo modificado; e

[00456] Bx é uma porção de base heterocíclica.

[00457] Em determinadas modalidades, um composto tem a seguinte estrutura:



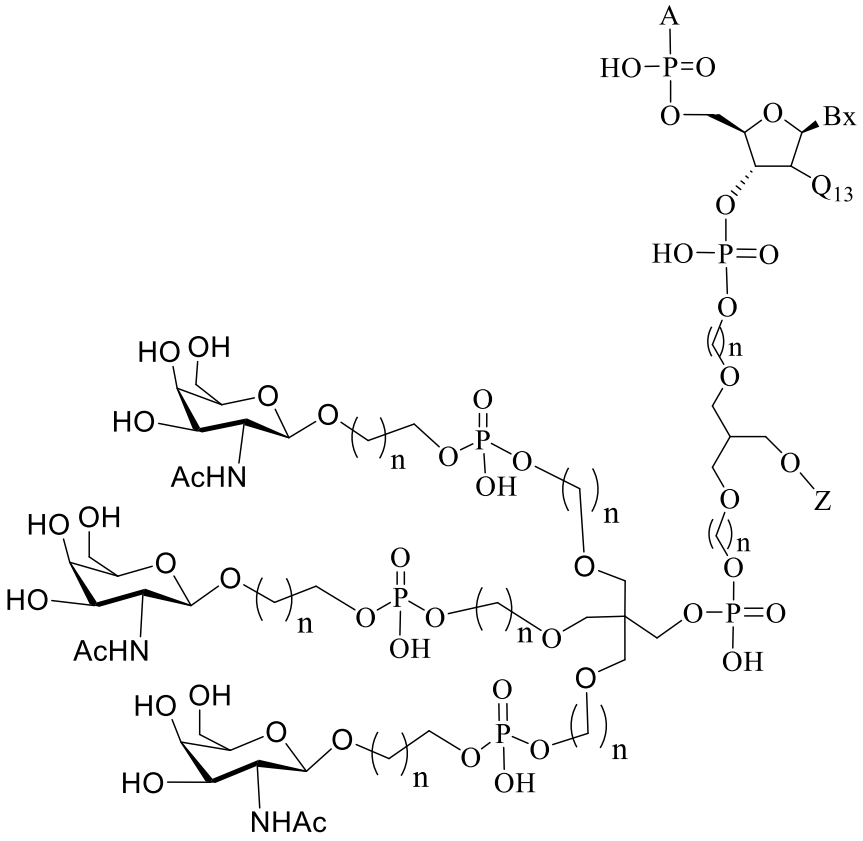
[00458] em que n é, independentemente, de 1 a 20;

[00459] Q_{13} é H ou $O(CH_2)_2$-OCH_3;

[00460] A é o oligonucleotídeo modificado; e

[00461] Bx é uma porção de base heterocíclica.

[00462] Em determinadas modalidades, um composto tem a seguinte estrutura:



em que n é, independentemente, de 1 a 20;

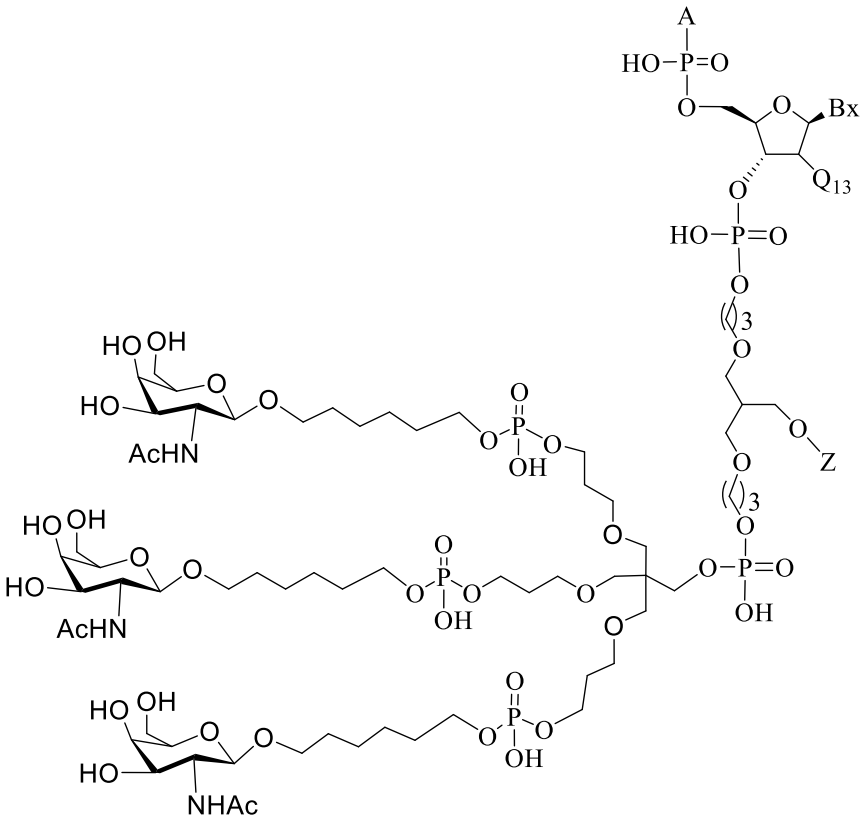
[00463] Q_{13} é H ou $O(CH_2)_2$-OCH_3;

[00464] A é o oligonucleotídeo modificado;

[00465] Z é H ou um suporte sólido ligado; e

[00466] Bx é uma porção de base heterocíclica.

[00467] Em determinadas modalidades, um composto tem a seguinte estrutura:



em que n é, independentemente, de 1 a 20;

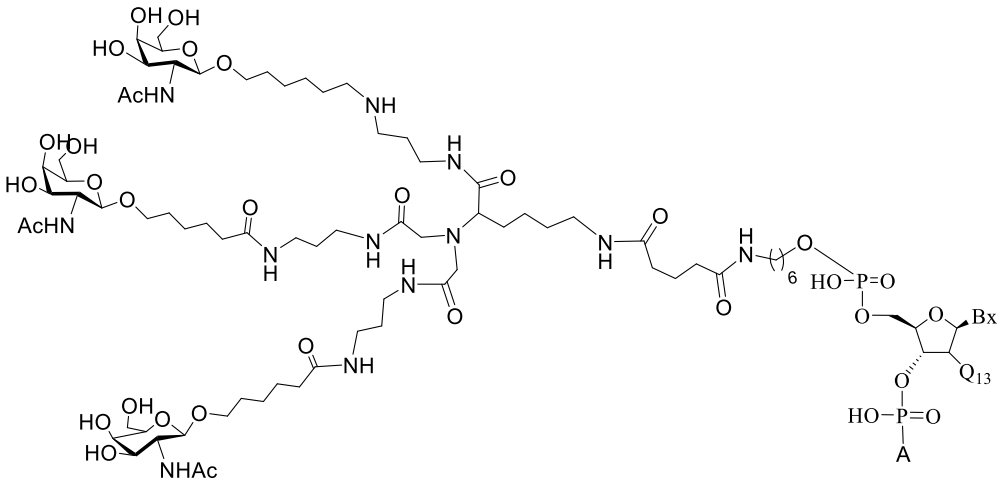
[00468] Q_{13} é H ou $O(CH_2)_2$-OCH_3;

[00469] A é o oligonucleotídeo modificado;

[00470] Z é H ou um suporte sólido ligado; e

[00471] Bx é uma porção de base heterocíclica.

[00472] Em determinadas modalidades, o composto tem a seguinte estrutura:

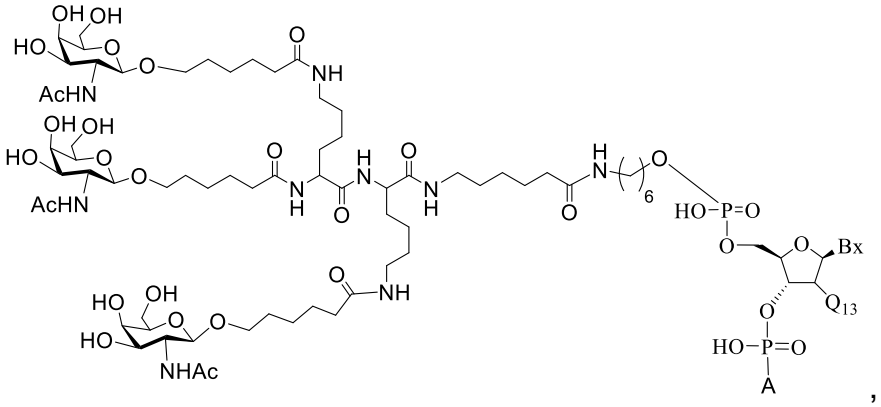


em que Q_{13} é H ou $O(CH_2)_2$-OCH_3;

[00473] A é o oligonucleotídeo modificado; e

[00474] Bx é uma porção de base heterocíclica.

[00475] Em determinadas modalidades, um composto tem a seguinte estrutura:



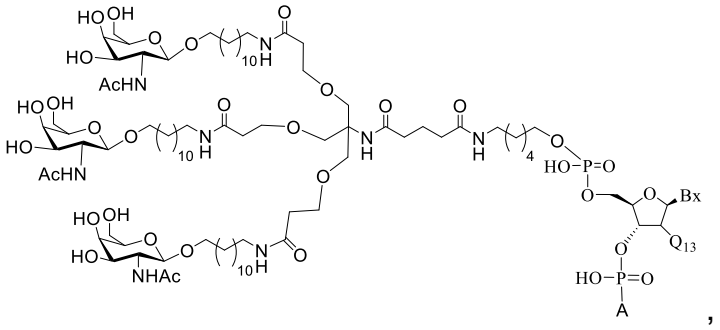
,

em que Q_{13} é H ou $O(CH_2)_2$-OCH_3;

[00476] A é o oligonucleotídeo modificado; e

[00477] Bx é uma porção de base heterocíclica.

[00478] Em determinadas modalidades, um composto tem a seguinte estrutura:

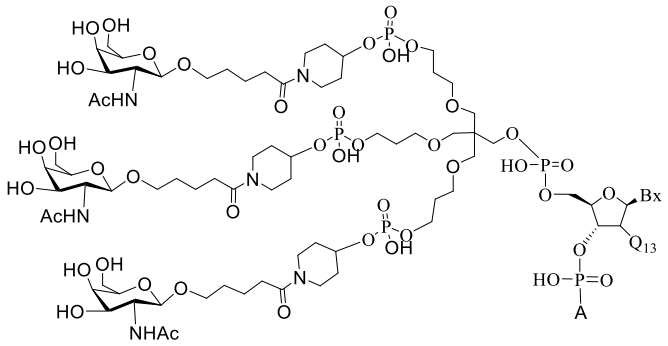


em que Q_{13} é H ou $O(CH_2)_2$-OCH_3;

[00479] A é o oligonucleotídeo modificado; e

[00480] Bx é uma porção de base heterocíclica.

[00481] Em determinadas modalidades, um composto tem a seguinte estrutura:

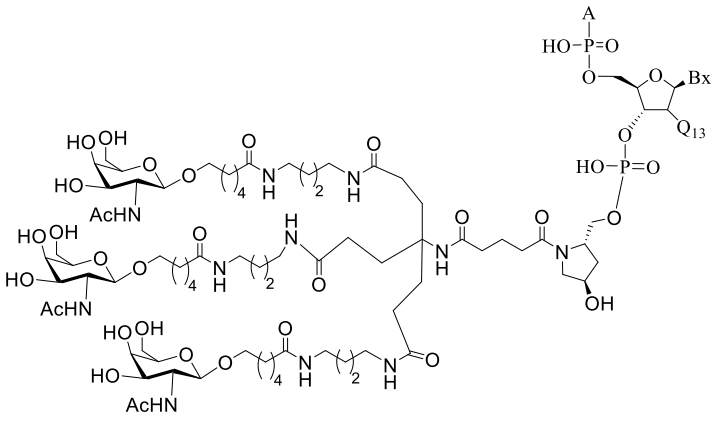


em que Q_{13} é H ou $O(CH_2)_2$-OCH_3;

[00482] A é o oligonucleotídeo modificado; e

[00483] Bx é uma porção de base heterocíclica.

[00484] Em determinadas modalidades, um composto tem a seguinte estrutura:



em que Q_{13} é H ou $O(CH_2)_2$-OCH_3;

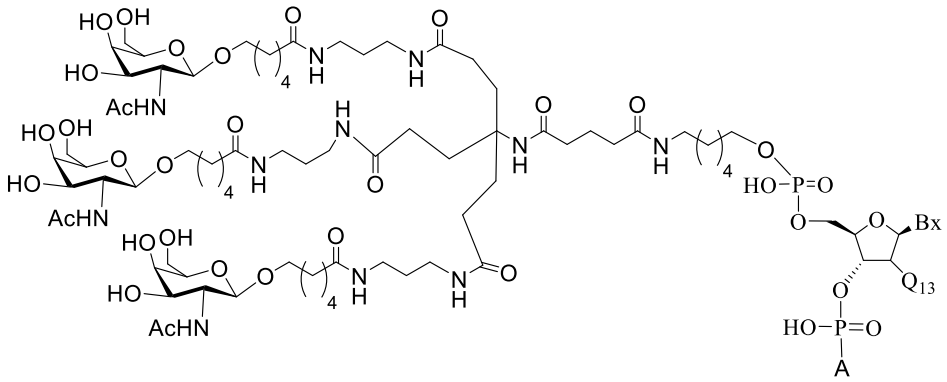
[00485] A é o oligonucleotídeo

[00486] em que Q_{13} é H ou $O(CH_2)_2$-OCH_3;

[00487] A é o oligonucleotídeo modificado; e

[00488] Bx é uma porção de base heterocíclica.

[00489] Em determinadas modalidades, um composto tem a seguinte estrutura:

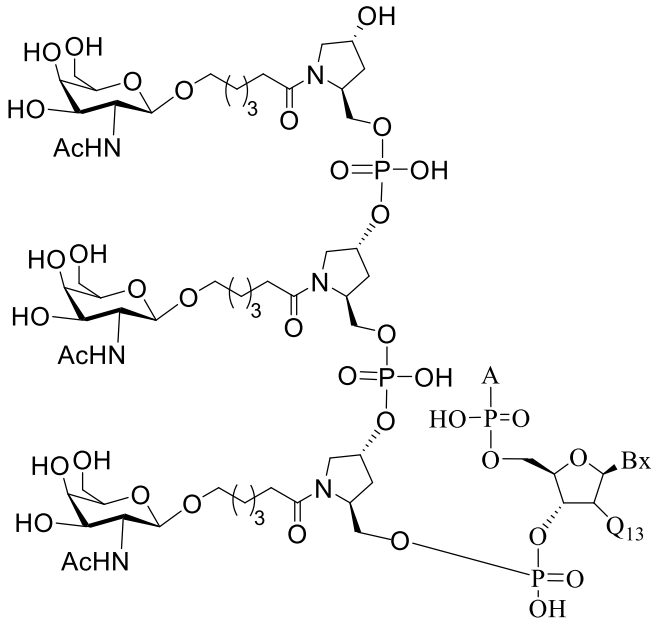


em que Q_{13} é H ou $O(CH_2)_2$-OCH_3;

[00490] A é o oligonucleotídeo modificado; e

[00491] Bx é uma porção de base heterocíclica.

[00492] Em determinadas modalidades, um composto tem a seguinte estrutura:

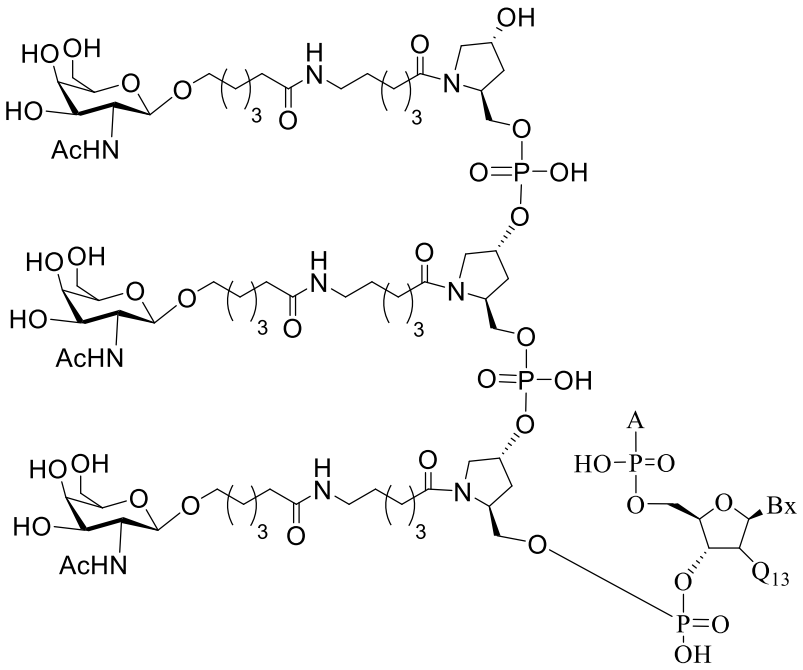


em que Q_{13} é H ou $O(CH_2)_2$-OCH_3;

[00493] A é o oligonucleotídeo modificado; e

[00494] Bx é uma porção de base heterocíclica.

[00495] Em determinadas modalidades, um composto tem a seguinte estrutura:

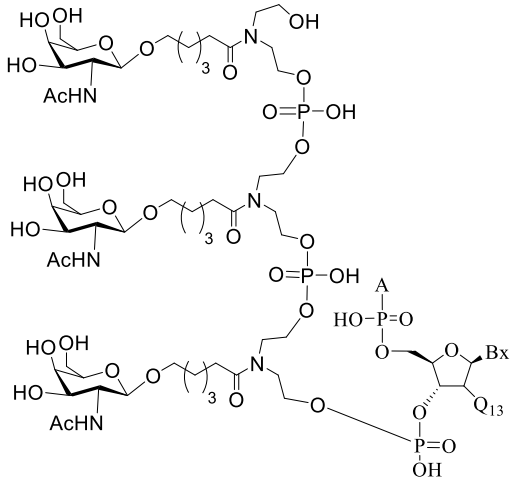


em que Q_{13} é H ou $O(CH_2)_2$-OCH_3;

[00496] A é o oligonucleotídeo modificado; e

[00497] Bx é uma porção de base heterocíclica.

[00498] Em determinadas modalidades, um composto tem a seguinte estrutura:

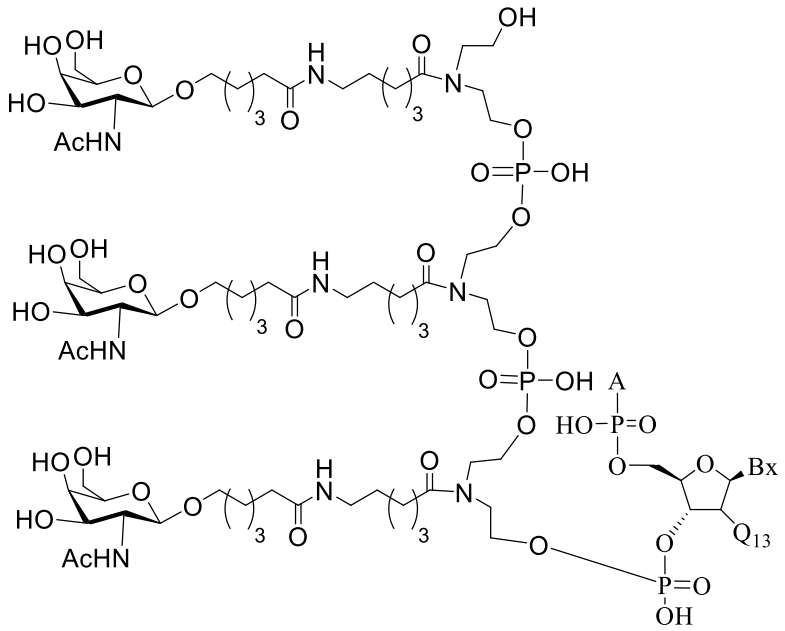


em que Q_{13} é H ou $O(CH_2)_2$-OCH_3;

[00499] A é o oligonucleotídeo modificado; e

[00500] Bx é uma porção de base heterocíclica.

[00501] Em determinadas modalidades, um composto tem a seguinte estrutura:

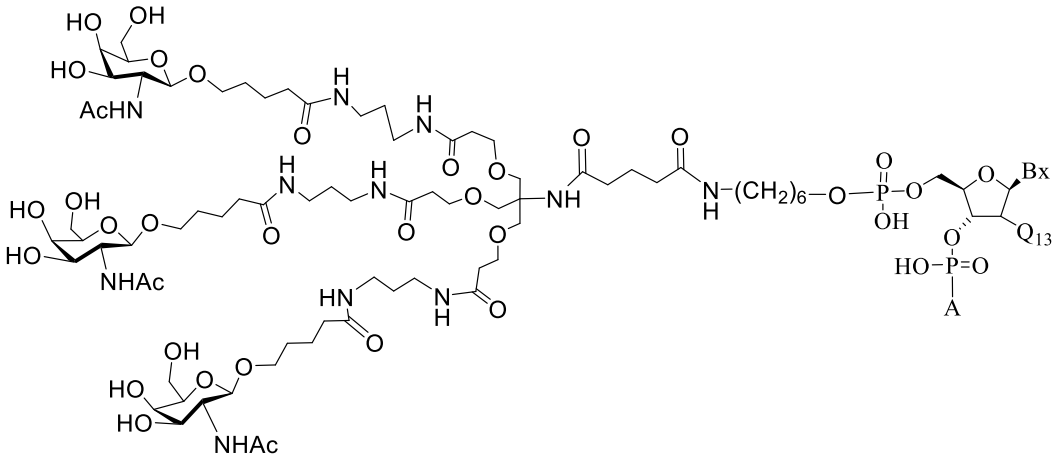


em que Q_{13} é H ou $O(CH_2)_2$-OCH_3;

[00502] A é o oligonucleotídeo modificado; e

[00503] Bx é uma porção de base heterocíclica.

[00504] Em determinadas modalidades, o grupo de conjugado compreende:

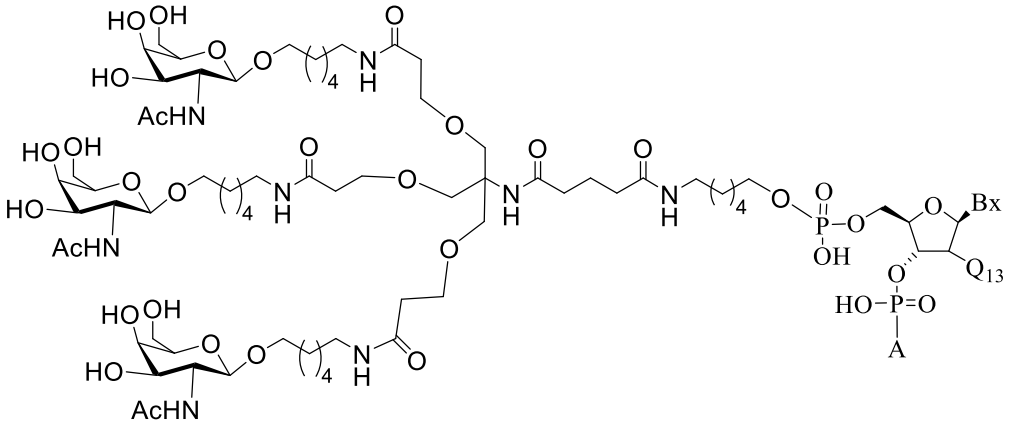


em que Q_{13} é H ou $O(CH_2)_2$-OCH_3;

[00505] A é o oligonucleotídeo modificado; e

[00506] Bx é uma porção de base heterocíclica.

[00507] Em determinadas modalidades, o grupo de conjugado compreende:

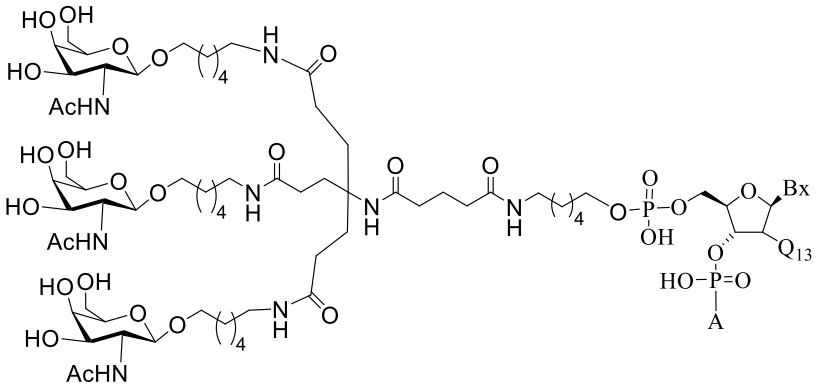


em que Q_{13} é H ou $O(CH_2)_2$-OCH_3;

[00508] A é o oligonucleotídeo modificado; e

[00509] Bx é uma porção de base heterocíclica.

Em determinadas modalidades, o grupo de conjugado compreende:



em que Q_{13} é H ou $O(CH_2)_2$-OCH_3;

[00510] A é o oligonucleotídeo modificado; e

[00511] Bx é uma porção de base heterocíclica.

[00512] Em determinadas modalidades, B_x é selecionado entre adenina, guanina, timina, uracila ou citosina, ou 5-metil-citosina. Em certas modalidades, B_x é adenina. Em certas modalidades, B_x é timina. Em determinadas modalidades, Q_{13} é $O(CH_2)_2$- OCH_3. Em determinadas modalidades, Q_{13} é H.

[00513] Certas modalidades da invenção fornecem um profármaco que compreende composições ou compostos divulgados aqui.

[00514] Em certas modalidades, o composto está em uma forma de sal. Em modalidades adicionais, o composto adicionalmente compreende um veículo ou diluente farmaceuticamente aceitável. Em certas modalidades, o composto compreende um oligonucleotídeo modificado que direciona ApoCIII e um grupo conjugado, ou um sal do mesmo, e um veículo ou diluente farmaceuticamente aceitável.

[00515] Determinadas modalidades fornecem composições e métodos que compreendem a administração a um animal de um composto antissenso conjugado ou composição divulgada aqui. Em determinadas modalidades, a administração do composto antissenso conjugado previne, trata, melhora ou retarda a progressão de uma doença cardiovascular, metabólica e/ou inflamatória.

[00516] Certas modalidades fornecem composições e métodos para uso na terapia para tratar uma doença, distúrbio ou condição relacionada a ApoCIII. Em determinadas modalidades, os níveis de ApoCIII são elevados em um animal. Em certas modalidades, a composição é um composto que compreende um inibidor específico de ApoCIII. Em certas modalidades, o inibidor específico de ApoCIII é um ácido nucleico. Em certas modalidades, o ácido nucleico é um composto antissenso. Em certas modalidades, o composto antissenso é um oligonucleotídeo modificado que direciona ApoCIII. Em determinadas modalidades, o composto antissenso é um oligonucleotídeo modificado que direciona ApoCIII e um grupo conjugado. Em certas modalidades, o oligonucleotídeo modificado que direciona ApoCIII com o grupo de conjugado é usado no tratamento, prevenção, retardo da progressão, melhora de uma doença, distúrbio ou condição inflamatória, cardiovascular e/ou metabólica. Em certas modalidades, as composições e os métodos para a terapia incluem a administração de um inibidor específico de ApoCIII a um indivíduo em necessidade do mesmo.

[00517] Certas modalidades fornecem compostos antissenso conjugados e composições e métodos para reduzir níveis de ApoCIII. Em determinadas modalidades, os níveis de ApoCIII são reduzidos no fígado, tecido adiposo, coração, músculo esquelético ou intestino delgado.

[00518] Em determinadas modalidades, a redução dos níveis de ApoCIII em um tecido, órgão ou indivíduo aumenta os níveis de HDL. Em determinadas modalidades, os níveis de HDL aumentaram em pelo menos 90%, pelo menos 80%, pelo menos 70%, pelo menos 60%, pelo menos 50%, pelo menos 45%, pelo menos 40%, pelo menos 35%, pelo menos 30%, pelo menos 25%, pelo menos 20%, pelo menos 15%, pelo menos 10% ou pelo menos 5% do nível de HDL de referência.

[00519] Em determinadas modalidades, a redução dos níveis de ApoCIII em um tecido, órgão ou indivíduo reduz os níveis de TG. Em determinadas modalidades, o indivíduo tem um nível de triglicerídeo $\geqslant$ 100 mg/dL, $\geqslant$ 200 mg/dL, $\geqslant$ 300 mg/dL, $\geqslant$ 400 mg/dL, $\geqslant$ 440 mg/dL, $\geqslant$ 500 mg/dL, $\geqslant$ 600 mg/dL, $\geqslant$ 700 mg/dL, $\geqslant$ 800 mg/dL, $\geqslant$ 880 mg/dL, $\geqslant$ 900 mg/dL, $\geqslant$ 1000 mg/dL, $\geqslant$ 1100 mg/dL , $\geqslant$ 1200 mg/dL, $\geqslant$ 1300 mg/dL, $\geqslant$ 1400 mg/dL, $\geqslant$ 1500 mg/dL, $\geqslant$ 1600 mg/dL, $\geqslant$ 1700 mg/dL, $\geqslant$ 1800 mg/dL, $\geqslant$ 1900 mg/dL, $\geqslant$ 2000 mg/dL.

[00520] Em determinadas modalidades, os níveis de TG (pós-prandial ou jejum) diminuem em pelo menos 90%, pelo menos 80%, pelo menos 70%, pelo menos 60%, pelo menos 50%, pelo menos 45%, pelo menos 40%, pelo menos 35%, pelo menos 30%, pelo menos 25%, pelo menos 20%, pelo menos 15%, pelo menos 10% ou pelo menos 5% do nível de TG de referência. Em determinadas modalidades, o nível de TG (pós-prandial ou jejum) diminuiu para $\leqslant$1900mg/dL, $\leqslant$1800mg/dL, $\leqslant$ 1700mg/dL, $\leqslant$1600mg/dL, $\leqslant$1500mg/dL, $\leqslant$1400mg/dL, $\leqslant$1300mg/dL, $\leqslant$1200mg/dL, $\leqslant$1100mg/dL, $\leqslant$1000mg/dL, $\leqslant$900mg/dL, $\leqslant$800mg/dL, $\leqslant$750mg/dL, $\leqslant$700mg/dL, $\leqslant$650mg/dL, $\leqslant$600mg/dL, $\leqslant$550mg/dL, $\leqslant$

500mg/dL, ⩽450mg/dL, ⩽400mg/dL, ⩽350mg/dL, ⩽300mg/dL, ⩽ 250mg/dL, ⩽200mg/dL, ⩽150mg/dL ou ⩽100mg/dL.

[00521] Em certas modalidades, reduzir níveis de ApoCIII em um tecido, órgão ou indivíduo melhora a razão entre LDL e HDL ou a razão entre TG e HDL.

[00522] Em determinadas modalidades, a redução dos níveis de ApoCIII em um tecido, órgão ou indivíduo melhora a sensibilidade à insulina.

[00523] Em determinadas modalidades, a redução dos níveis de ApoCIII em um tecido, órgão ou indivíduo aumenta a depuração de quilomícron.

[00524] Determinadas modalidades fornecem composições e métodos para reduzir o mRNA da ApoCIII ou a expressão da proteína em um animal compreendendo a administração ao animal de um um composto antissenso conjugado ou composição divulgada aqui para reduzir mRNA da ApoCIII ou expressão da proteína no animal.

[00525] Certas modalidades fornecem compostos antissenso conjugados e composições e métodos para prevenir, tratar, retardar, reduzir a progressão e/ou melhorar doenças, distúrbios, e condições relacionadas à ApoCIII em um indivíduo em necessidade dos mesmos. Em certas modalidades, tais doenças, distúrbios, e condições incluem doenças, distúrbios, e condições inflamatórias, cardiovasculares e/ou metabólicas. Algumas dessas doenças, distúrbios ou condições cardiovasculares incluem, mas não estão limitadas a, quilomicronemia, hipertrigliceridemia, esteanose aórtica, aneurisma (por exemplo, aneurisma da aorta abdominal), angina, arritmia, aterosclerose, doença cerebrovascular, doença arterial coronariana, doença cardíaca coronariana, dislipidemia, hipercolesterolemia, hiperlipidemia, hipertensão, infarto do miocárdio, doença vascular periférica (por exemplo, doença arterial periférica, doença oclusiva arterial periférica), dislipidemia tipo I, FCS, deficiência de

LPL, oclusão vascular retinal ou derrame. Algumas dessas doenças, distúrbios ou condições metabólicas incluem, mas não estão limitadas a, hiperglicemia, pré-diabetes, diabetes (tipo I e tipo II), obesidade, resistência à insulina, síndrome metabólica e dislipidemia diabética. Certas doenças, distúrbios ou condições inflamatórias incluem, mas não estão limitadas a, pancreatite, estenose aórtica, doença arterial coronariana (CAD), mal de Alzheimer e doenças, distúrbios ou condições tromboembólicas. Certas doenças, distúrbios ou condições tromboembólicas incluem, mas não estão limitadas a, derrame, trombose, (por exemplo, tromboembolismo venoso), infarto do miocárdio e doença vascular periférica. Certas modalidades fornecem compostos antissenso conjugados e composições e métodos para prevenir, tratar, retardar, reduzir a progressão e/ou melhorar a hipertrigliceridemia. Certas modalidades fornecem compostos antissenso conjugados e composições e métodos para prevenir, tratar, retardar, reduzir a progressão e/ou melhorar a quilomicronemia. Certas modalidades fornecem compostos antissenso conjugados e composições e métodos para prevenir, tratar, retardar, reduzir a progressão e/ou melhorar a pancreatite.

[00526] Certas modalidades fornecem um método de redução de pelo menos um sintoma de uma doença, distúrbio ou condição cardiovascular. Em certas modalidades, os sintomas incluem, mas não estão limitados a, angina, dor no peito, falta de fôlego, palpitações, fraqueza, tonturas, náuseas, sudorese, taquicardia, bradicardia, arritmia, fibrilação atrial, inchaço nas extremidades inferiores, cianose, cansaço, desmaio, dormência da face, dormência dos membros, claudicação ou cólicas dos músculos, inchaço do abdômen, e febre. Em determinadas modalidades, os sintomas de uma doença, distúrbio ou condição incluem, mas não estão limitados a, micção frequente, sede incomum, fome extrema, perda de peso incomum, fadiga extrema, irritabilidade, infecções fre-

quentes, visão turva, cortes/feridas que demoram a sarar, formigamento/dormência nas mãos/pés e infecções de pele, gengiva ou bexiga recorrentes. Determinadas modalidades fornecem um método para reduzir pelo menos um sintoma de hipertrigliceridemia. Determinadas modalidades fornecem um método de redução de pelo menos um sintoma de quilomicronemia. Determinadas modalidades fornecem um método para reduzir pelo menos um sintoma da pancreatite.

[00527] Em certas modalidades, a modulação da expressão de ApoCIII ocorre em uma célula, tecido ou órgão. Em certas modalidades, as modulações ocorrem em uma célula, tecido ou órgão em um animal. Em certas modalidades, a modulação é uma redução no nível de mRNA de ApoCIII. Em certas modalidades, a modulação é uma redução no nível de proteína ApoCIII. Em certas modalidades, ambos os níveis do mRNA e da proteína de ApoCIII são reduzidos. Essa redução pode ocorrer em uma forma dependente do tempo e em uma forma dependente da dose.

[00528] Em certas modalidades, o indivíduo ou animal é um ser humano.

[00529] Em certas modalidades, o composto é administrado parenteralmente. Em modalidades adicionais, a administração parenteral é subcutânea.

[00530] Em certas modalidades, o composto antissenso conjugado ou composição é coadministrada com um segundo agente ou terapia. Em determinadas modalidades, o composto antissenso conjugado ou composição e o segundo agente são administrados concomitantemente.

[00531] Em certas modalidades, o segundo agente é um agente redutor de glicose. Em certas modalidades, o segundo agente é um agente redutor de LDL, TG ou colesterol. Em certas modalidades, o segundo agente é um agente anti-inflamatório. Em certas modalidades, o

segundo agente é um fármaco de doença de Alzheimer. Em certas modalidades, o segundo agente pode estar, mas não está limitado a, um fármaco anti-inflamatório não esteroidal (NSAID, por exemplo, aspirina), niacina (por exemplo, Niaspan), ácido nicotínico, um inibidor de apoB (por exemplo, Mipomersen), um inibidor de CETP (por exemplo, Anacetrapib), um inibidor de apo (a), um análogo de hormônio da tiroide (por exemplo, Eprotirome), um inibidor de HMG-CoA redutase (por exemplo, uma estatina), um fibrato (por exemplo, Gemfibrozil) e um inibidor de proteína de transferência de triglicerídeo microsomal (por exemplo, Lomitapide). As terapias ou agentes podem ser coadministrados ou administrados concomitantemente. Agentes ou terapias podem ser administrados sequencialmente ou subsequentemente.

[00532] Determinadas modalidades fornecem o uso das composições e compostos antissenso conjugados descritos aqui direcionados a ApoCIII para diminuir os níveis de ApoCIII em um animal. Certas modalidades fornecem o uso de um composto direcionado à ApoCIII para diminuir níveis de ApoCIII em um animal. Certas modalidades fornecem o uso de um composto direcionado à ApoCIII para aumentar os níveis de HDL em um animal. Determinadas modalidades fornecem o uso de um composto direcionado à ApoCIII para o aumento da depuração de quilomícron de HDL em um animal. Certas modalidades fornecem o uso de um composto direcionado à ApoCIII para tratamento, prevenção, ou melhora de uma doença, distúrbio, ou condição associada à ApoCIII. Determinadas modalidades fornecem o uso de um composto direcionado à ApoCIII para o tratamento, prevenção ou melhoria de hipertrigliceridemia. Determinadas modalidades fornecem o uso de um composto direcionado à ApoCIII para o tratamento, prevenção ou melhoria de uma quilomicronemia (por exemplo, FCS e/ou LPLD). Determinadas modalidades fornecem o uso de um composto direcionado à ApoCIII para o tratamento, prevenção ou melhoria de pancreatite.

[00533] Determinadas modalidades fornecem o uso das composições e compostos antissenso conjugados descritos aqui direcionados a ApoCIII no preparo de um medicamento para diminuir os níveis de ApoCIII em um animal. Certas modalidades fornecem o uso de composições e compostos para a preparação de um medicamento para tratamento, prevenção ou melhora de uma doença, distúrbio, ou condição associada à ApoCIII.

[00534] Determinadas modalidades fornecem o uso de composições e compostos antissenso conjugados conforme descrito aqui na fabricação de um medicamento para o tratamento, melhora, retardo ou prevenção de uma ou mais doenças relacionadas à ApoCIII.

[00535] Certas modalidades fornecem um kit para tratar, prevenir, ou melhorar uma doença, distúrbio ou condição conforme descrito aqui em que o kit compreende: (i) um inibidor específico de ApoCIII como descrito aqui; e opcionalmente (ii) um segundo agente ou terapia como descrito aqui.

[00536] Um kit da presente invenção pode adicionalmente incluir instruções para usar o kit para tratar, prevenir, ou melhorar uma doença, distúrbio ou condição conforme descrito aqui pela terapia de combinação conforme descrito aqui.

Determinados Compostos

[00537] Em determinadas modalidades, a invenção fornece compostos antissenso conjugados que compreendem oligonucleotídeos antissenso e um conjugado.

Determinados oligonucleotídeos Antissenso

[00538] Em determinadas modalidades, a invenção fornece oligonucleotídeos antissenso. Esses oligonucleotídeos antissenso compreendem nucleosídeos ligados, sendo que cada nucleosídeo compreende uma porção de açúcar e uma nucleobase. A estrutura desses oligonucleotídeos antissenso pode ser considerada, em termos de

características químicas, (por exemplo, modificações e padrões de modificações) e sequência de nucleobase (por exemplo, sequência de oligonucleotídeo antissenso, identidade e sequência do ácido nucleico alvo).

Determinadas Características de Química

[00539] Em determinadas modalidades, o oligonucleotídeo *antis-senso* compreende uma ou mais modificações. Em determinadas modalidades, os oligonucleotídeos antissenso compreendem um ou mais nucleosídeos modificados e/ou ligações de internucleosídeo modificado. Em determinadas modalidades, os nucleosídeos modificados compreendem uma porção de açúcar modificada e/ou uma nucleobase modificada.

Determinadas Frações de Açúcar

[00540] Em determinadas modalidades, os compostos da divulgação compreendem um ou mais nucleosídeos modificados que consistem em uma porção de açúcar modificado. Esses compostos que compreendem um ou mais nucleosídeos modificados de açúcar podem ter propriedades desejáveis, como melhor estabilidade da nuclease ou aumento da afinidade da ligação com um ácido nucleico alvo em relação a um oligonucleotídeo que consiste apenas em nucleosídeos compostos por frações de açúcar de ocorrência natural. Em determinadas modalidades, as frações de açúcar modificadas são frações de açúcar substituídas. Em determinadas modalidades, frações de açúcar modificadas são substitutos do açúcar. Esses substitutos do açúcar podem compreender uma ou mais substituições que correspondem às frações de açúcar substituídas.

[00541] Em determinadas modalidades, as frações de açúcar modificadas são frações de açúcar substituídas que compreendem um ou mais substituintes de açúcar sem ponte incluindo, entre outros, substituintes nas posições 2' e/ou 5'. Os exemplos de substituintes de

açúcar apropriados para a posição 2' incluem, entre outros: 2'-F, 2'-OCH_3 ("OMe" ou "O-metil"), e 2'-$O(CH_2)_2OCH_3$ ("MOE"). Em determinadas modalidades, os substituintes do açúcar na posição 2' são selecionados de alila, amino, azida, tio, O-alila, alquila O-C_1-C_{10}, alquila substituída O-C_1-C_{10}; OCF_3, $O(CH_2)_2SCH_3$, $O(CH_2)_2$-O-N(Rm)(Rn), e O-CH_2-C(=O)-N(Rm)(Rn), onde Rm e Rn são, independentemente, H ou alquila C_1-C_{10} substituída ou não substituída. Os exemplos de substituintes de açúcar na posição 5' incluem, entre outros: 5'-metila (R ou S); 5'-vinila e 5'-metóxi. Em determinadas modalidades, os açúcares substituídos compreendem mais de um substituinte de açúcar sem ponte, por exemplo, frações de açúcar 2'-F-5'-metila (*ver*, por exemplo, pedido Internacional PCT WO 2008/101157, para frações de açúcar substituídas por 5' adicional, 2'bls).

[00542] Os nucleosídeos que compreendem frações de açúcar substituídas em 2' são denominados nucleosídeos substituídos em 2'. Em determinadas modalidades, um nucleosídeo substituído em 2' compreende um grupo substituinte em 2' selecionado a partir de halo, alila, amina, azida, SH, CN, OCN, CF_3, OCF_3, O, S, ou N(R_m)-alquila; O, S, ou N(R_m)-alquenila; O, S ou N(R_m)-alquinila; O-alquilenil-O-alquila, alquinila, alcarila, aralquila, O-alcarila, O-aralquila, $O(CH_2)_2SCH_3$, O-$(CH_2)_2$-O-N(R_m)(R_n) ou O-CH_2-C(=O)-N(R_m)(R_n), onde cR_m e R_n são, independentemente, H, um grupo de proteção amina alquila C_1-C_{10} substituída ou não substituída. Estes grupos substituintes em 2' podem ser substituídos ainda por um ou mais grupos substituintes independentemente selecionados a partir da hidroxila, amina, alcóxi, carbóxi, benzila, fenila, nitro (NO_2), tiol, tioalcóxi (S-alquila), halogênio, alquila, arila, alquenila e alquinila.

[00543] Em determinadas modalidades, um nucleosídeo substituído em 2' compreende um grupo substituinte em 2' selecionado a partir de F, NH_2, N_3, OCF_3, O-CH_3, $O(CH_2)_3NH_2$, CH_2-CH=CH_2, O-CH_2-CH=CH_2,

$OCH_2CH_2OCH_3$, $O(CH_2)_2SCH_3$, $O\text{-}(CH_2)_2\text{-}O\text{-}N(R_m)(R_n)$, $O(CH_2)_2O(CH_2)_2N(CH_3)2$, e acetamida substituída em N (O-CH2-C(=O)-N(Rm)(Rn) onde Rm e Rn são, de forma independente, H, um grupo de proteção amina ou alquila C1-C10 substituída ou não substituída.

[00544] Em determinadas modalidades, um nucleosídeo substituído em 2' compreende uma porção de açúcar que consiste em um grupo substituinte em 2' selecionado a partir de F, OCF_3, $O\text{-}CH_3$, $OCH_2CH_2OCH_3$, $O(CH_2)_2SCH_3$, $O\text{-}(CH_2)_2\text{-}O\text{-}N(CH_3)_2$, $O(CH_2)_2O(CH_2)_2N(CH_3)_2$, e $O\text{-}CH_2\text{-}C(=O)\text{-}N(H)CH_3$

[00545] Em determinadas modalidades, um nucleosídeo substituído em 2' compreende uma porção de açúcar que consiste em um grupo substituinte em 2' selecionado a partir de F, O-CH3, e OCH2CH2OCH3.

[00546] Certas frações de açúcar modificadas compreendem um substituinte de açúcar de ponte que forma um segundo anel resultando em uma porção de açúcar bicíclica. Em algumas dessas modalidades, a porção de açúcar bicíclica compreende uma ponte entre os átomos do anel de furanose em 4' e 2'. Exemplos desses substituintes de açúcar em 4' a 2' incluem, entre outros: $\text{-}[C(R_a)(R_b)]_n\text{-}$, $\text{-}[C(R_a)(R_b)]_n\text{-}O\text{-}$, $\text{-}C(R_aR_b)\text{-}N(R)\text{-}O\text{-}$ ou, $\text{-}C(R_aR_b)\text{-}O\text{-}N(R)\text{-}$; $4'\text{-}CH_2\text{-}2'$, $4'\text{-}(CH_2)_2\text{-}2'$, $4'\text{-}(CH_2)_3\text{-}2'$,. $4'\text{-}(CH_2)\text{-}O\text{-}2'$ (LNA); $4'\text{-}(CH_2)\text{-}S\text{-}2'$; $4'\text{-}(CH_2)_2\text{-}O\text{-}2'$ (ENA); $4'\text{-}CH(CH_3)\text{-}O\text{-}2'$ (cEt) e $4'\text{-}CH(CH_2OCH_3)\text{-}O\text{-}2'$, e análogos dos mesmos (*ver, por exemplo,* Patente U.S. 7.399.845, emitida em 15 de julho de 2008); $4'\text{-}C(CH_3)(CH_3)\text{-}O\text{-}2'$ e análogos dos mesmos, (*ver, por exemplo,* WO2009/006478, publicado em 8 de janeiro de 2009); $4'\text{-}CH_2\text{-}N(OCH_3)\text{-}2'$ e análogos dos mesmos (*ver, por exemplo,* WO2008/150729, publicado em 11 de dezembro de 2008); $4'\text{-}CH_2\text{-}O\text{-}N(CH_3)\text{-}2'$ (*ver, por exemplo,* US2004/0171570, publicado em 2 de setembro de 2004); $4'\text{-}CH_2\text{-}O\text{-}N(R)\text{-}2'$, e $4'\text{-}CH_2\text{-}N(R)\text{-}O\text{-}2'$-, em que cada R é, independentemente, H, um grupo protetor, ou alquila $C_1\text{-}C_{12}$; $4'\text{-}CH_2\text{-}N(R)\text{-}O\text{-}2'$, em que R é H, alquila $C_1\text{-}C_{12}$, ou um grupo protetor (*ver*,

Patente U.S. 7.427.672, emitida em 23 de setembro de 2008); 4'-CH2-C(H)(CH3)-2' (ver, por exemplo, Chattopadhyaya, et al., J. Org. Chem.,2009, *74*, 118-134); e 4'-CH2-C(=CH_2)-2', e seus análogos (*ver*, Pedido Internacional PCT publicado WO 2008/154401, publicado em 8 de dezembro de 2008).

[00547] Em determinadas modalidades, essas pontes 4' a 2' compreendem independentemente de 1 para 4 grupos ligados independentemente selecionados a partir de -[C (R_a) (R_b)]$_n$-, - c (R_a) = C(R_b)-, - c (R_a) = N, -C(=NR_a), C(=O)-, - C(=S), - O-, -Si (R_a)$_2$-,-S(=O)$_x$-, e -N(R_a)-;

[00548] em que:

[00549] x é 0, 1 ou 2;

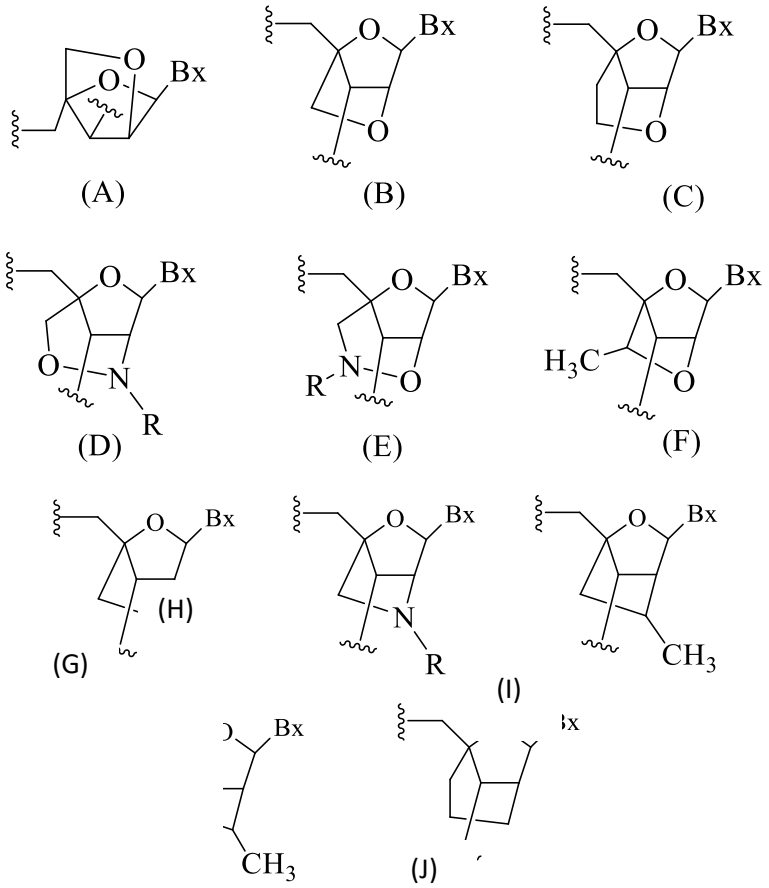
[00550] n é 1, 2, 3 ou 4;

[00551] cada R_a e R_b é, independentemente, H, um grupo protetor, hidroxila, alquila C_1-C_{12}, alquila C_1-C_{12} substituída, alquenila C_2-C_{12}, alquenila C_2-C_{12} substituída, alquinila C_2-C_{12}, alquinila C_2-C_{12} substituída, arila C_5-C_{20}, arila C_5-C_{20} substituída, radical heterociclo, radical heterociclo substituído, heteroarila, heteroarila substituída, radical alicíclico C_5-C_7, radical alicíclico C_5-C_7 substituído, halogênio, OJ_1, NJ_1J_2, SJ_1, N_3, $COOJ_1$, acila (C(=O)-H), acila substituída, CN, sulfonil (S(=O)$_2$-J_1), ou sulfoxil (S(=O)-J_1); e

[00552] cada J_1 e J_2 é, independentemente, H, alquila C_1-C_{12}, alquila substituída C_1-C_{12}, alquenila C_2-C_{12}, alquenila substituída C_2-C_{12}, alquinila C_2-C_{12}, alquinila substituída C_2-C_{12}, arila C_5-C_{20}, arila substituída C_5-C_{20}, acila (C(=O)-H), acila substituída, um radical heterocíclico, um radical heterocíclico substituído, aminoalquila C_1-C_{12}, aminoalquila substituído C_1-C_{12}, ou um grupo de proteção.

[00553] Os nucleosídeos que compreendem frações de açúcar bicíclicas são chamados nucleosídeos bicíclicos ou BNAs. Nucleosídeos bicíclicos incluem, entre outros, (A) α-L-metilenóxi (4'-CH_2-O-2') BNA, (B) β-D-Metilenóxi (4'-CH_2-O-2') BNA (também denominado ácido nucleico

bloqueado ou LNA), (C) Etilenóxi (4'-$(CH_2)_2$-O-2') BNA, (D) Amino-óxi (4'-CH_2-O-N(R)-2') BNA, (E) Oxiamina (4'-CH_2-N(R)-O-2') BNA, (F) Metil(metilenóxi) (4'-$CH(CH_3)$-O-2') BNA (também denominado etila restrita ou cEt), (G) metileno-tio (4'-CH_2-S-2') BNA, (H) metileno-amina (4'-CH2-N(R)-2') BNA, (I) metil carboxílico (4'-CH_2-CH (CH_3)-2') BNA e (J) propileno carboxílico (4'-$(CH_2)_3$-2 ') BNA como descrito abaixo.



[00554] onde Bx é uma porção de nucıeobase e R é, independentemente, H, um grupo de proteção ou alquila C_1-C_{12}.

[00555] As frações de açúcar bicíclicas adicionais são conhecidos na técnica, por exemplo: Singh et al., *Chem. Commun*., 1998, 4, 455-456; Koshkin et al., *Tetrahedron*, 1998, 54, 3607-3630; Wahlestedt et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*., 2000, 97, 5633-5638; Kumar et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.,* 1998, 8, 2219-2222; Singh et al., *J. Org. Chem.*, 1998, 63, 10035-10039; Srivastava et al., *J. Am. Chem. Soc.,* 129(26) 8362-8379 (4 de julho de 2007); Elayadi *et al., Curr. Opinion*

Invens. Drugs, 2001, 2, 558-561; *Braasch et al*., Chem. Biol., 2001, 8, 1-7; Orum *et al.,* Curr. Opinion Mol. Ther., 2001, 3, 239-243; Patente U.S. Nos U.S. 6.670.461, 7.053.207, 6.268.490, 6.770.748, 6.794.499, 7.034.133, 6.525.191, 7.399.845; Pedidos Internacionais PCT publicados WO 2004/106356, WO 1994/14226, WO 2005/021570, e WO 2007/134181;Publicação de Patente U.S. Nos. US2004/0171570, US2007/0287831, e US2008/0039618; e Patente U.S. Nos. de Série 12/129.154, 60/989.574, 61/026.995, 61/026.998, 61/056.564, 61/086.231, 61/097.787, e 61/099.844; e Pedidos Internacionais PCT Nos. PCT/US2008/064591, PCT/US2008/066154, e PCT/US2008/068922.

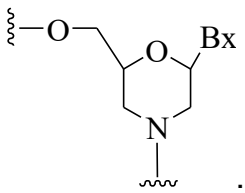
[00556] Em determinadas modalidades, as frações de açúcar bicíclicas e os nucleosídeos que incorporam essas frações de açúcar bicíclicas são definidas ainda pela configuração isomérica. Por exemplo, um nucleosídeo compreendendo uma ponte de 4’-2’ metileno-oxi, pode estar na configuração α-L ou na configuração β-D. Anteriormente, nucleosídeos bicíclicos de α-L-metileno-óxi (4'-CH_2-O-2') foram incorporados aos oligonucleotídeos antissenso que mostraram atividade antissenso (Frieden et al., Nucleic Acids Research, 2003, 21, 6365-6372).

[00557] Em determinadas modalidades, as frações de açúcar substituídas compreendem um ou mais substituintes de açúcar sem ponte e um ou mais substituinte de açúcar com ponte (por exemplo, açúcares com ponte substituídos em 5' ou em 4'-2'). (ver, Pedido Internacional PCT WO 2007/134181, publicado em 22/11/07, em que LNA é substituído, por exemplo, por um grupo 5'-metila ou 5'-vinila).

[00558] Em determinadas modalidades, frações de açúcar modificadas são substitutos do açúcar. Em algumas dessas modalidades, o átomo de oxigênio do açúcar de ocorrência natural é substituído, por exemplo, por um átomo átomo de enxofre, carbono ou nitrogênio. Em

algumas dessas modalidades, essa porção de açúcar modificada também compreende substituintes com e/ou sem ponte conforme descrito acima. Por exemplo, alguns substitutos do açúcar compreendem um átomo 4'-enxofre e uma substituição na posição 2' (ver, por exemplo, Pedido de Patente US Nº 2005/0130923, publicado em 16 de junho de 2005) e/ou na posição 5'. A título de exemplo adicional, os nucleosídeos bicíclicos carboxílicos com uma ponte 4'-2' foram descritos (ver, por exemplo, Freier et al., Nucleic Acids Research, 1997, 25(22), 4429-4443 e Albaek et al., J. Org. Chem., 2006, 71, 7731-7740).

[00559] Em determinadas modalidades, os substitutos de açúcar compreendem anéis com mais de 5 átomos. Por exemplo, em determinadas modalidades, um substituto do açúcar compreende um morfolino. Os compostos de morfolino e seu uso em compostos oligoméricos foram mencionados em várias patentes e artigos publicados (ver, por exemplo: Braasch et al., Biochemistry, 2002, 41, 4503-4510; e Patentes US Nº 5.698.685; 5.166.315; 5.185.444; e 5.034.506). Como usado aqui, o termo "morfolino" se refere a um substituto de açúcar com a seguinte estrutura:

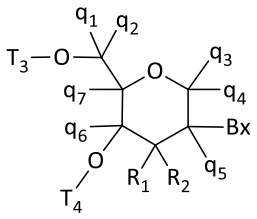


.

[00560] Em determinadas modalidades, os morfolinos podem ser modificados, por exemplo, pelo acréscimo ou alteração de vários grupos substituintes da estrutura do morfolino acima. Esses substitutos do açúcar são mencionados aqui como "morfolinos modificados"

[00561] Em outro exemplo, em determinadas modalidades, um substituto do açúcar compreende um tetra-hidropirano de seis membros. Esses tetra-hidropiranos podem ser ainda modificados ou substituídos. Os nucleosídeos que compreendem esses tetra-hidropiranos modificados incluem, entre outros, hexitol (HNA), ácido nucleico de anitol (ANA),

ácido nucleico de manitol (MNA) (ver Leumann, CJ. Bioorg. & Med. Chem. (2002) 10:841-854), flúor HNA (F-HNA), ou aqueles compostos com a Fórmula VI:



VI

[00562] em que independentemente para cada um do referido pelo menos um análogo de nucleosídeo de tetra-hidropirano de Fórmula VI:

[00563] Bx é uma porção de nucleobase;

[00564] T_3 e T_4 são cada um, independentemente, um grupo de ligação internucleosídica que liga o análogo de nucleosídeo de tetra-hhidropirano ao composto antissenso ou um de T_3 e T_4 é um grupo de ligação internucleosídica que liga o análogo de nucleosídeo de tetra-hidropirano ao composto antissenso e o outro de T_3 e T_4 é H, um grupo protetor de hidroxila, um grupo de conjugado ligado, ou um grupo terminal 5' ou 3';

[00565] q_1, q_2, q_3, q_4, q_5, q_6 e q_7 são cada um, independentemente, H, alquila C_1-C_6, alquila substituída C_1-C_6, alquenila C_2-C_6, alquenila substituída C_2-C_6, alquinila C_2-C_6, ou alquinila substituída C_2-C_6; e

[00566] R_1 e R_2 é independentemente selecionado dentre: hidrogênio, halogênio, alcóxi substituído ou não substituído, NJ_1J_2, SJ_1, N_3, $OC(=X)J_1$, $OC(=X)NJ_1J_2$, $NJ_3C(=X)NJ_1J_2$, e CN, em que X é O, S, ou NJ_1, e cada J_1, J_2, e J_3 é, independentemente, H ou alquila C_1-C_6.

[00567] Em determinadas modalidades, os nucleosídeos THP modificados da Fórmula VI são fornecidos, em que q1, q2, q3, q4, q5, q6 e q7 são, cada um, H. Em determinadas modalidades, pelo menos um de q1, q2, q3, q4, q5, q6 e q7 é diferente de H. Em determinadas modalidade, pelo menos um de q1, q2, q3, q4, q5, q6 e q7 é metila. Em determinadas modalidades, os nucleosídeos THP da Fórmula VI são fornecidos, em que um de R1 e R2 é F. Em determinadas modalidades, R1 é

fluoro e R2 é H, R1 é metóxi e R2 é H, e R1 é metoxietóxi e R2 é H.

[00568] Muitos outros sistemas de anel de substituto de açúcar biciclo e triciclo também são conhecidos na técnica e podem ser usados para modificar nucleosídeos para a incorporação nos compostos antissenso (ver, por exemplo, artigo de revisão: Leumann, J. C, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2002, 10, 841-854).

[00569] As combinações das modificações também são fornecidas, sem limitação, como nucleosídeos 2'-F-5'-metila substituídos (vide, Pedido Internacional PCT WO 2008/101157, publicado em 21/08/08 para outros nucleosídeos 5',2'-bis substituídos divulgados) e substituição do átomo de oxigênio do anel ribosil por S e outra substituição adicional na posição 2' (vide, Pedido de Patente U.S. publicado US2005-0130923, publicado em 16 de junho de 2005), ou alternativamente, substituição 5' de um ácido nucleico bicíclico (vide, Pedido Internacional PCT WO 2007/134181, publicado em 22/11/07, em que o nucleosideo bicíclico 4'-CH2-O-2' é ainda substituído na posição 5' por um grupo 5'-metila ou 5'-vinila). A síntese e preparação de nucleosídeos bicíclicos carbocíclicos juntamente com seus estudos bioquímicos e de oligomerização também foram descritos (ver, por exemplo, Srivastava et al., J. Am. Chem. Soc. 2007, 129(26), 8362-8379).

[00570] Em determinadas modalidades, a presente divulgação fornece oligonucleotídeos que compreendem nucleosídeos modificados. Os nucleotídeos modificados podem incluir açúcares modificados, nucleobases modificadas, e/ou ligações modificadas. As modificações específicas são selecionadas de modo que os oligonucleotídeos resultantes possuam características desejáveis. Em certas modalidades, os oligonucleotídeos compreendem um ou mais nucleosídeos similares ao RNA. Em determinadas modalidades, os oligonucleotídeos compreendem um ou mais nucleotídeos similares ao DNA.

Determinadas Modificações da Nucleobase

[00571] Em determinadas modalidades, os nucleosídeos da presente divulgação compreendem uma ou mais nucleobases não modificadas. Em determinadas modalidades, os nucleosídeos da presente divulgação compreendem uma ou mais nucleobases modificadas.

[00572] Em determinadas modalidades, as nucleobases modificadas são selecionados a partir de: bases universais, bases hidrofóbicas, bases promíscuas, bases expansoras de tamanho e bases fluoradas definidas aqui. 5-pirimidinas substituídas, 6-azapirimidinas e purinas substituídas em N-2, N-6 e O-6, incluindo 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracila; 5-propinilcitosina; 5-hidroximetil citosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metila e outros derivados da alquila da adenina ou da guanina, 2-propila e outros derivados de alquila da adenina e da guanina, 2-tiouracila, 2-tiotimina e 2-tiocitosina, 5-halouracila e citosina, 5-propinila (-C≡C-CH_3) uracila e citosina e outros derivados de alquinil das bases pirimidínicas, 6-azo-uracila, citosina e timina, 5-uracila (pseudouracila), 4-tiouracila, 8-halo, 8-amina, 8-tiol, 8-tioalquila, 8-hidroxila e outras adeninas e guaninas 8-substituídas, 5-halo especialmente 5-bromo, 5-trifluormetila e outras uracilas e citosinas 5-substituídas, 7-metilguanina e 7-metiladenina, 2-F-adenina, 2-amino-adenina, 8-aza-guanina e 8-aza-adenina, 7-deaza-guanina e 7-deaza-adenina, 3-deasa-guanina e 3-deaza-adenina, bases universais, bases hidrofóbicas, bases promíscuas, bases expansoras de tamanho e bases fluoradas definidas aqui. Mais nucleobases modificadas incluem pirimidinas tricíclicas como fenoxazina citidina ([5,4-b][1,4]benzoxazin-2(3H)-ona), fenotiazina citidina (1H-pirimido[5,4-b][1,4]benzotiazin-2(3H)-ona), G-grampos como fenoxazina citidina substituída (por exemplo, 9-(2-aminoetóxi)-H-pirimido[5,4-b][1,4]benzoxazin-2(3H)-ona), carbazol citidina (2H-pirimido[4,5-b]indol-2-ona), piridoindol citidina (H-pirido[3',2':4,5]pirrolo[2,3-d]pirimidin-2-ona). As nucleobases modificadas também podem incluir aquelas em que a base purina ou pirimidina é substituída por outros

heterocíclicos, por exemplo, 7-deaza-adenina, 7-deazaguanosina, 2-aminopiridina e 2-piridona. As nucleobases incluem ainda aquelas divulgadas na Patente Estados Unidos Nº 3.687.808, aquelas divulgadas em *The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering*,Kroschwitz, J.I., Ed., John Wiley & Sons, 1990, 858-859; aquelas divulgadas por Englisch *et al.*, *Angewandte Chemie*, Edição Internacional, 1991, *30*, 613; e aquelas divulgadas por Sanghvi, Y.S., Capítulo 15*, Antisense Research and Applications*, Crooke, S.T. e Lebleu, B., Eds., CRC Press, 1993, 273-288.

[00573] Patentes representativas dos Estados Unidos que ensinam a preparação de determinadas nucleobases modificadas mencionadas acima, bem como outras nucleobases modificadas incluem, sem limitação, US 3.687.808; 4.845.205; 5.130.302; 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; 5.645.985; 5.681.941; 5.750.692; 5.763.588; 5.830.653 e 6.005.096, sendo que algumas delas são comumente pertencentes ao pedido imediato, e cada uma delas é incorporada a este instrumento por referência na sua totalidade.

Determinadas Ligações do Internucleosídeo

[00574] Em determinadas modalidades, a presente divulgação fornece oligonucleotídeos que compreendem nucleosídeos ligados. Nessas modalidades, os nucleosídeos podem estar ligados usando qualquer ligação do internucleosídeo. As duas classes principais dos grupos de ligação do internucleosideo são definidas pela presença ou ausência de um átomo de fósforo. Ligações de internucleosídeos representativas contendo fósforo incluem, mas não estão limitadas a, fosfodiésteres (PO), fosfotriésteres, metilfosfonatos, fosforamidato, e fosforotioatos. Grupos de ligação de internculeosídeo representativos contendo não fósforo incluem, entre outros, metilenometilimina (-CH2-N (CH3) - O -

CH2-), tiodiéster (-O-C(O)-S-), tionocarbamato (-O-C(O)(NH)-S-); siloxano (-O-Si(H)2-O-); e N,N'-dimetil-hidrazina (-CH2-N(CH3) -N(CH3)-). Ligações modificadas, em comparação com as ligações naturais de fosfodiéster, podem ser usadas para alterar, normalmente aumentar, a resistência de nuclease do oligonucleotídeo. Em determinadas modalidades, as ligações de internucleosídeo com um átomo quiral podem ser preparadas como uma mistura racêmica ou como enantiômeros separados. As ligações quirais representativas incluem, entre outros, alquilfosfonatos e fosforotioatos. Os métodos de preparação das ligações de internucleosídeo contendo fósforo e não fósforo são bem conhecidas pelos versados na técnica.

[00575] Os oligonucleotídeos descritos aqui contêm um ou mais centros assimétricos e, assim, dão origem a enantiômeros, diastereômeros e outras configurações estereoisoméricas que podem ser definidas, em termos de estereoquímica absoluta, como (R) ou (S) ou como anômeros de açúcar, ou como (D) ou (L) como aminoácidos, etc. Todos os isômeros possíveis, bem como suas formas racêmicas e opticamente puras estão incluídos nos compostos antissenso.

[00576] As ligação de internucleosídeos neutros incluem, entre outros, fosfotriésteres, metilfosfonatos, MMI (3'-CH_2-N(CH_3)-O-5'), 3-amida (3'-CH_2-C(=O)-N(H)-5'), 4-amida (3'-CH_2-N(H)-C(=O)-5'), formacetal (3'-O-CH_2-O-5') e tioformacetal (3'-S-CH_2-O-5'). Outras ligações de internucleosídeo neutro incluem ligações não iônicas, compreendendo siloxano (dialquilsiloxano), éster carboxilato, carboxamidas, sulfeto, éster sulfonato e amidas (ver, por exemplo: *Carbohydrate Modifications in Antisense Research*; Y.S. Sanghvi e P.D. Cook, Eds., ACS Symposium Série 580; Capítulos 3 e 4, 40-65). Outras ligações de internucleosídeo neutro incluem ligações não iônicas, compreendendo partes do componente N, O, S e CH_2 misturadas.

Determinados Motivos

[00577] Em determinadas modalidades, os oligonucleotídeos antissenso compreendem um ou mais nucleosídeo modificado (por exemplo, nucleosídeo que consiste em açúcar modificado e/ou nucleobase modificada) e/ou uma ou mais ligações de internucleosídeo modificado. O padrão dessas modificações em um oligonucleotídeo é referido aqui como um motivo. Em determinadas modalidades, os motivos de açúcar, nucleobase e ligação são independentes uns dos outros.

Determinados motivos de açúcar

[00578] Em determinadas modalidades, os oligonucleotídeos compreendem um ou mais tipos de frações de açúcar modificadas e/ou frações de açúcar de ocorrência natural dispostas ao longo do oligonucleotídeo ou da sua região em um padrão definido ou motivo de modificação do açúcar. Esses motivos podem incluir qualquer uma das modificações de açúcar discutidas aqui e/ou outras modificações de açúcar conhecidas.

[00579] Em determinadas modalidades, os oligonucleotídeos compreendem ou consistem em uma região que tem um motivo de açúcar de gapmer, que compreende duas regiões externas ou "asas" e uma região central ou interna ou "lacuna". As três regiões de um motivo de açúcar de gapmer (5'-asa, lacuna e 3'-asa) formam uma sequência contígua de nucleosídeos em que pelo menos algumas frações de açúcar dos nucleosídeos de cada uma das asas diferem de pelo menos algumas frações de açúcar dos nucleosídeos da lacuna. Especificamente, pelo menos as frações de açúcar dos nucleosídeos de cada asa que estão mais próximas da lacuna (o nucleosídeo mais próximo de 3' de 5'-asa e o nucleosídeo mais próximo de 5' de 3'-asa) diferem da porção de açúcar dos nucleosídeos da lacuna vizinha definindo, assim, o limite entre as asas e a lacuna. Em determinadas modalidades, as frações de açúcar dentro da lacuna são as mesmas. Em determinadas modalida-

des, a lacuna inclui um ou mais nucleosídeos com uma porção de açúcar que difere da porção de açúcar de um ou mais nucleosídeos da lacuna. Em determinadas modalidades, os motivos de açúcar das duas asas são os mesmos da outra (gapmer de açúcar simétrico). Em determinadas modalidades, os motivos de açúcar de 5'-asa difere do motivo de açúcar de 3'-asa (gapmer de açúcar assimétrico).

Determinadas 5'-asas

[00580] Em determinadas modalidades, 5'-asa de um gapmer consiste em 1 a 8 nucleosídeos ligados. Em determinadas modalidades, 5'-asa de um gapmer consiste em 1 a 7 nucleosídeos ligados. Em determinadas modalidades, 5'-asa de um gapmer consiste em 1 a 6 nucleosídeos ligados. Em determinadas modalidades, 5'-asa de um gapmer consiste em 1 a 5 nucleosídeos ligados. Em determinadas modalidades, 5'-asa de um gapmer consiste em 2 a 5 nucleosídeos ligados. Em determinadas modalidades, 5'-asa de um gapmer consiste em 3 a 5 nucleosídeos ligados. Em determinadas modalidades, 5'-asa de um gapmer consiste em 4 ou 5 nucleosídeos ligados. Em determinadas modalidades, 5'-asa de um gapmer consiste em 1 a 4 nucleosídeos ligados. Em determinadas modalidades, 5'-asa de um gapmer consiste em 1 a 3 nucleosídeos ligados. Em determinadas modalidades, 5'-asa de um gapmer consiste em 1 ou 2 nucleosídeos ligados. Em determinadas modalidades, 5'-asa de um gapmer consiste em 2 a 4 nucleosídeos ligados. Em determinadas modalidades, 5'-asa de um gapmer consiste em 2 ou 3 nucleosídeos ligados. Em determinadas modalidades, 5'-asa de um gapmer consiste em 3 ou 4 nucleosídeos ligados. Em determinadas modalidades, 5'-asa de um gapmer consiste em 1 nucleosídeo ligado. Em determinadas modalidades, 5'-asa de um gapmer consiste em 2 nucleosídeos ligados. Em determinadas modalidades, 5'-asa de um gapmer consiste em 3 nucleosídeos ligados. Em determinadas modalidades, 5'-

asa de um gapmer consiste em 4 nucleosídeos ligados. Em determinadas modalidades, 5'-asa de um gapmer consiste em 5 nucleosídeos ligados. Em determinadas modalidades, 5'-asa de um gapmer consiste em 6 nucleosídeos ligados.

[00581] Em determinadas modalidades, 5-asa de um gapmer compreende pelo menos um nucleosídeo bicíclico. Em determinadas modalidades, 5'-asa de um gapmer compreende pelo menos dois nucleosídeos bicíclicos. Em determinadas modalidades, 5'-asa de um gapmer compreende pelo menos três nucleosídeos bicíclicos. Em determinadas modalidades, 5'-asa de um gapmer compreende pelo menos quatro nucleosídeos bicíclicos. Em determinadas modalidades, 5-asa de um gapmer compreende pelo menos um nucleosídeo de etila restrita. Em determinadas modalidades, 5-asa de um gapmer compreende pelo menos um nucleosídeo LNA. Em determinadas modalidades, cada nucleosídeo de 5'-asa de um gapmer é um nucleosídeo bicíclico. Em determinadas modalidades, 5'-asa de um gapmer consiste em um nucleosídeo de etila restrita. Em determinadas modalidades, cada nucleosídeo de 5'-asa de um gapmer é um nucleosídeo LNA.

[00582] Em determinadas modalidades, 5'-asa de um gapmer compreende pelo menos um nucleosídeo modificado não bicíclico. Em determinadas modalidades, 5'-asa de um gapmer compreende pelo menos um nucleosídeo 2'-substituído. Em determinadas modalidades, 5'-asa de um gapmer compreende pelo menos um nucleosídeo 2'-MOE. Em determinadas modalidades, 5'-asa de um gapmer compreende pelo menos um nucleosídeo 2'-OMe. Em determinadas modalidades, cada nucleosídeo de 5'-asa de um gapmer é um nucleosídeo modificado não bicíclico. Em determinadas modalidades, cada nucleosídeo de 5'-asa de um gapmer é um nucleosídeo 2'-substituído. Em determinadas modalidades, cada nucleosídeo de 5'-asa de um gapmer é um nucleosídeo 2'-MOE. Em determinadas modalidades, cada nucleosídeo de 5'-asa de

um gapmer é um nucleosídeo 2'-OMe.

[00583] Em determinadas modalidades, 5'-asa de um gapmer compreende pelo menos um 2-desoxinucleosídeo. Em determinadas modalidades, cada nucleosídeo de 5'-asa de um gapmer é um 2'-desoxinucleosídeo. Em determinadas modalidades, 5'-asa de um gapmer compreende pelo menos um ribonucleosídeo. Em determinadas modalidades, cada nucleosídeo de 5'-asa de um gapmer é um ribonucleosídeo. Em determinadas modalidades, um, mais de um ou cada nucleosídeo de 5'-asa é um nucleosídeo similar ao RNA.

[00584] Em determinadas modalidades, 5'-asa de um gapmer compreende pelo menos um nucleosídeo bicíclico e pelo menos um nucleosídeo modificado não bicíclico. Em determinadas modalidades, 5'-asa de um gapmer compreende pelo menos um nucleosídeo bicíclico e pelo menos um nucleosídeo 2'-substituído. Em determinadas modalidades, 5'-asa de um gapmer compreende pelo menos um nucleosídeo bicíclico e pelo menos um nucleosídeo 2'-MOE. Em determinadas modalidades, 5'-asa de um gapmer compreende pelo menos um nucleosídeo bicíclico e pelo menos um nucleosídeo 2'-OMe. Em determinadas modalidades, 5'-asa de um gapmer compreende pelo menos um nucleosídeo bicíclico e pelo menos um 2'-desoxinucleosídeo.

[00585] Em determinadas modalidades, 5'-asa de um gapmer compreende pelo menos um nucleosídeo de etila restrito e pelo menos um nucleosídeo modificado não bicíclico. Em determinadas modalidades, 5'-asa de um gapmer compreende pelo menos um nucleosídeo de etila restrita e pelo menos um nucleosídeo 2'-substituído. Em determinadas modalidades, 5'-asa de um gapmer compreende pelo menos um nucleosídeo de etila restrita e pelo menos um nucleosídeo 2'-MOE. Em determinadas modalidades, 5'-asa de um gapmer compreende pelo menos um nucleosídeo de etila restrita e pelo menos um nucleosídeo 2'-OMe. Em determinadas modalidades, 5'-asa de um gapmer compreende pelo

menos um nucleosídeo de etila restrita e pelo menos um 2'-desoxinucleosídeo.

[00586] **Determinadas 3'-asas**

[00587] Em determinadas modalidades, 3'-asa de um gapmer consiste em 1 a 8 nucleosídeos ligados. Em determinadas modalidades, 3'-asa de um gapmer consiste em 1 a 7 nucleosídeos ligados. Em determinadas modalidades, 3'-asa de um gapmer consiste em 1 a 6 nucleosídeos ligados. Em determinadas modalidades, 3'-asa de um gapmer consiste em 1 a 5 nucleosídeos ligados. Em determinadas modalidades, 3'-asa de um gapmer consiste em 2 a 5 nucleosídeos ligados. Em determinadas modalidades, 3'-asa de um gapmer consiste em 3 a 5 nucleosídeos ligados. Em determinadas modalidades, 3'-asa de um gapmer consiste em 4 ou 5 nucleosídeos ligados. Em determinadas modalidades, 3'-asa de um gapmer consiste em 1 a 4 nucleosídeos ligados. Em determinadas modalidades, 3'-asa de um gapmer consiste em 1 a 3 nucleosídeos ligados. Em determinadas modalidades, 3'-asa de um gapmer consiste em 1 ou 2 nucleosídeos ligados. Em determinadas modalidades, 3'-asa de um gapmer consiste em 2 a 4 nucleosídeos ligados. Em determinadas modalidades, 3'-asa de um gapmer consiste em 2 ou 3 nucleosídeos ligados. Em determinadas modalidades, 3'-asa de um gapmer consiste em 3 ou 4 nucleosídeos ligados. Em determinadas modalidades, 3'-asa de um gapmer consiste em 1 nucleosídeo. Em determinadas modalidades, 3'-asa de um gapmer consiste em 2 nucleosídeos ligados. Em determinadas modalidades, 3'-asa de um gapmer consiste em 3 nucleosídeos ligados. Em determinadas modalidades, 3'-asa de um gapmer consiste em 4 nucleosídeos ligados. Em determinadas modalidades, 3'-asa de um gapmer consiste em 5 nucleosídeos ligados. Em determinadas modalidades, 3'-asa de um gapmer consiste em 6 nucleosídeos ligados.

[00588] Em determinadas modalidades, 3'-asa de um gapmer compreende pelo menos um nucleosídeo bicíclico. Em determinadas modalidades, 3'-asa de um gapmer compreende pelo menos um nucleosídeo de etila restrita. Em determinadas modalidades, 3'-asa de um gapmer compreende pelo menos um nucleosídeo LNA. Em determinadas modalidades, cada nucleosídeo de 3'-asa de um gapmer é um nucleosídeo bicíclico. Em determinadas modalidades, 3'-asa de um gapmer consiste em um nucleosídeo de etila restrita. Em determinadas modalidades, cada nucleosídeo de 3'-asa de um gapmer é um nucleosídeo LNA.

[00589] Em determinadas modalidades, 3'-asa de um gapmer compreende pelo menos um nucleosídeo modificado não bicíclico. Em determinadas modalidades, 3'-asa de um gapmer compreende pelo menos dois nucleosídeos modificados não bicíclicos. Em determinadas modalidades, 3'-asa de um gapmer compreende pelo menos três nucleosídeos modificados não bicíclicos. Em determinadas modalidades, 3'-asa de um gapmer compreende pelo menos quatro nucleosídeos modificados não bicíclicos. Em determinadas modalidades, 3'-asa de um gapmer compreende pelo menos um nucleosídeo 2'-substituído. Em determinadas modalidades, 3'-asa de um gapmer compreende pelo menos um nucleosídeo 2'-MOE. Em determinadas modalidades, 3'-asa de um gapmer compreende pelo menos um nucleosídeo 2'-OMe. Em determinadas modalidades, cada nucleosídeo de 3'-asa de um gapmer é um nucleosídeo modificado não bicíclico. Em determinadas modalidades, cada nucleosídeo de 3'-asa de um gapmer é um nucleosídeo 2'-substituído. Em determinadas modalidades, cada nucleosídeo de 3'-asa de um gapmer é um nucleosídeo 2'-MOE. Em determinadas modalidades, cada nucleosídeo de 3'-asa de um gapmer é um nucleosídeo 2'-OMe.

[00590] Em determinadas modalidades, 3'-asa de um gapmer compreende pelo menos um 2-desoxinucleosídeo. Em determinadas moda-

lidades, cada nucleosídeo de 3'-asa de um gapmer é um 2'-desoxinucleosídeo. Em determinadas modalidades, 3'-asa de um gapmer compreende pelo menos um ribonucleosídeo. Em determinadas modalidades, cada nucleosídeo de 3'-asa de um gapmer é um ribonucleosídeo. Em determinadas modalidades, um, mais de um ou cada nucleosídeo de 5'-asa é um nucleosídeo similar ao RNA.

[00591] Em determinadas modalidades, 3'-asa de um gapmer compreende pelo menos um nucleosídeo bicíclico e pelo menos um nucleosídeo modificado não bicíclico. Em determinadas modalidades, 3'-asa de um gapmer compreende pelo menos um nucleosídeo bicíclico e pelo menos um nucleosídeo 2'-substituído. Em determinadas modalidades, 3'-asa de um gapmer compreende pelo menos um nucleosídeo bicíclico e pelo menos um nucleosídeo 2'-MOE. Em determinadas modalidades, 3'-asa de um gapmer compreende pelo menos um nucleosídeo bicíclico e pelo menos um nucleosídeo 2'-OMe. Em determinadas modalidades, 3'-asa de um gapmer compreende pelo menos um nucleosídeo bicíclico e pelo menos um 2'-desoxinucleosídeo.

[00592] Em determinadas modalidades, 3'-asa de um gapmer compreende pelo menos um nucleosídeo de etila restrita e pelo menos um nucleosídeo modificado não bicíclico. Em determinadas modalidades, 3'-asa de um gapmer compreende pelo menos um nucleosídeo de etila restrita e pelo menos um nucleosídeo 2'-substituído. Em determinadas modalidades, 3'-asa de um gapmer compreende pelo menos um nucleosídeo bicíclico e pelo menos um nucleosídeo 2'-MOE. Em determinadas modalidades, 3'-asa de um gapmer compreende pelo menos um nucleosídeo de etila restrita e pelo menos um nucleosídeo 2'-OMe. Em determinadas modalidades, 3'-asa de um gapmer compreende pelo menos um nucleosídeo bicíclico e pelo menos um 2'-desoxinucleosídeo.

[00593] Em determinadas modalidades, 3'-asa de um gapmer compreende pelo menos um nucleosídeo LNA e pelo menos um nucleosídeo

modificado não bicíclico. Em determinadas modalidades, 3'-asa de um gapmer compreende pelo menos um nucleosídeo LNA e pelo menos um nucleosídeo 2'-substituído. Em determinadas modalidades, 3'-asa de um gapmer compreende pelo menos um nucleosídeo LNA e pelo menos um nucleosídeo 2'-MOE. Em determinadas modalidades, 3'-asa de um gapmer compreende pelo menos um nucleosídeo LNA e pelo menos um nucleosídeo 2'-OMe. Em determinadas modalidades, 3'-asa de um gapmer compreende pelo menos um nucleosídeo LNA e pelo menos um 2'-desoxinucleosídeo.

[00594] Em determinadas modalidades, 3'-asa de um gapmer compreende pelo menos um nucleosídeo bicíclico, pelo menos um nucleosídeo modificado não bicíclico e pelo menos um 2'-desoxinucleosídeo. Em determinadas modalidades, 3'-asa de um gapmer compreende pelo menos um nucleosídeo de etila restrita, pelo menos um nucleosídeo modificado não bicílico e pelo menos um 2'-desoxinucleosídeo. Em determinadas modalidades, 3'-asa de um gapmer compreende pelo menos um nucleosídeo LNA, pelo menos um nucleosídeo modificado não bicíclico e pelo menos um 2'-desoxinucleosídeo.

[00595] Em determinadas modalidades, 3'-asa de um gapmer compreende pelo menos um nucleosídeo bicíclico, pelo menos um nucleosídeo 2'-substituído e pelo menos um 2'-desoxinucleosídeo. Em determinadas modalidades, 3'-asa de um gapmer compreende pelo menos um nucleosídeo de etila restrita, pelo menos um nucleosídeo 2'-substituído e pelo menos um 2'-desoxinucleosídeo. Em determinadas modalidades, 3'-asa de um gapmer compreende pelo menos um nucleosídeo LNA, pelo menos um nucleosídeo 2'-substituído e pelo menos um 2'-desoxinucleosídeo.

[00596] Em determinadas modalidades, 3'-asa de um gapmer compreende pelo menos um nucleosídeo bicíclico, pelo menos um nucleosídeo 2'-MOE e pelo menos um 2'-desoxinucleosídeo. Em determinadas

modalidades, 3'-asa de um gapmer compreende pelo menos um nucleosídeo de etila restrita, pelo menos um nucleosídeo 2'-MOE e pelo menos um 2'-desoxinucleosídeo. Em determinadas modalidades, 3'-asa de um gapmer compreende pelo menos um nucleosídeo LNA, pelo menos um nucleosídeo 2'-MOE e pelo menos um 2'-desoxinucleosídeo.

[00597] Em determinadas modalidades, 3'-asa de um gapmer compreende pelo menos um nucleosídeo bicíclico, pelo menos um nucleosídeo 2'-OMe e pelo menos um 2'-desoxinucleosídeo. Em determinadas modalidades, 3'-asa de um gapmer compreende pelo menos um nucleosídeo de etila restrita, pelo menos um nucleosídeo 2'-OMe e pelo menos um 2'-desoxinucleosídeo. Em determinadas modalidades, 3'-asa de um gapmer compreende pelo menos um nucleosídeo LNA, pelo menos um nucleosídeo 2'-OMe e pelo menos um 2'-desoxinucleosídeo.

Certas Regiões Centrais (lacunas)

[00598] Em determinadas modalidades, a lacuna de um gapmer consiste em 6 a 20 nucleosídeos ligados. Em determinadas modalidades, a lacuna de um gapmer consiste em 6 a 15 nucleosídeos ligados. Em determinadas modalidades, a lacuna de um gapmer consiste em 6 a 12 nucleosídeos ligados. Em determinadas modalidades, a lacuna de um gapmer consiste em 6 a 10 nucleosídeos ligados. Em determinadas modalidades, a lacuna de um gapmer consiste em 6 a 9 nucleosídeos ligados. Em determinadas modalidades, a lacuna de um gapmer consiste em 6 a 8 nucleosídeos ligados. Em determinadas modalidades, a lacuna de um gapmer consiste em 6 ou 7 nucleosídeos ligados. Em determinadas modalidades, a lacuna de um gapmer consiste em 7 a 10 nucleosídeos ligados. Em determinadas modalidades, a lacuna de um gapmer consiste em 7 a 9 nucleosídeos ligados. Em determinadas modalidades, a lacuna de um gapmer consiste em 7 ou 8 nucleosídeos ligados. Em determinadas modalidades, a lacuna de um gapmer consiste em 8 a 10 nucleosídeos ligados. Em determinadas modalidades, a lacuna de um

gapmer consiste em 8 ou 9 nucleosídeos ligados. Em determinadas modalidades, a lacuna de um gapmer consiste em 6 nucleosídeos ligados. Em determinadas modalidades, a lacuna de um gapmer consiste em 7 nucleosídeos ligados. Em determinadas modalidades, a lacuna de um gapmer consiste em 8 nucleosídeos ligados. Em determinadas modalidades, a lacuna de um gapmer consiste em 9 nucleosídeos ligados. Em determinadas modalidades, a lacuna de um gapmer consiste em 10 nucleosídeos ligados. Em determinadas modalidades, a lacuna de um gapmer consiste em 11 nucleosídeos ligados. Em determinadas modalidades, a lacuna de um gapmer consiste em 12 nucleosídeos ligados.

[00599] Em determinadas modalidades, cada nucleosídeo da lacuna de um gapmer é um 2’-desoxinucleosídeo. Em certas modalidades, a lacuna compreende um ou mais nucleosídeos modificados. Em determinadas modalidades, cada nucleosídeo da lacuna de um gapmer é um 2’-desoxinucleosídeo ou é um nucleosídeo modificado que é "similar ao DNA". Em tais modalidades, "similar ao DNA" significa que o nucleosídeo tem características semelhantes ao DNA, de forma que um duplex compreendendo o gapmer e uma molécula de RNA é capaz de ativar a RNase H. Por exemplo, sob certas condições, 2'-(ara)-F tem demonstrado suportar a ativação de RNase H e, assim, é similar ao DNA. Em determinadas modalidades, um ou mais nucleosídeos da lacuna de um gapmer não é um 2’-desoxinucleosídeo e não é similar ao DNA. Em algumas dessas modalidades, o gapmer, no entanto, suporta a ativação RNase H (por exemplo, devido ao número ou a colocação dos nucleosídeos não DNA).

[00600] Em determinadas modalidades, as lacunas compreendem um trecho de não modificado de 2’-desoxinucleosídeo interrompido por um ou mais nucleosídeos modificados, resultando assim em três subregiões (dois trechos de um ou mais 2’-desoxinucleosídeo e um trecho

de um ou mais nucleosídeos modificados interruptores). Em determinadas modalidades, nenhum trecho de 2’-desoxinucleosídeos não modificados tem mais do que 5, 6 ou 7 nucleosídeos. Em determinadas modalidades, tais trechos curtos são obtidos usando as regiões lacuna curta. Em determinadas modalidades, os trechos curtos são obtidos através da interrupção de uma região de lacuna mais comprida.

[00601] Em determinadas modalidades, a lacuna compreende um ou mais nucleosídeos modificados. Em determinadas modalidades, a lacuna compreende um ou mais nucleosídeos modificados, selecionados dentre cEt, FHNA, LNA, e 2-tio-timidina. Em determinadas modalidades, a lacuna compreende um nucleosídeo modificado. Em determinadas modalidades, a lacuna compreende uma porção de açúcar 5’-substituída selecionada dentre 5’-Me e 5'-(R)-Me. Em determinadas modalidades, a lacuna compreende dois nucleosídeos modificados. Em determinadas modalidades, a lacuna compreende três nucleosídeos modificados. Em determinadas modalidades, a lacuna compreende quatro nucleosídeos modificados. Em determinadas modalidades, a lacuna compreende dois ou mais nucleosídeos modificados e cada nucleosídeo modificado é o mesmo. Em determinadas modalidades, a lacuna compreende dois ou mais nucleosídeos modificados e cada nucleosídeo modificado é diferente.

[00602] Em determinadas modalidades, a lacuna compreende uma ou mais ligações modificadas. Em determinadas modalidades, a lacuna compreende uma ou mais ligações de fosfonato de metil. Em determinadas modalidades, a lacuna compreende duas ou mais ligações modificadas. Em certas modalidades, a lacuna compreende uma ou mais ligações modificadas e um ou mais nucleosídeos modificados. Em determinadas modalidades, a lacuna compreende uma ligação modificada e um nucleosídeo modificado. Em certas modalidades, a lacuna compre-

ende duas ligações modificadas e dois ou mais nucleosídeos modificados.

Determinadas Motivos de Ligação Internucleosídica

[00603] Em determinadas modalidades, oligonucleotídeos compõem ligações de internucleosídeo modificado dispostas ao longo do oligonucleotídeo, ou região do mesmo, em um padrão definido ou motivo de ligação de internucleosídeo modificado. Em determinadas modalidades, os oligonucleotídeos compreendem uma região com um motivo de ligação de internucleosídeo alternado. Em determinadas modalidades, os oligonucleotídeos da presente divulgação compreendem uma região de ligações de internucleosídeo uniformemente modificado. Em algumas dessas modalidades, o oligonucleotídeo compreende uma região que é uniformemente ligada por ligações de internucleosídeo de fosforotioato. Em determinadas modalidades, o oligonucleotídeo é uniformemente ligado por ligações de internucleosídeo de fosforotioato. Em determinadas modalidades, cada ligação de internucleosídeo do oligonucleotídeo é selecionada de fosfodiéster e fosforotioato. Em determinadas modalidades, cada liagação de internucleosídeo do oligonucleotídeo é selecionado de fosfodiéster e fosforotioato e pelo menos uma ligação de internucleosídeo é fosforotioato.

[00604] Em determinadas modalidades, o oligonucleotídeo compreende pelo menos 6 ligações de internucleosídeo fosforotioato. Em determinadas modalidades, o oligonucleotídeo compreende pelo menos 7 ligações de internucleosídeo fosforotioato. Em determinadas modalidades, o oligonucleotídeo compreende pelo menos 8 ligações de internucleosídeo fosforotioato. Em determinadas modalidades, o oligonucleotídeo compreende pelo menos 9 ligações de internucleosídeo fosforotioato. Em determinadas modalidades, o oligonucleotídeo compreende pelo menos 10 ligações de internucleosídeo fosforotioato. Em determi-

nadas modalidades, o oligonucleotídeo compreende pelo menos 11 ligações de internucleosídeo fosforotioato. Em determinadas modalidades, o oligonucleotídeo compreende pelo menos 12 ligações de internucleosídeo fosforotioato. Em determinadas modalidades, o oligonucleotídeo compreende pelo menos 13 ligações de internucleosídeo fosforotioato. Em determinadas modalidades, o oligonucleotídeo compreende pelo menos 14 ligações de internucleosídeo fosforotioato.

[00605] Em determinadas modalidades, o oligonucleotídeo compreende pelo menos um bloco de, pelo menos, 6 ligações consecutivas de internucleosídeo fosforotioato. Em determinadas modalidades, o oligonucleotídeo compreende pelo menos um bloco de, pelo menos, 7 ligações consecutivas de internucleosídeo fosforotioato. Em determinadas modalidades, o oligonucleotídeo compreende pelo menos um bloco de, pelo menos, 8 ligações consecutivas de internucleosídeo fosforotioato. Em determinadas modalidades, o oligonucleotídeo compreende pelo menos um bloco de, pelo menos, 9 ligações consecutivas de internucleosídeo fosforotioato. Em determinadas modalidades, o oligonucleotídeo compreende pelo menos um bloco de, pelo menos, 10 ligações consecutivas de internucleosídeo fosforotioato. Em determinadas modalidades, o oligonucleotídeo compreende pelo menos um bloco de, pelo menos, 12 ligações consecutivas de internucleosídeo fosforotioato. Nestas determinadas modalidades, pelo menos um destes blocos está localizado na extremidade 3' do oligonucleotídeo. Nestas determinadas modalidades, pelo menos um destes blocos está localizado dentro de 3 nucleosídeos da extremidade 3' do oligonucleotídeo. Em determinadas modalidades, o oligonucleotídeo compreende menos de 15 ligações de internucleosídeo fosforotioato. Em determinadas modalidades, o oligonucleotídeo compreende menos do que 14 ligações de internucleosídeo fosforotioato. Em determinadas modalidades, o oligonucleotídeo compreende menos do que 13 ligações de internucleosídeo fosforotioato.

Em determinadas modalidades, o oligonucleotídeo compreende menos do que 12 ligações de internucleosídeo fosforotioato. Em determinadas modalidades, o oligonucleotídeo compreende menos do que 11 ligações de internucleosídeo fosforotioato. Em determinadas modalidades, o oligonucleotídeo compreende menos do que 10 ligações de internucleosídeo fosforotioato. Em determinadas modalidades, o oligonucleotídeo compreende menos do que 9 ligações de internucleosídeo fosforotioato. Em determinadas modalidades, o oligonucleotídeo compreende menos do que 8 ligações de internucleosídeo fosforotioato. Em determinadas modalidades, o oligonucleotídeo compreende menos do que 7 ligações de internucleosídeo fosforotioato. Em determinadas modalidades, o oligonucleotídeo compreende menos do que 6 ligações de internucleosídeo fosforotioato. Em determinadas modalidades, o oligonucleotídeo compreende menos do que 5 ligações de internucleosídeo fosforotioato.

Determinados Motivos de Modificação da Nucleobase

[00606] Em determinadas modalidades, os oligonucleotídeos compreendem modificações químicas da nucleobase dispostas ao longo do oligonucleotídeo, ou região do mesmo, em um padrão definido ou motivo de modificação de nucleobases. Em determinadas modalidades, as modificações de nucleobase são dispostas em um motivo de gapmer. Em determinadas modalidades, as modificações de nucleobase são dispostas em um motivo alternado. Em certas modalidades, cada nucleobase é modificada. Em determinadas modalidades, nenhuma das nucleobases é quimicamente modificada.

[00607] Em determinadas modalidades, os oligonucleotídeos compreendem um bloco de nucleobases modificadas. Nestas determinadas modalidades, o bloco está na extremidade 3' do oligonucleotídeo. Em determinadas modalidades o bloco está dentro de 3 nucleotídeos da extremidade 3’ do oligonucleotídeo. Nestas determinadas modalidades, o

bloco está na extremidade 5' do oligonucleotídeo. Em determinadas modalidades o bloco está dentro de 3 nucleotídeos da extremidade 5’ do oligonucleotídeo.

[00608] Em determinadas modalidades, as modificações de nucleobase são uma função da base natural em uma posição específica do oligonucleotídeo. Por exemplo, em determinadas modalidades cada purina ou cada pirimidina em um oligonucleotídeo é modificada. Em certas modalidades, cada adenina é modificada. Em certas modalidades, cada guanina é modificada. Em certas modalidades, cada timina é modificada. Em certas modalidades, cada citosina é modificada. Em certas modalidades, cada uracila é modificada.

[00609] Em determinadas modalidades, algumas, todas, ou nenhuma das frações de citosina em um oligonucleotídeo são frações de 5-metilcitosina . Aqui, 5-metilcitosina não é uma "nucleobase modificada." Nesse sentido, a menos que indicado de outra forma, as nucleobases sem modificações incluem ambos os resíduos de citosina com uma 5-metila e aqueles que faltando uma 5-metila. Em determinadas modalidades, o estado de metilação de todas ou algumas nucleobases da citosina é especificado.

[00610] Em determinadas modalidades, modificações químicas das nucleobases compreendem a fixação de determinados grupos de conjugado de nucleobases. Em determinadas modalidades, cada purina ou cada pirimidina em um oligonucleotídeo pode ser modificada, opcionalmente, para compreender um grupo conjugado.

Determinados Comprimentos Totais

[00611] Em determinadas modalidades, a presente divulgação fornece oligonucleotídeos de qualquer dentre uma variedade de intervalos de comprimentos. Em determinadas modalidades, os oligonucleotídeos consistem em nucleosídeos ligados de X a Y, onde X representa o menor número de nucleosídeos no intervalo e Y representa o maior número

de nucleosídeos no intervalo. Em determinadas dessas modalidades, X e Y são cada um, independentemente, selecionados de 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 e 50; desde que X$\leqslant$Y. Por exemplo, em determinadas modalidades, o oligonucleotídeo pode consistir em 8 a 9, 8 a 10, 8 a 11, 8 a 12, 8 a 13, 8 a 14, 8 a 15, 8 a 16, 8 a 17, 8 a 18, 8 a 19, 8 a 20, 8 a 21, 8 a 22, 8 a 23, 8 a 24, 8 a 25, 8 a 26, 8 a 27, 8 a 28, 8 a 29, 8 a 30, 9 a 10, 9 a 11, 9 a 12, 9 a 13, 9 a 14, 9 a 15, 9 a 16, 9 a 17, 9 a 18, 9 a 19, 9 a 20, 9 a 21, 9 a 22, 9 a 23, 9 a 24, 9 a 25, 9 a 26, 9 a 27, 9 a 28, 9 a 29, 9 a 30, 10 a 11, 10 a 12, 10 a 13, 10 a 14, 10 a 15, 10 a 16, 10 a 17, 10 a 18, 10 a 19, 10 a 20, 10 a 21, 10 a 22, 10 a 23, 10 a 24, 10 a 25, 10 a 26, 10 a 27, 10 a 28, 10 a 29, 10 a 30, 11 a 12, 11 a 13, 11 a 14, 11 a 15, 11 a 16, 11 a 17, 11 a 18, 11 a 19, 11 a 20, 11 a 21, 11 a 22, 11 a 23, 11 a 24, 11 a 25, 11 a 26, 11 a 27, 11 a 28, 11 a 29, 11 a 30, 12 a 13, 12 a 14, 12 a 15, 12 a 16, 12 a 17, 12 a 18, 12 a 19, 12 a 20, 12 a 21, 12 a 22, 12 a 23, 12 a 24, 12 a 25, 12 a 26, 12 a 27, 12 a 28, 12 a 29, 12 a 30, 13 a 14, 13 a 15, 13 a 16, 13 a 17, 13 a 18, 13 a 19, 13 a 20, 13 a 21, 13 a 22, 13 a 23, 13 a 24, 13 a 25, 13 a 26, 13 a 27, 13 a 28, 13 a 29, 13 a 30, 14 a 15, 14 a 16, 14 a 17, 14 a 18, 14 a 19, 14 a 20, 14 a 21, 14 a 22, 14 a 23, 14 a 24, 14 a 25, 14 a 26, 14 a 27, 14 a 28, 14 a 29, 14 a 30, 15 a 16, 15 a 17, 15 a 18, 15 a 19, 15 a 20, 15 a 21, 15 a 22, 15 a 23, 15 a 24, 15 a 25, 15 a 26, 15 a 27, 15 a 28, 15 a 29, 15 a 30, 16 a 17, 16 a 18, 16 a 19, 16 a 20, 16 a 21, 16 a 22, 16 a 23, 16 a 24, 16 a 25, 16 a 26, 16 a 27, 16 a 28, 16 a 29, 16 a 30, 17 a 18, 17 a 19, 17 a 20, 17 a 21, 17 a 22, 17 a 23, 17 a 24, 17 a 25, 17 a 26, 17 a 27, 17 a 28, 17 a 29, 17 a 30, 18 a 19, 18 a 20, 18 a 21, 18 a 22, 18 a 23, 18 a 24, 18 a 25, 18 a 26, 18 a 27, 18 a 28, 18 a 29, 18 a 30, 19 a 20, 19 a 21, 19 a 22, 19 a 23, 19 a 24, 19 a 25, 19 a 26, 19 a 29, 19 a 28, 19 a 29, 19 a 30, 20 a 21, 20 a 22, 20 a 23, 20 a 24, 20 a 25, 20 a

26, 20 a 27, 20 a 28, 20 a 29, 20 a 30, 21 a 22, 21 a 23, 21 a 24, 21 a 25, 21 a 26, 21 a 27, 21 a 28, 21 a 29, 21 a 30, 22 a 23, 22 a 24, 22 a 25, 22 a 26, 22 a 27, 22 a 28, 22 a 29, 22 a 30, 23 a 24, 23 a 25, 23 a 26, 23 a 27, 23 a 28, 23 a 29, 23 a 30, 24 a 25, 24 a 26, 24 a 27, 24 a 28, 24 a 29, 24 a 30, 25 a 26, 25 a 27, 25 a 28, 25 a 29, 25 a 30, 26 a 27, 26 a 28, 26 a 29, 26 a 30, 27 a 28, 27 a 29, 27 a 30, 28 a 29, 28 a 30, ou 29 a 30 nucleosídeos ligados. Em modalidades onde o número de nucleosídeos do oligonucleotídeo de um composto é limitado, seja para um intervalo ou para um número específico, o composto pode, no entanto, compreender adicionalmente outros substituintes adicionais. Por exemplo, um oligonucleotídeo compreendendo de 8-30 nucleosídeos exclui os oligonucleotídeos com 31 nucleosídeos, mas, salvo indicação em contrário, este um oligonucleotídeo pode ainda incluir, por exemplo, um ou mais grupos de conjugado, grupos terminais ou outros substituintes.

[00612] Além disso, onde um oligonucleotídeo é descrito por um intervalo de comprimento total e por regiões com comprimentos específicos, e onde a soma dos comprimentos especificados das regiões é menor que o limite superior do intervalo do comprimento total, podendo o oligonucleotídeo ter nucleosídeos adicionais, além daqueles das regiões determinadas, desde que o número total de nucleosídeos não exceda o limite superior do intervalo do comprimento total.

Determinados Motivos Químicos do Oligonucleotídeo Antissenso

[00613] Em determinadas modalidades, as características estruturais químicas dos oligonucleotídeos antissenso caracterizam-se por seu motivo de açúcar, motivo de ligação internucleosídeo, motivo de modificação de nucleobase e comprimento total. Em determinadas modalidades, estes parâmetros são independentes um do outro. Assim, cada ligação de internucleosídeo do oligonucleotídeo tendo um motivo de açúcar de gapmer pode ser modificada ou não modificada e pode ou não

seguir o padrão de modificação de gapmer das modificações de açúcar. Assim, as ligações de internucleosídeo dentro das regiões asa de um açúcar-gapmer podem ser as mesmas ou podem ser diferentes uma da outra e podem ser as mesmas ou diferentes das ligações de internucleosídeo da região de lacuna. Da mesma forma, estes oligonucleotídeos de açúcar-gapmer podem incluir uma ou mais nucleobase modificada independente do padrão gapmer das modificações de açúcar. Alguém versado na técnica observará que estes motivos podem ser combinados para criar uma variedade de oligonucleotídeos.

[00614] Em determinadas modalidades, a seleção da ligação de internucleosídeo e modificação de nucleosídeos não são independentes uma da outra.

Determinadas Sequências e Alvos

[00615] Em determinadas modalidades, a invenção fornece oligonucleotídeos antissenso tendo uma sequência complementar a um ácido nucleico alvo. Estes compostos antissenso são capazes de hibridar a um ácido nucleico alvo, resultando em, pelo menos, uma atividade antissenso. Em determinadas modalidades, os compostos antissenso hibridizam especificamente a um ou mais ácido nucleico alvo. Em determinadas modalidades, um composto antissenso hibridizante especificamente tem uma sequência de nucleobase compreendendo uma região com complementaridade suficiente para que um ácido nucleico alvo permita a hibridação e resulte em atividade antissenso e complementaridade insuficiente para qualquer não alvo, para evitar ou reduzir a hibridação inespecífica das sequências de ácidos nucleicos não alvo nas condições em que a hibridação específica é desejada (por exemplo, sob condições fisiológicas para in vivo ou usos terapêuticos, e em condições em que os ensaios são realizados em caso de ensaios in vitro). Em determinadas modalidades, os oligonucleotídeos são selecionados entre um alvo e não alvo, apesar de ambos alvo e não alvo compreenderem

a sequência alvo. Nestas modalidades, a seletividade pode resultar da acessibilidade relativa da região alvo de uma molécula de ácido nucleico em comparação com o outro.

[00616] Em determinadas modalidades, a presente divulgação fornece compostos antissenso compreendendo os oligonucleotídeos que são totalmente complementares ao ácido nucleico alvo em toda a extensão do oligonucleotídeo. Em determinadas modalidades, os oligonucleotídeos são 99% complementares ao ácido nucleico alvo. Em determinadas modalidades, os oligonucleotídeos são 95% complementares ao ácido nucleico alvo. Em determinadas modalidades, estes oligonucleotídeos são 90% complementares ao ácido nucleico alvo.

[00617] Em determinadas modalidades, estes oligonucleotídeos são 85% complementares ao ácido nucleico alvo. Em determinadas modalidades, estes oligonucleotídeos são 80% complementares ao ácido nucleico alvo. Em determinadas modalidades, um composto antissenso compreende uma região que é totalmente complementar ao ácido nucleico alvo e é, pelo menos, 80% complementar ao ácido nucleico alvo em todo o comprimento do oligonucleotídeo. Nestas determinadas modalidades, a região de complementaridade plena é de 6 a 14 nucleobases de comprimento.

[00618] Em determinadas modalidades, os oligonucleotídeos compreendem uma região hibridizante e uma terminal. Nestas determinadas modalidades, a região hibridizante consiste em 12-30 nucleosídeos ligados e é totalmente complementar ao ácido nucleico alvo. Em determinadas modalidades, a região hibridizante inclui uma incompatibilidade em relação ao ácido nucleico alvo. Em determinadas modalidades, a região hibridizante inclui duas incompatibilidades em relação ao ácido nucleico alvo. Em determinadas modalidades, a região hibridizante inclui três incompatibilidades em relação ao ácido nucleico alvo. Em determinadas modalidade, a região terminal consiste em 1-4 nucleosídeos

terminais. Em determinadas modalidades, os nucleosídeos terminais estão na extremidade 3'. Em determinadas modalidades, um ou mais dos nucleosídeos terminais não são complementares ao ácido nucleico alvo.

[00619] Os mecanismos antissenso incluem qualquer mecanismo que envolva a hibridação de um oligonucleotídeo com ácido nucleico alvo, em que a hibridização resulta em um efeito biológico. Em determinadas modalidades, esses resultados de hibridação na degradação do ácido nucleico alvo ou na ocupação com inibição ou estimulação concomitantes da maquinaria celular envolvendo, por exemplo, translação, transcrição ou junção do ácido nucleico alvo.

[00620] Um tipo de mecanismo antissenso envolvendo a degradação do RNA alvo é antissenso mediado por RNase H. RNase H é uma endonuclease celular que cliva a fita de RNA de um duplex de DNA. É conhecido na técnica que os compostos antissenso de fita única que são "similares ao DNA" eliciam atividade de RNase H nas células de mamíferos. A ativação de RNase H, portanto, resulta na clivagem do RNA alvo, aumentando, assim, a eficiência da inibição mediada por oligonucleotídeo similar ao DNA da expressão do gene.

[00621] Em determinadas modalidades, um grupo de conjugado compreende uma porção clivável. Em determinadas modalidades, um grupo de conjugado compreende uma ou mais ligação clivável. Em determinadas modalidades, um grupo de conjugado compreende um ligante. Em determinadas modalidades, um ligante compreende uma porção ligante de proteínas. Em determinadas modalidades, um grupo de conjugado compreende uma porção de direcionamento de célula (também referido como um grupo de direcionamento de célula). Em determinadas modalidades uma porção de direcionamento de célula compreende um grupo ramificado. Em determinadas modalidades, uma porção de direcionamento de célula compreende uma ou mais correntes. Em

determinadas modalidades, uma porção de direcionamento de célula compreende um carboidrato ou agrupamento de carboidratos.

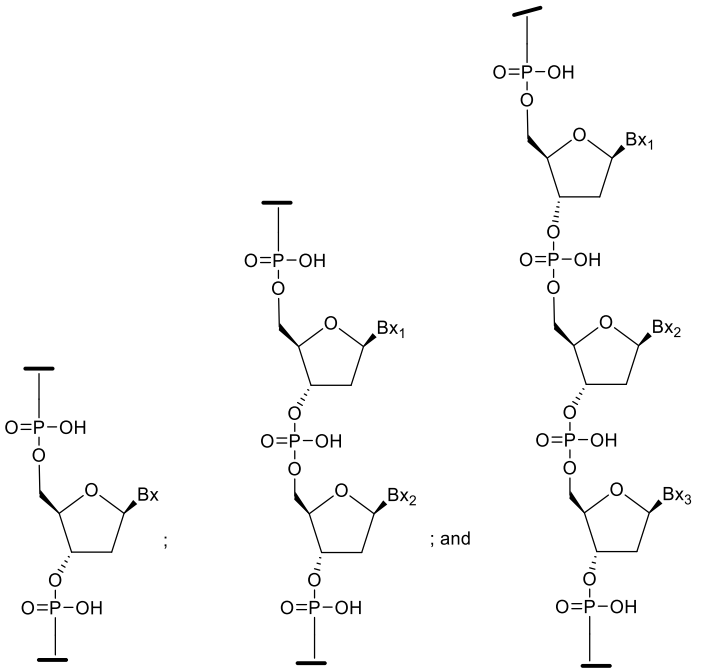
Determinadas Frações Cliváveis

[00622] Em determinadas modalidades, uma porção clivável é uma ligação clivável. Em determinadas modalidades, uma porção clivável compreende uma ligação clivável. Em determinadas modalidades, o grupo de conjugado compreende uma porção clivável. Nestas determinadas modalidades, a porção clivável é afixada ao oligonucleotídeo antissenso. Nestas determinadas modalidades, a porção clivável é afixada diretamente a porção de direcionamento de célula. Nestas determinadas modalidades, a porção clivável é afixada ao ligante conjugado. Em determinadas modalidades, a porção compreende um fosfato ou fosfodiéster. Em determinadas modalidades, a porção clivável é um nucleosídeo clivável ou nucleosídeo análogo. Em determinadas modalidades, o nucleosídeo ou nucleosídeo análogo compreende uma base heterocíclica opcionalmente protegida, selecionada a partir de uma purina, purina substituída, pirimidina ou pirimidina substituída. Em determinadas modalidades, a porção clivável é um nucleosídeo que compreende uma base heterocíclica opcionalmente protegida selecionada de uracil, timina, citosina, 4-N-benzoilcitosina, 5-metilcitosina, 4-N-benzoil-5-metilcitosina, adenina, 6-N-benzoiladenina, guanina e 2-N-isobutirilguanina. Em determinadas modalidades, a porção clivável é 2'-desoxinucleosídeo que é afixado à posição 3' do oligonucleotídeo antissenso por uma ligação fosfodiéster e é afixado ao ligante por uma ligação de fosfodiéster ou fosforotioato. Em determinadas modalidades, a porção clivável é 2'-desoxi adenosina que é afixada à posição 3' do oligonucleotídeo antissenso por uma ligação de fosfodiéster e é afixada ao ligante por uma ligação fosfodiéster ou fosforotioato. Em determinadas modalidades, a porção clivável é 2'-desoxi adenosina que é afixado à posição 3'

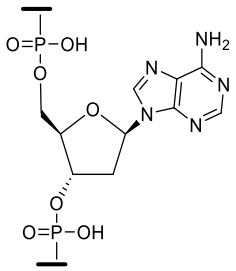
do oligonucleotídeo antissenso por uma ligação de fosfodiéster e é afixado ao ligante por uma ligação de fosfodiéster.

[00623] Em determinadas modalidades, a porção clivável é afixada à posição 3' do oligonucleotídeo antissenso. Nestas determinadas modalidades, a porção clivável é afixada à posição 5' do oligonucleotídeo antissenso. Em determinadas modalidades, a porção clivável é afixada à posição 2' do oligonucleotídeo antissenso. Em determinadas modalidades, a porção clivável é anexado ao oligonucleotídeo antissenso por uma ligação fosfodiéster. Em determinadas modalidades, a porção clivável é afixada ao ligante por uma ligação fosforotioato ou um fosfodiéster. Em determinadas modalidades, a porção clivável é afixado ao ligante por uma ligação de fosfodiéster. Em determinadas modalidades, o grupo de conjugado não inclui uma porção clivável.

[00624] Em determinadas modalidades, a porção clivável é clivada depois que o complexo foi administrado a um animal somente após ser interiorizado por uma célula alvo. Dentro da célula a porção clivável é clivada liberando, desta forma, o oligonucleotídeo antissenso ativo. Embora não seja destinado a ser limitado pela teoria, acredita-se que a porção clivável é clivada por uma ou mais nucleases dentro da célula. Em determinadas modalidades, a uma ou mais nucleases clivam a ligação de fosfodiéster entre a porção clivável e o ligante. Em determinadas modalidades, a porção clivável tem uma estrutura selecionada dentre os seguintes:



[00625] em que cada um dos Bx, Bx_1, Bx_2, e Bx_3 é independentemente uma porção de heterocíclica. Em determinadas modalidades, a porção clivável tem uma estrutura selecionada dentre os seguintes:



Determinados Ligantes

[00626] Em determinadas modalidades, os grupos de conjugado compreendem um ligante. Em algumas dessas modalidades, o ligante está covalentemente ligado à porção clivável. Em algumas dessas modalidades, o ligante está covalentemente ligado ao oligonucleotídeo antissenso. Em determinadas modalidades, o ligante está covalentemente ligado a uma porção direcionadora da célula. Em determinadas modalidades, o ligante compreende ainda uma ligação covalente com um suporte sólido. Em determinadas modalidades, o ligante compreende ainda uma ligação covalente com uma porção de ligação de proteínas.

Em determinadas modalidades, o ligante compreende ainda uma ligação covalente com um suporte sólido e compreende ainda uma porção de ligação de proteínas. Em determinadas modalidades, o ligante inclui várias posições para anexação dos ligantes fixados. Em determinadas modalidades, o ligante inclui várias posições para anexação dos ligantes fixados e não está anexado a um grupo de ramificação. Em determinadas modalidades, o ligante compreende ainda uma ou mais ligação clivável. Em determinadas modalidades, o grupo de conjugado não inclui um ligante.

[00627] Em determinadas modalidades, o ligante inclui pelo menos um grupo linear compreendendo grupos selecionados de grupos alquila, amida, dissulfeto, polietilenoglicol, éter, tioéter (-S-) e hidroxilamino (-O-N(H)-). Em determinadas modalidades, o grupo linear compreende grupos selecionados a partir de grupos alquila, amida e éter. Em determinadas modalidades, o grupo linear compreende grupos selecionados a partir de grupos alquila e éter. Em determinadas modalidades, o grupo linear compreende pelo menos um grupo de ligação fósforo. Em determinadas modalidades, o grupo linear compreende pelo menos um grupo fosfodiéster. Em determinadas modalidades, o grupo linear inclui pelo menos um grupo ligante neutro. Em determinadas modalidades, o grupo linear está covalentemente anexado à porção de célula-alvo e à porção clivável. Em determinadas modalidades, o grupo linear está covalentemente anexado à porção de célula-alvo e ao oligonucleotídeo antissenso. Em determinadas modalidades, o grupo linear está covalentemente anexado à porção de célula-alvo, à porção clivável e a um suporte sólido. Em determinadas modalidades, o grupo linear está covalentemente anexado à porção de célula-alvo, à porção clivável, a um suporte sólido a uma porção ligante de proteína. Em determinadas modalidades, o grupo linear inclui uma ou mais ligações cliváveis.

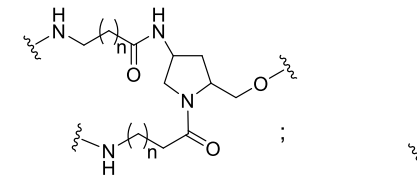
[00628] Em determinadas modalidades, o ligante inclui o grupo linear

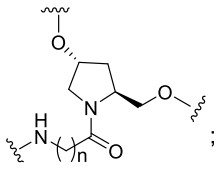
covalentemente anexado a um grupo andaime (scaffold). Em determinadas modalidades, o andaime inclui um grupo alifático ramificado compreendendo grupos selecionados de alquil amida, bissulfeto, polietilenoglicol, éter, grupos tioéter e hidroxilamina. Em determinadas modalidades, o andaime inclui um grupo alifático ramificado compreendendo grupos selecionados a partir de grupos alquila, amida e éter. Em determinadas modalidades, o andaime inclui pelo menos um sistema de anéis mono ou policíclico. Em determinadas modalidades, o andaime inclui pelo menos dois sistemas de anel mono ou policíclico. Em determinadas modalidades, o grupo linear é covalentemente anexado ao grupo andaime e o grupo andaime é covalentemente anexado à porção clivável e ao ligante. Em determinadas modalidades, o grupo linear está covalentemente anexado ao grupo andaime e o grupo andaime está covalentemente anexado à porção clivável, ao ligante e ao suporte sólido. Em determinadas modalidades, o grupo linear está covalentemente anexado ao grupo andaime e o grupo andaime está covalentemente anexado à porção e a um grupo ligante de proteína. Em determinadas modalidades, o grupo linear está covalentemente ligado ao grupo andaime e o grupo andaime está covalentemente anexado à porção clivável, ao ligante, à porção ligante de proteína e a um suporte sólido. Em determinadas modalidades, o grupo linear inclui uma ou mais ligações cliváveis.

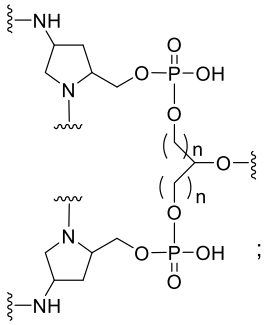
[00629] Em determinadas modalidades, o ligante inclui uma porção ligante de proteínas. Em determinadas modalidades, a porção ligante de proteínas é um lipídio como, por exemplo, incluindo, entre outros, colesterol, ácido cólico, ácido acético de adamantano, ácido 1-pireno butírico, di-hidrotestosterona, 1,3-Bis-O(hexadecil)glicerol, grupo geraniloxi-hexila, hexadecilglicerol, borneol, mentol, 1,3-propanodiol, grupo heptadecil, ácido palmítico, ácido mirístico, ácido O3-(oleoil)litocólico , ácido O3-(oleoil) colênico, dimetoxitritila ou fenoxazina), uma vitamina

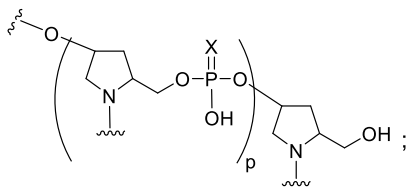
(por exemplo, folato, vitamina A, vitamina E, biotina, piridoxal), um peptídeo, um carboidrato (por exemplo, monossacarídeo, dissacarídeo, trissacarídeo, tetrassacarídeo, oligossacarídeo, polissacarídeo), um componente endossomolítico, um esteroide (por exemplo, uvaol, hecigenina, diosgenina), um terpeno (por exemplo, triterpeno, por exemplo, sarsasapogenina, friedelina, ácido litocólico derivatizado de epifriedelanol) ou um lipídio catiônico. Em determinadas modalidades, a porção ligante de proteínas é um ácido graxo saturado ou insaturado de cadeia longa de C16 a C22, colesterol, ácido cólico, vitamina E, adamantano ou 1-pentafluoropropila.

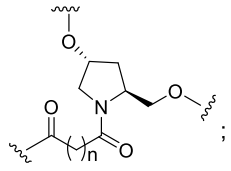
[00630] Em determinadas modalidades, um ligante tem uma estrutura selecionada entre:

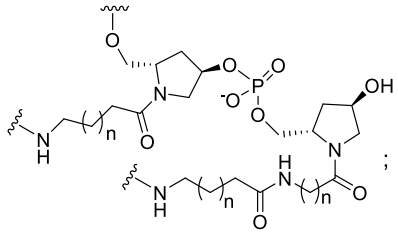

;

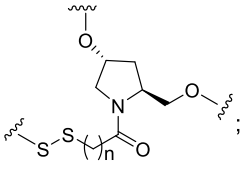

;

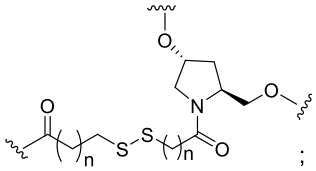

;

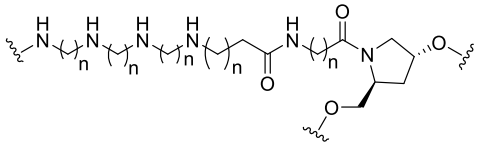

;

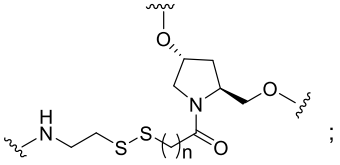

;

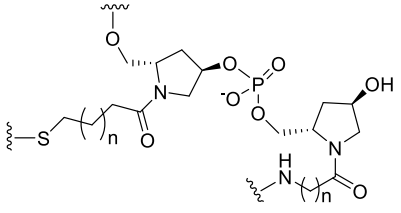

;

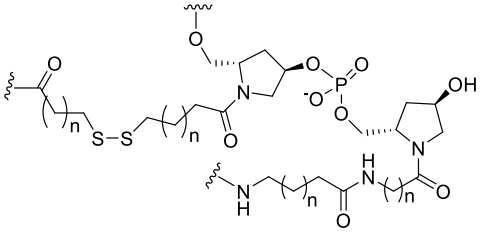

;


;


;

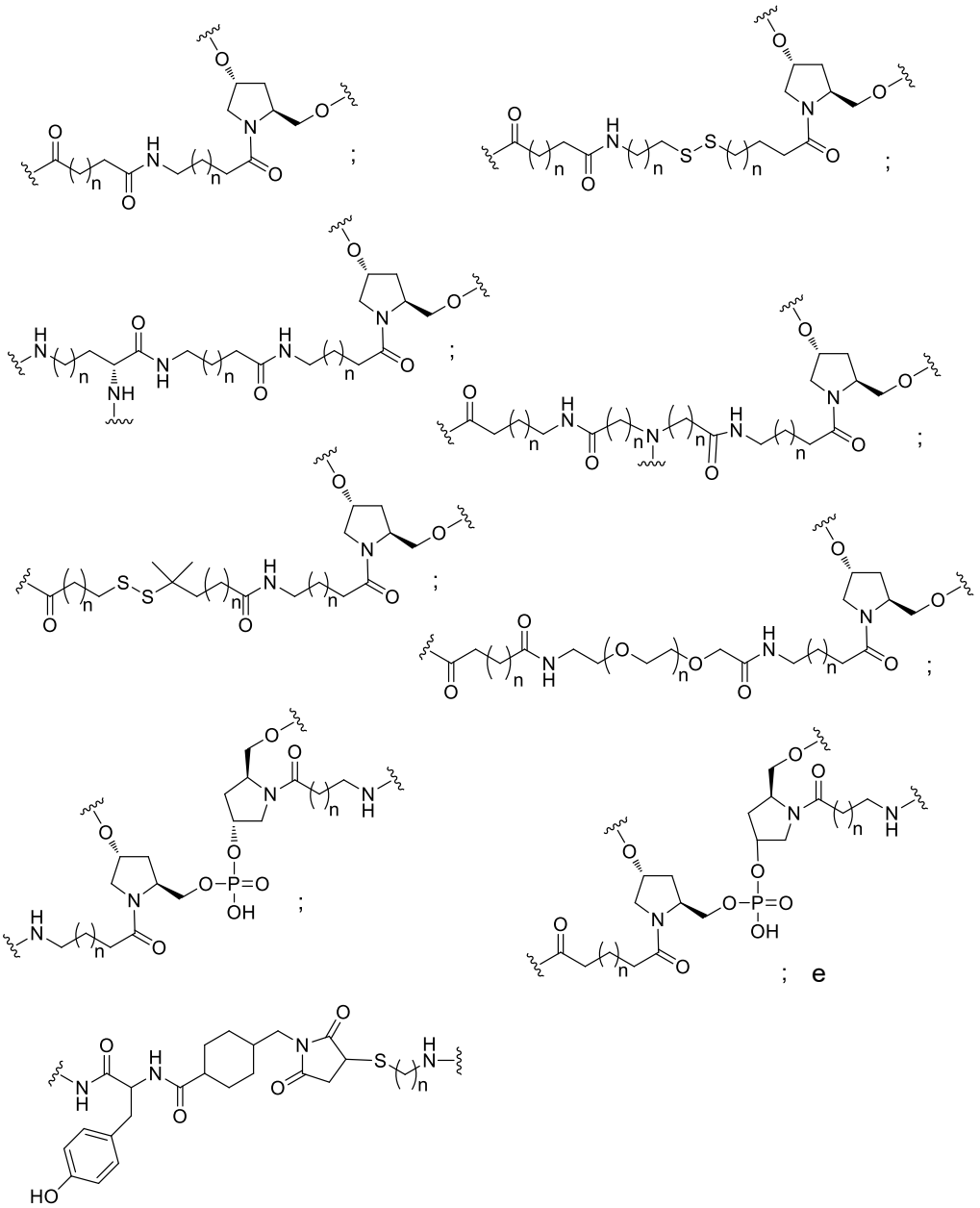

;


; e



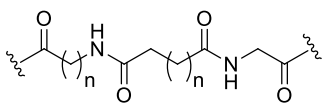
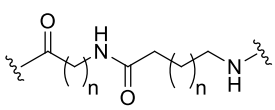
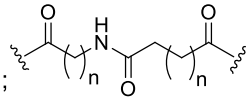
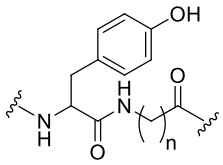
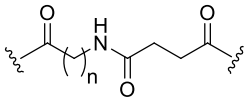
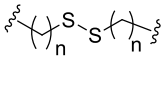
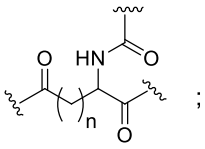
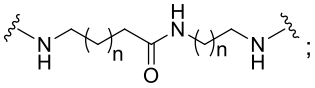
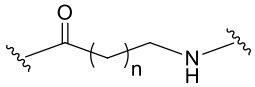
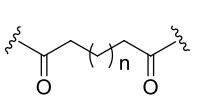
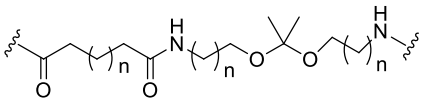
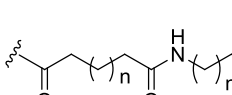
onde cada n é, independentemente, de 1 a 20; e p é de 1 a 6.

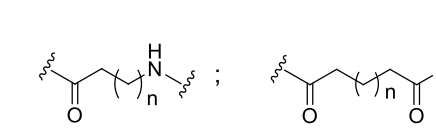
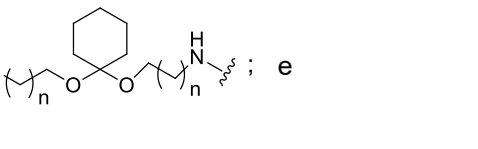
[00631] Em determinadas modalidades, um ligador tem uma estrutura selecionada entre:



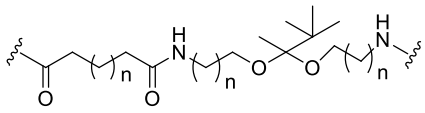
em que n é, independentemente, de 1 a 20.

[00632] Em determinadas modalidades, um ligador tem uma estrutura selecionada entre:


;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

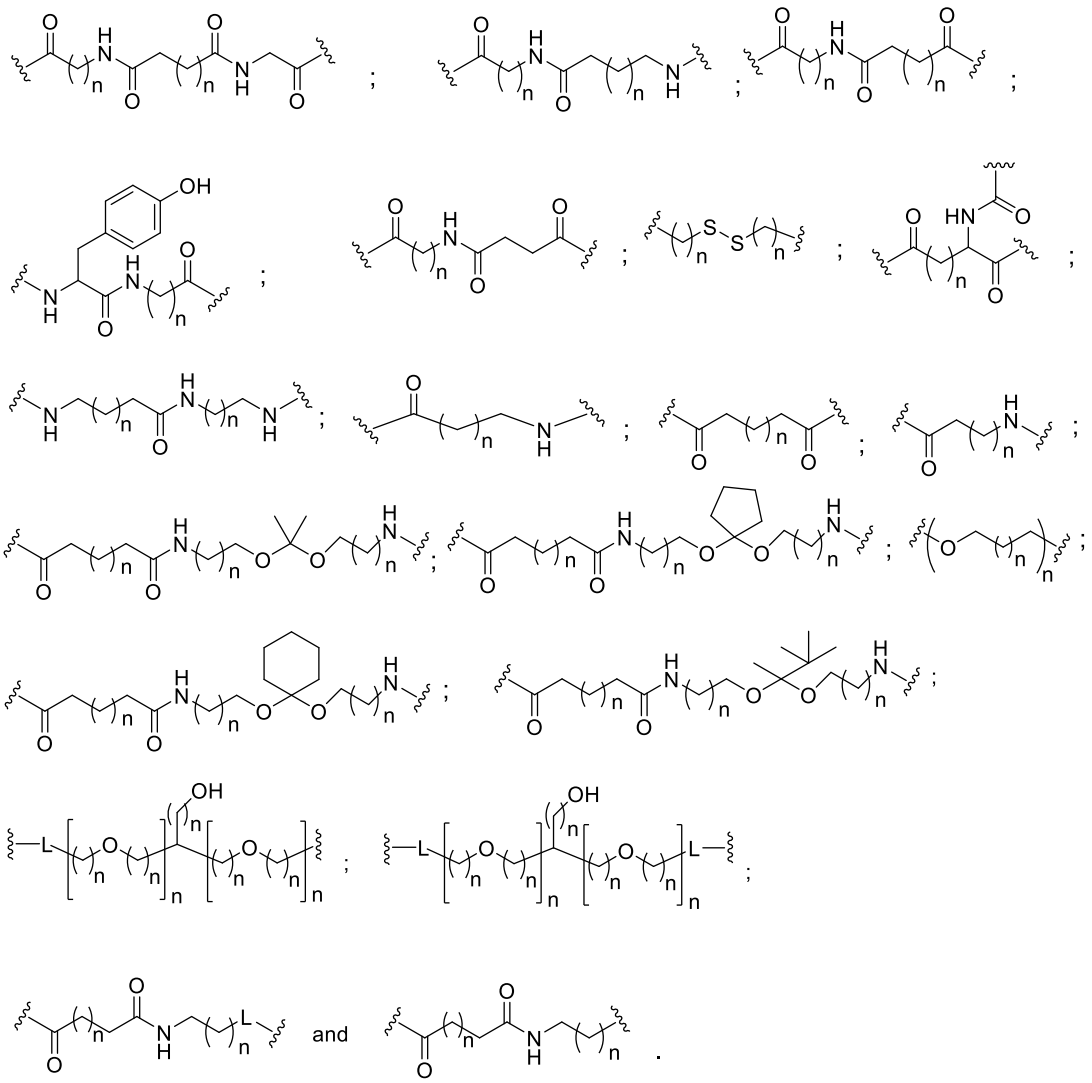
;

;

;

;

;
e


em que n é de 1 a 20.

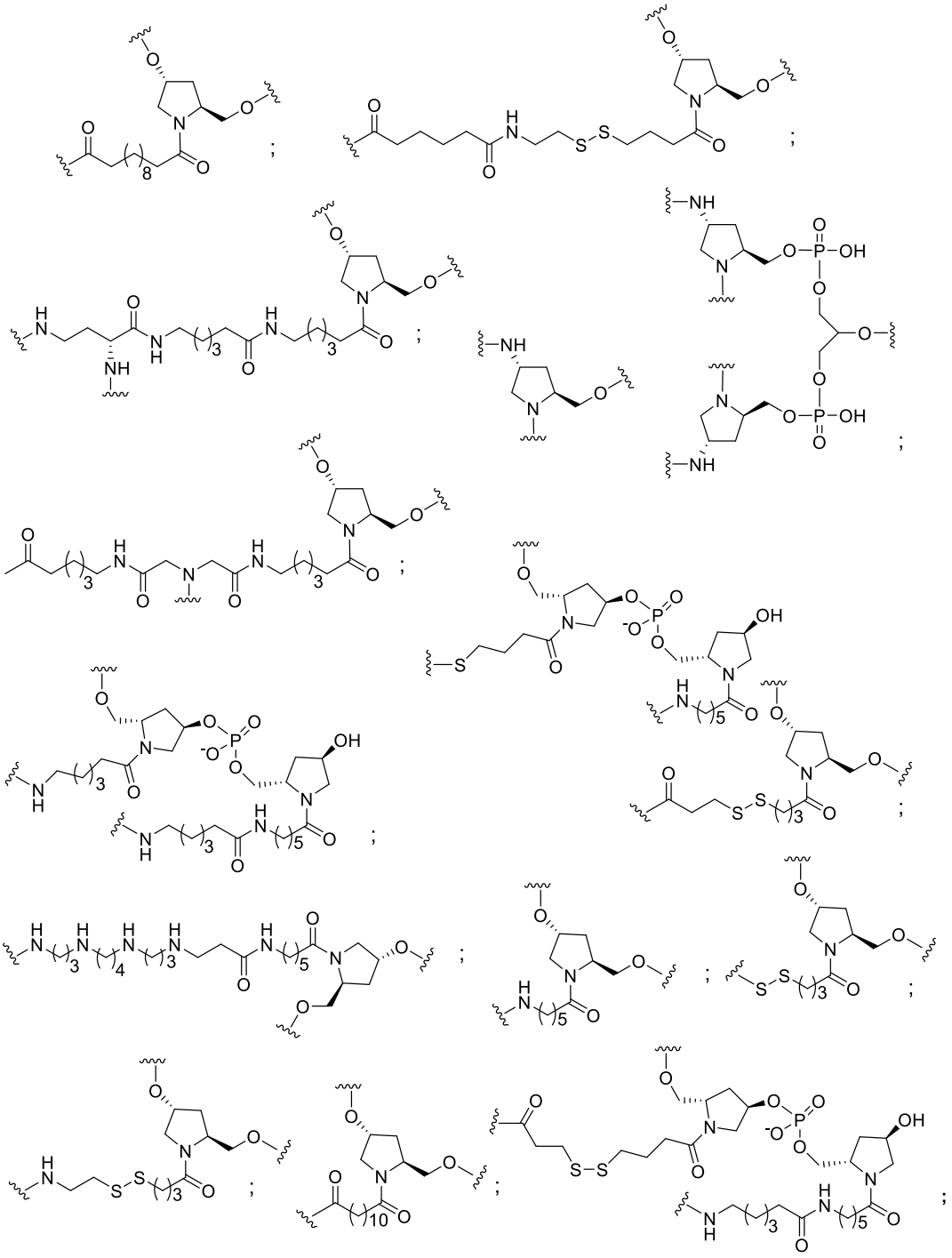
[00633] Em determinadas modalidades, um ligador tem uma estrutura selecionada entre:

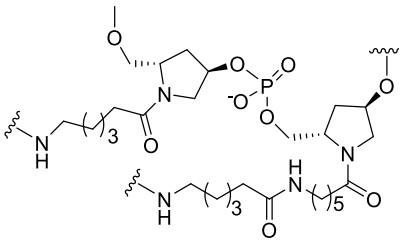
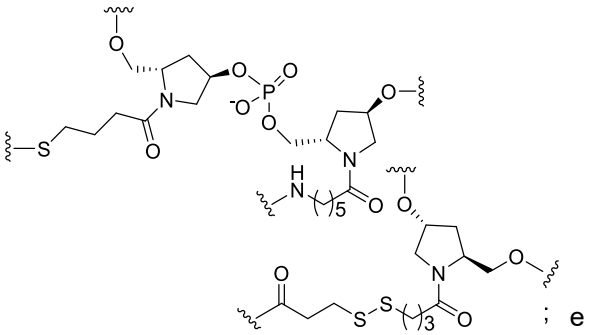
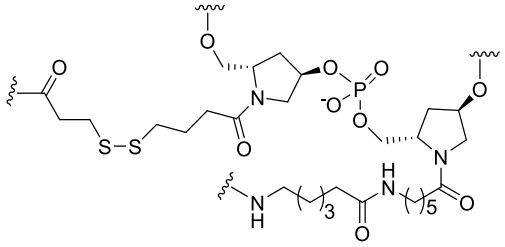


onde cada L é, independentemente, um grupo ligante fósforo ou um grupo ligante neutro; e

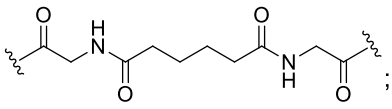
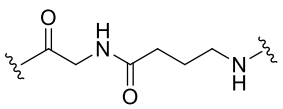
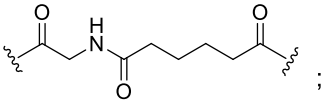
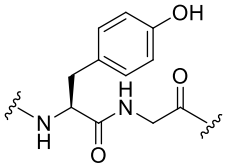
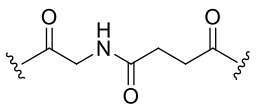
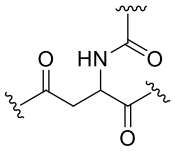
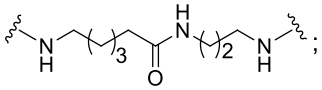
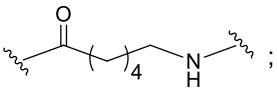
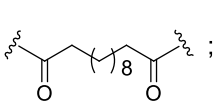
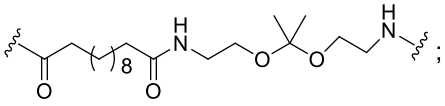
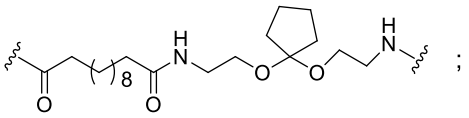
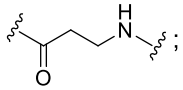
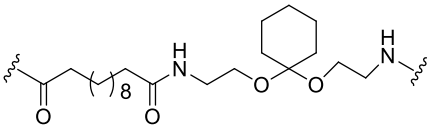
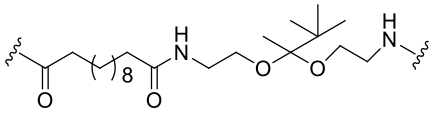
[00634] cada n é, independentemente, de 1 a 20.

[00635] Em determinadas modalidades, um ligante tem uma estrutura selecionada entre:

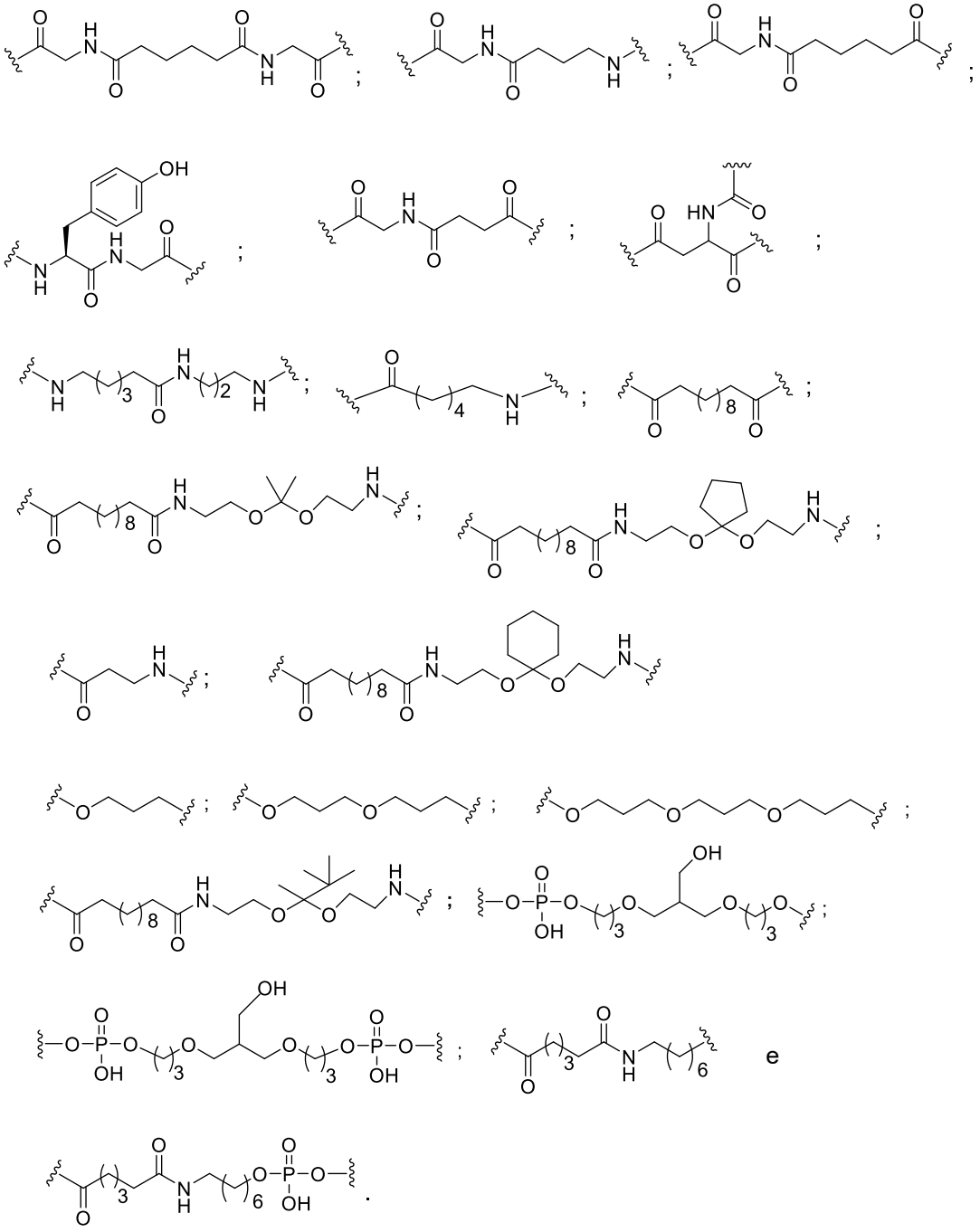



;

; e

.

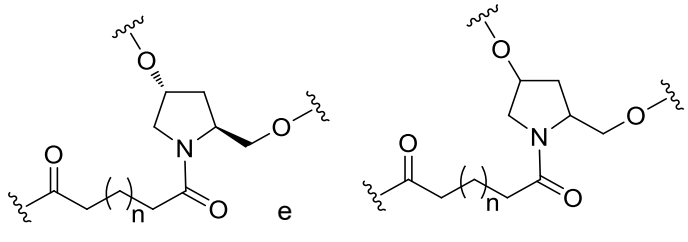
[00636] Em determinadas modalidades, um ligador tem uma estrutura selecionada entre:


;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

; e

.

[00637] Em determinadas modalidades, um ligador tem uma estrutura selecionada entre:

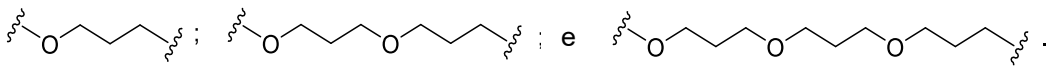


[00638] Em determinadas modalidades, um ligador tem uma estrutura selecionada entre:

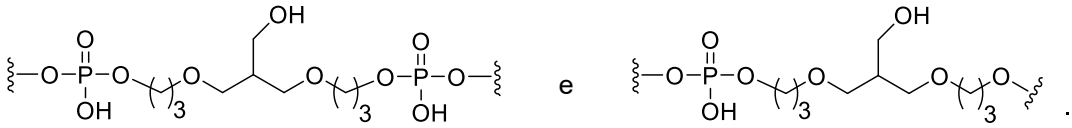


[00639] em que n é de 1 a 20.

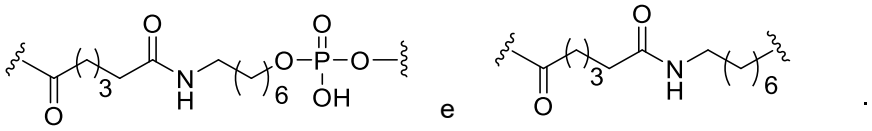
[00640] Em determinadas modalidades, um ligador tem uma estrutura selecionada entre:



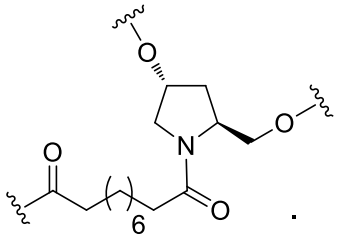
[00641] Em determinadas modalidades, um ligador tem uma estrutura selecionada entre:



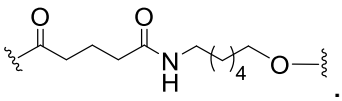
[00642] Em determinadas modalidades, um ligador tem uma estrutura selecionada entre:



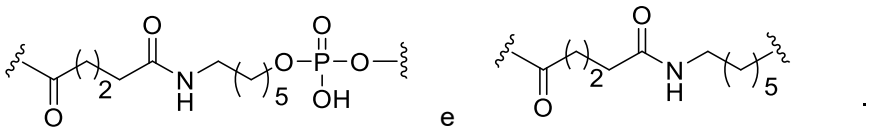
[00643] Em determinadas modalidades, o ligador do conjugado tem a estrutura:



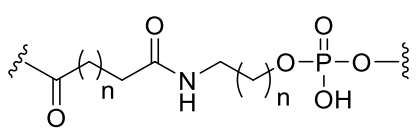
[00644] Em determinadas modalidades, o ligador do conjugado tem a estrutura:

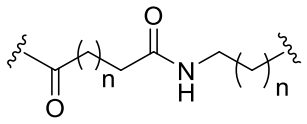


[00645] Em determinadas modalidades, um ligador tem uma estrutura selecionada entre:



[00646] Em determinadas modalidades, um ligador tem uma estrutura selecionada entre:



e


;

onde cada n é independentemente 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7.

Determinadas Frações Direcionadas a Células

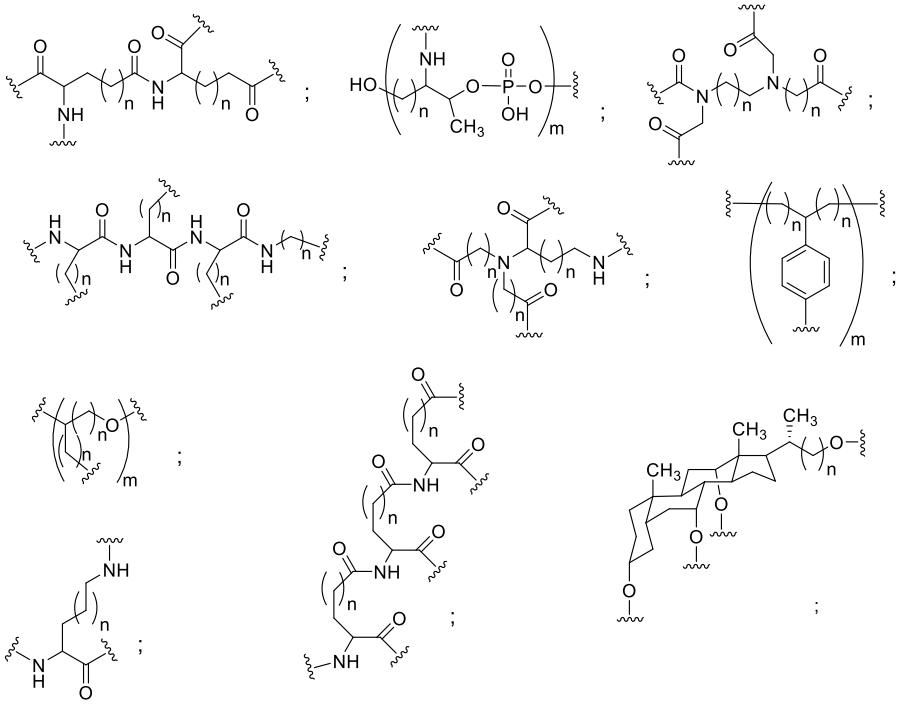
[00647] Em determinadas modalidades, os grupos de conjugado compreendem frações direcionadas a células. Determinadas dessas frações direcionadas a células aumentam a absorção de compostos antissenso. Em determinadas modalidades, as frações direcionadas a células compreendem um grupo de ramificação, um ou mais fixador e um ou mais ligante. Em determinadas modalidades, frações direcionadas a células compreendem um grupo de ramificação, um ou mais ligantes e uma ou mais ligação clivável.

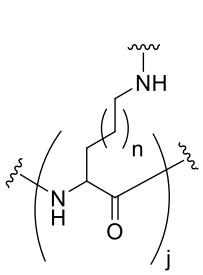
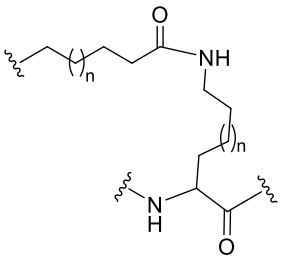
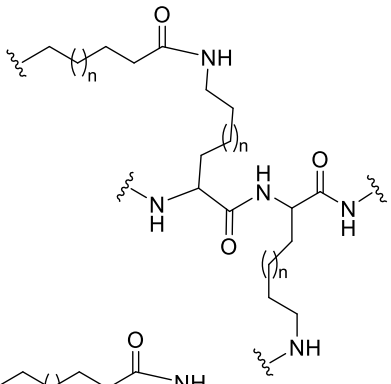
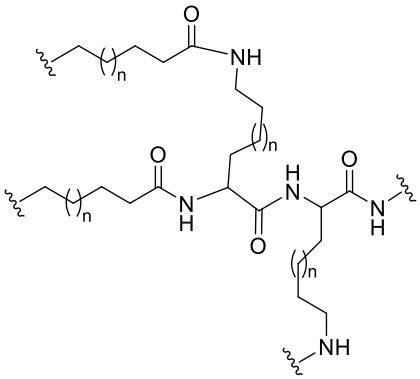
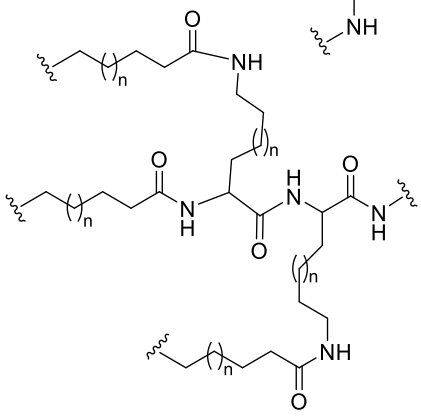
Determinados Grupos de Ramificação

[00648] Em determinadas modalidades, os grupos de conjugado compreendem uma porção direcionada que compreende um grupo de ramificação e pelo menos dois ligantes fixados. Em determinadas modalidades, o grupo de ramificação anexa o ligante conjugado. Em determinadas modalidades, o grupo de ramificação anexa a porção clivável. Em determinadas modalidades, o grupo de ramificação anexa o oligonucleotídeo antissenso. Em determinadas modalidades, o grupo de ramificação está covalentemente anexado ao vinculador e aos ligantes fixados. Em determinadas modalidades, o grupo de ramificação compreende um grupo alifático ramificado compreendendo grupos selecionados de alquila, amida, bissulfeto, polietilenoglicol, éter, grupos tioéter e hidroxilamina. Em determinadas modalidades, o grupo de ramificação compreende grupos selecionados a partir de grupos alquila, amida e éter. Em determinadas modalidades, o grupo de ramificação compre-

ende grupos selecionados a partir de grupos alquila e éter. Em determinadas modalidades, o grupo de ramificação compreende um sistema de anéis mono ou policíclicos. Em determinadas modalidades, o grupo de ramificação compreende uma ou mais ligação clivável. Em determinadas modalidades, o grupo de conjugado não inclui um grupo de ramificação.

[00649] Em determinadas modalidades, um grupo de ramificação tem uma estrutura selecionada entre:



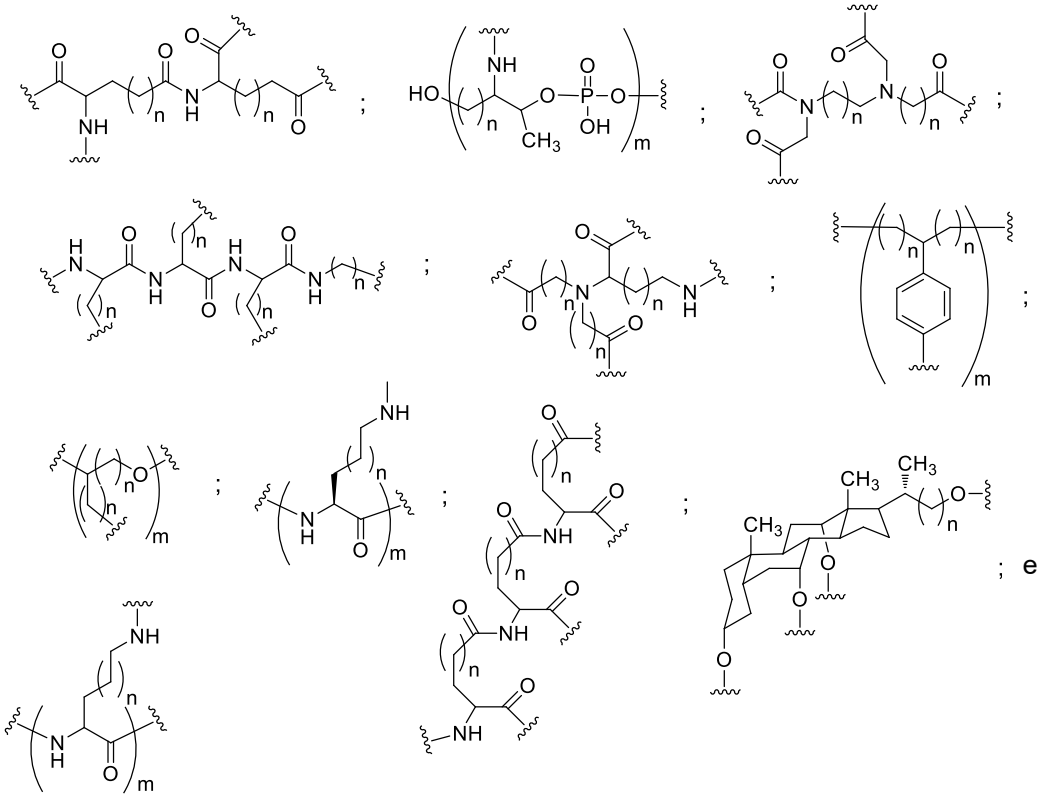

;

;

;

; e

.

em que n é, independentemente, de 1 a 20.

[00650] j é de 1 a 3; e

[00651] m é de 2 a 6.

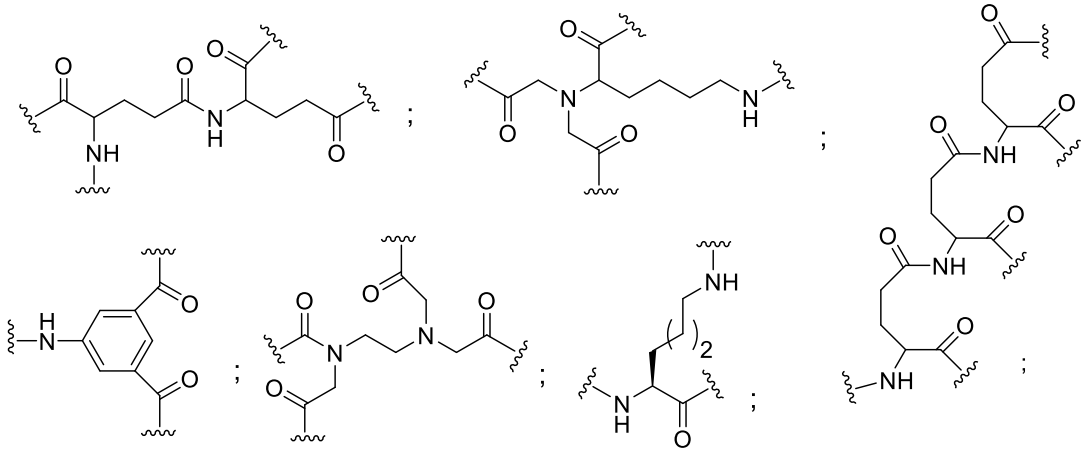
[00652] Em determinadas modalidades, um grupo de ramificação tem uma estrutura selecionada entre:

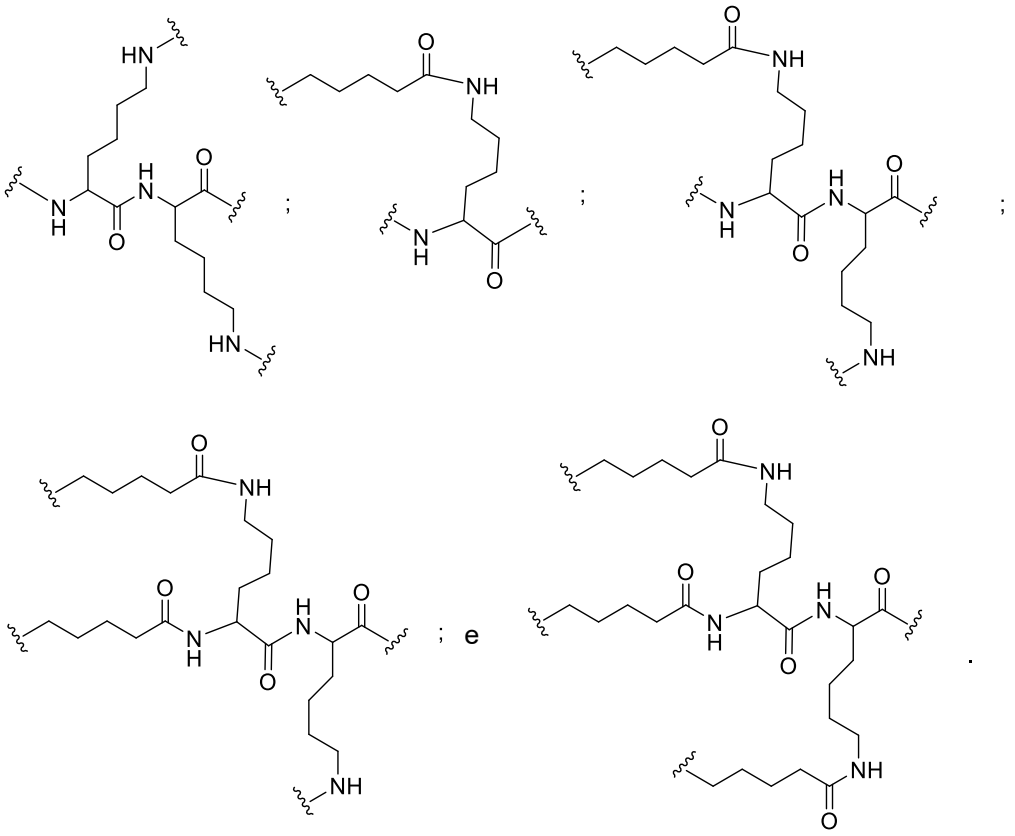


em que n é, independentemente, de 1 a 20; e

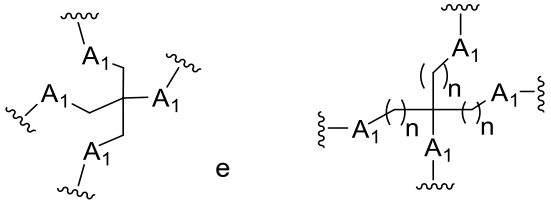
[00653] m é de 2 a 6.

[00654] Em determinadas modalidades, um grupo de ramificação tem uma estrutura selecionada entre:





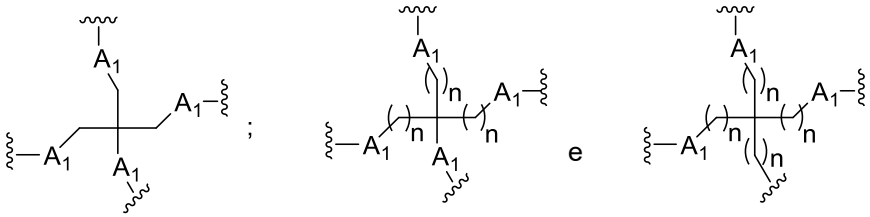
[00655] Em determinadas modalidades, um grupo de ramificação tem uma estrutura selecionada entre:



em que cada A_1 é, independentemente, O, S, C=O ou NH; e

[00656] cada n é, independentemente, de 1 a 20.

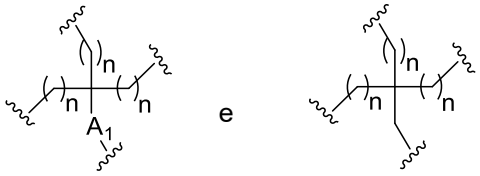
[00657] Em determinadas modalidades, um grupo de ramificação tem uma estrutura selecionada entre:



em que cada A_1 é, independentemente, O, S, C=O ou NH; e

[00658] cada n é, independentemente, de 1 a 20.

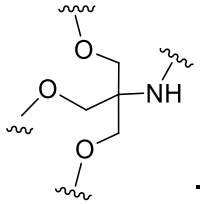
[00659] Em determinadas modalidades, um grupo de ramificação tem uma estrutura selecionada entre:



em que A_1 é O, S, C=O ou NH; e

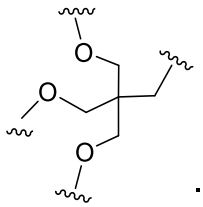
[00660] cada n é, independentemente, de 1 a 20.

[00661] Em determinadas modalidades, um grupo de ramificação tem uma estrutura selecionada entre:



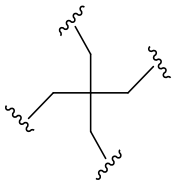
.

[00662] Em determinadas modalidades, um grupo de ramificação tem uma estrutura selecionada entre:



.

[00663] Em determinadas modalidades, um grupo de ramificação tem uma estrutura selecionada entre:



.

<u>Determinados Fixadores</u>

[00664] Em determinadas modalidades, os grupos conjugados compreendem um ou mais fixadores covalentemente anexados ao grupo de ramificação. Em determinadas modalidades, os grupos conjugados compreendem um ou mais fixadores covalentemente anexados ao grupo de ligação. Em determinadas modalidades, cada fixador é um

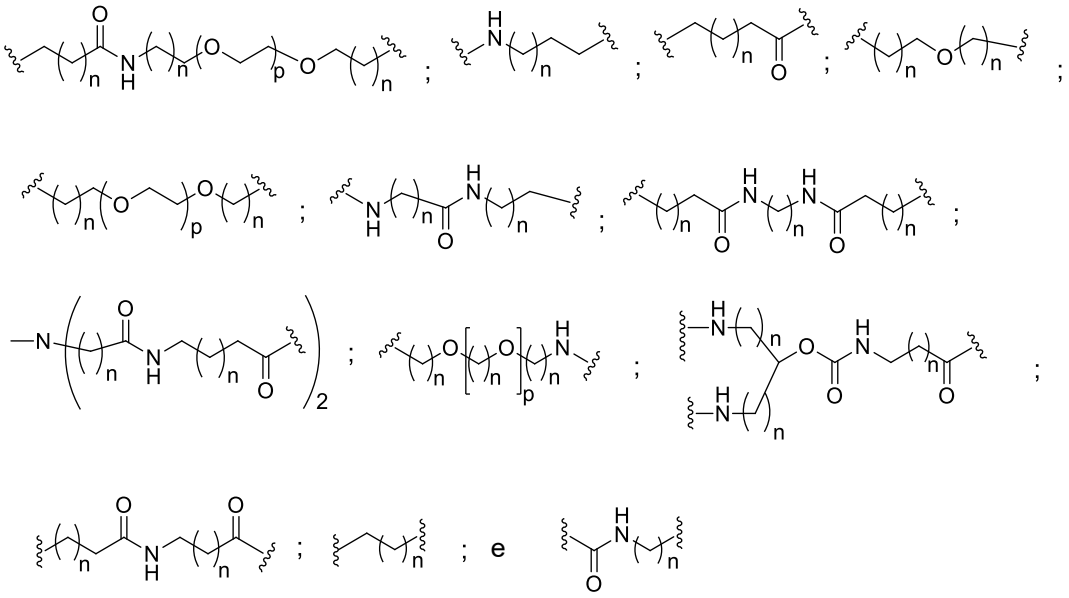
grupo alifático linear, compreendendo um ou mais grupos selecionados de alquila, éter, tioéter, bissulfeto, amida e grupos de polietilenoglicol em qualquer combinação. Em determinadas modalidades, cada fixador é um grupo linear, compreendendo um ou mais grupos selecionados de alquila, éter, tioéter, bissulfeto, amida, fosfodiéster e grupos de polietilenoglicol em qualquer combinação. Em determinadas modalidades, cada fixador é um grupo linear, compreendendo um ou mais grupos selecionados de alquila, éter e amida em qualquer combinação. Em determinadas modalidades, cada fixador é um grupo alifático linear compreendendo um ou mais grupos selecionados de alquila, fosfodiéster, éter e grupos amida em qualquer combinação. Em determinadas modalidades, cada fixador é um grupo alifático linear compreendendo um ou mais grupos selecionados de alquila e fosfodiéster em qualquer combinação. Em determinadas modalidades, cada fixador compreende pelo menos um grupo de ligação fósforo ou grupo de ligação neutro.

[00665] Em determinadas modalidades, o fixador inclui uma ou mais ligações cliváveis. Em determinadas modalidades, a corrente é anexada ao grupo de ramificação através de ou uma amida ou um grupo éter. Em determinadas modalidades, o fixador é anexado ao grupo ramificação por meio de um grupo fosfodiéster. Em determinadas modalidades, o fixador é anexado ao grupo de ramificação por meio de um grupo de ligação fósforo ou grupo de ligação neutro. Em determinadas modalidades, o fixador é anexado ao grupo ramificação por meio de um um grupo éter. Em determinadas modalidades, o fixador é anexado ao ligante por meio de um um grupo amida ou éter. Em determinadas modalidades, o fixador é anexado ao ligante por meio de um grupo éter. Em determinadas modalidades, o fixador é anexado ao ligante por meio de um um grupo amida ou éter. Em determinadas modalidades, o fixador é anexado ao ligante por meio de um grupo éter.

[00666] Em determinadas modalidades, cada fixador compreende de

cerca de 8 a cerca de 20 átomos no comprimento da cadeia entre o ligante e o grupo de ramificação. Em determinadas modalidades, cada grupo fixador compreende de cerca de 10 a cerca de 18 átomos no comprimento da cadeia entre o ligante e o grupo de ramificação. Em determinadas modalidades, cada grupo fixador compreende de cerca de 13 átomos no comprimento da cadeia.

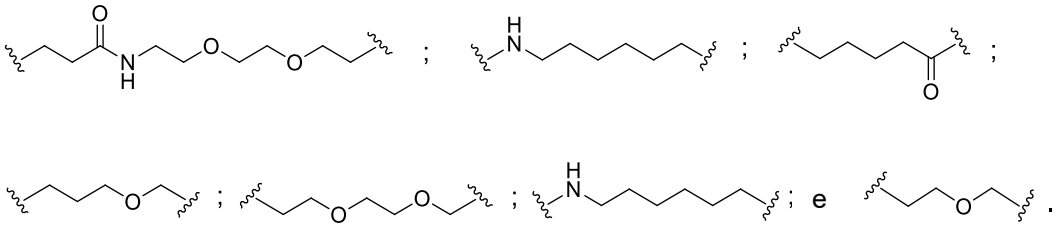
[00667] Em determinadas modalidades, um fixador tem uma estrutura selecionada entre:



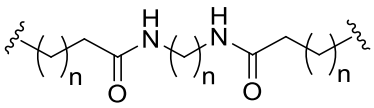
em que n é, independentemente, de 1 a 20; e

[00668] cada p é de 1 a cerca de 6.

[00669] Em determinadas modalidades, um fixador tem uma estrutura selecionada entre:

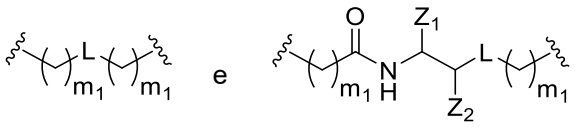


[00670] Em determinadas modalidades, um fixador tem uma estrutura selecionada entre:



em que n é, independentemente, de 1 a 20.

[00671] Em determinadas modalidades, um fixador tem uma estrutura selecionada entre:



[00672] em que L é um grupo de ligação de fósforo ou um grupo de ligação neutro;

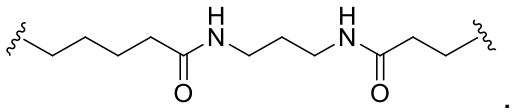
[00673] Z_1 é C(=O)O-R_2;

[00674] Z_2 é H, alquila C_1-C_6 ou alquila C_1-C_6 substituída;

[00675] R_2 é H, C_1- C_6 ou alquila substituída C_1- C_6; e

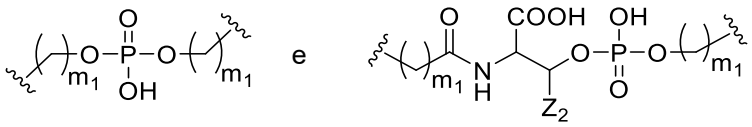
[00676] cada m_1 é, independentemente, de 0 a 20, em que pelo menos um m_1 é maior que 0 para cada corrente.

[00677] Em determinadas modalidades, um fixador tem uma estrutura selecionada entre:



.

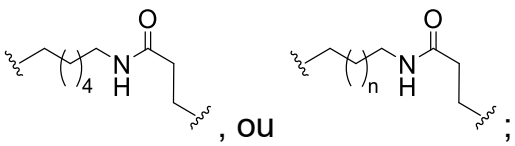
[00678] Em determinadas modalidades, um fixador tem uma estrutura selecionada entre:



em que Z_2 é H ou CH_3; e

[00679] cada m_1 é, independentemente, de 0 a 20, em que pelo menos um m_1 é maior que 0 para cada corrente.

[00680] Em determinadas modalidades, um fixador tem uma estrutura selecionada entre:



em que cada n é, independentemente, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7.

[00681] Em determinadas modalidades, uma corrente compreende

um grupo de ligação de fósforo. Em determinadas modalidades, uma corrente não compreende nenhuma ligação amida. Em determinadas modalidades, uma corrente compreende um grupo de ligação de fósforo e não compreende nenhuma ligação amida.

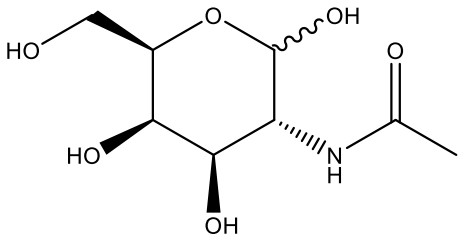
Certos Ligantes

[00682] Em determinadas modalidades, a presente divulgação provê ligantes em que cada ligante é anexado covalentemente a uma corrente. Em determinadas modalidades, cada ligante é selecionado para ter uma afinidade para pelo menos um tipo de receptor em uma célula-alvo. Em determinadas modalidades, os ligantes são selecionados para que tenham afinidade para pelo menos um tipo de receptor na superfície de uma célula hepática de mamífero. Em determinadas modalidades, os ligantes são selecionados para que tenham afinidade para pelo menos um receptor hepático de asialoglicoproteína. Em determinadas modalidades, cada ligante é um carboidrato. Em determinadas modalidades, cada ligante é, selecionados independentemente da galactose, N-acetil galactosamina, manose, glicose, glicosamina e fucose. Em determinadas modalidades, cada ligante é N-acetil galactosamina (GalNAc). Em determinadas modalidades, a porção-alvo compreende 2 a 6 ligantes. Em determinadas modalidades, a porção-alvo compreende 3 ligantes. Em determinadas modalidades, a porção-alvo compreende 3 ligantes N-acetil galactosamina.

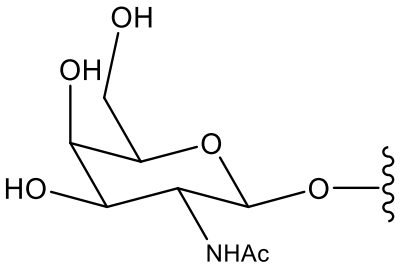
[00683] Em determinadas modalidades, o ligante é um carboidrato, derivado de carboidrato, carboidrato modificado, agrupamento de carboidrato multivalente, polissacarídeo, polissacarídeo modificado ou derivado de polissacarídeo. Em determinadas modalidades, o ligante é um açúcar aminado ou açúcar tio. Por exemplo, açúcares de amino podem ser selecionados de qualquer número de compostos conhecidos na técnica, por exemplo, glicosamina, ácido siálico, α-D-galactosamina, N-

Acetilgalactosamina, 2-acetamido-2-desoxi-D-galactopiranose (Gal-NAc), 2-Amino-3-O-[(R)-1-carboxietil]-2-desoxi-β-D-glicopiranose (ácido β-murâmico), 2-Desoxi-2-metilamino-L-glicopiranose, 4,6-Dide-soxi-4-formamido-2,3-di-O-metil-D-manopiranose, 2-Desoxi-2-sulfoa-mino-D-glicopiranose e N-sulfo-D-glicosamina, e ácido N-Glicoloil-α-neuramínico. Por exemplo, açúcares tio podem ser selecionados do grupo consistindo em 5-Tio-β-D-glicopiranose, Metil 2,3,4-tri-O-acetil-1-tio-6-O-tritil-α-D-glicopiranosídeo, 4-Tio-β-D-galactopiranose, e etil 3,4,6,7-tetra-O-acetil-2-desoxi-1,5-ditio-α-D-glico-heptopiranosídeo.

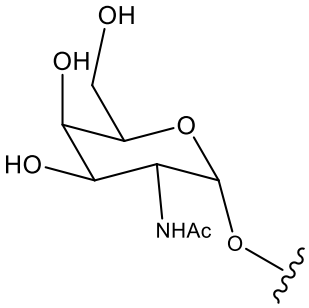
[00684] Em determinadas modalidades, "GalNac" ou "Gal-NAc" se refere a 2-(Acetilamino)-2-desoxi-D-galactopiranose, comumente referida na literatura como N-acetil galactosamina. Em determinadas modalidades, "N-acetil galactosamina" se refere a 2-(Acetilamino)-2-desoxi-D-galactopiranose. Em determinadas modalidades, "GalNac" ou "Gal-NAc" se refere a 2-(Acetilamino)-2-desoxi-D-galactopiranose. Em determinadas modalidades, "GalNac" ou "Gal-NAc" se refere a 2-(Acetilamino)-2-desoxi-D-galactopiranose, que inclui a forma β: 2-(Acetilamino)-2-Desoxi-β-D-galactopiranose e forma α: 2-(Acetilamino)-2-Desoxi-D-galactopiranose. Em determinadas modalidades, a forma β: 2-(Acetilamino)-2-Desoxi-β-D-galactopiranose e forma α: 2-(Acetilamino)-2-desoxi-D-galactopiranose pode ser usado de forma intercambiável. Portanto, nas estruturas em que uma forma é retratada, essas estruturas destinam-se a incluir a outra forma também. Por exemplo, se a estrutura para a forma α: 2-(Acetilamino)-2-Desoxi-D-galactopiranose é mostrado, esta estrutura destina-se a incluir a outra forma também. Em determinadas modalidades, em determinadas modalidades preferenciais, a forma β 2-(Acetilamino)-2-desoxi-D-galactopiranose é a modalidade preferencial.



2-(Acetilamina)-2-desóxi-D-galactopiranose

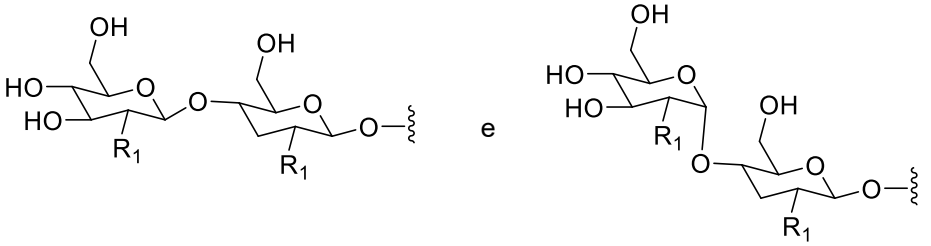


[00685] 2-(Acetilamina)-2-desóxi-β-D-galactopiranose.



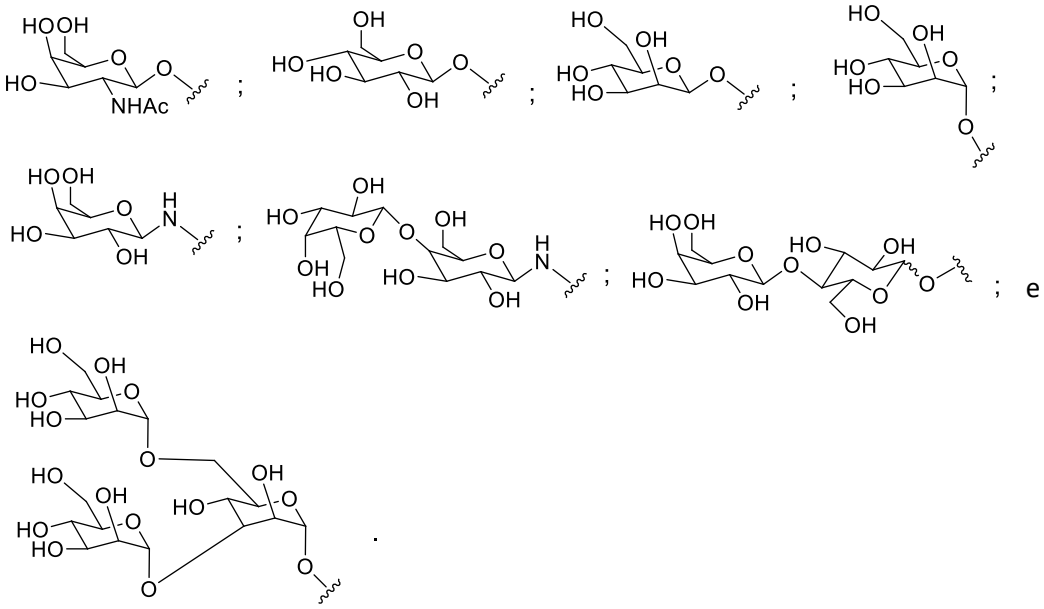
[00686] 2-(Acetilamina)-2-desóxi-α-D-galactopiranose.

[00687] Em determinadas modalidades, um ou mais ligantes têm uma estrutura selecionada entre:

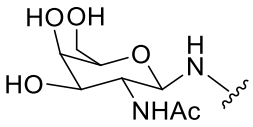


em que cada R_1 é selecionado de OH e NHCOOH.

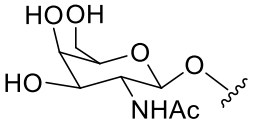
[00688] Em determinadas modalidades, um ou mais ligantes têm uma estrutura selecionada entre:



[00689] Em determinadas modalidades, um ou mais ligantes têm uma estrutura selecionada entre:

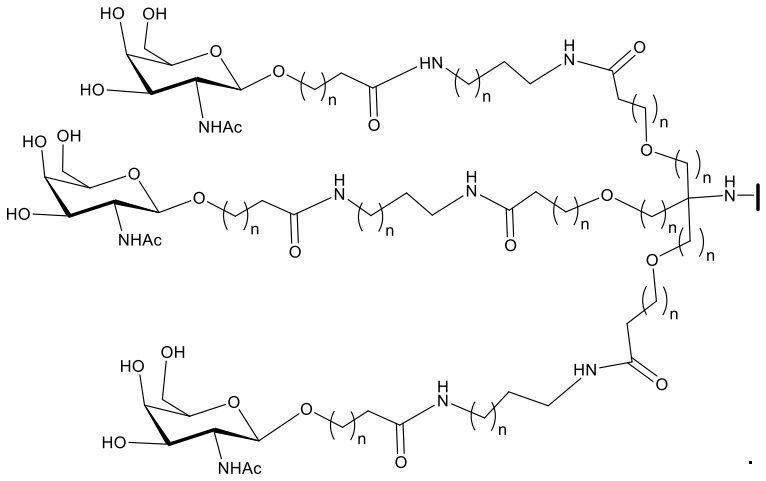


[00690] Em determinadas modalidades, um ou mais ligantes têm uma estrutura selecionada entre:



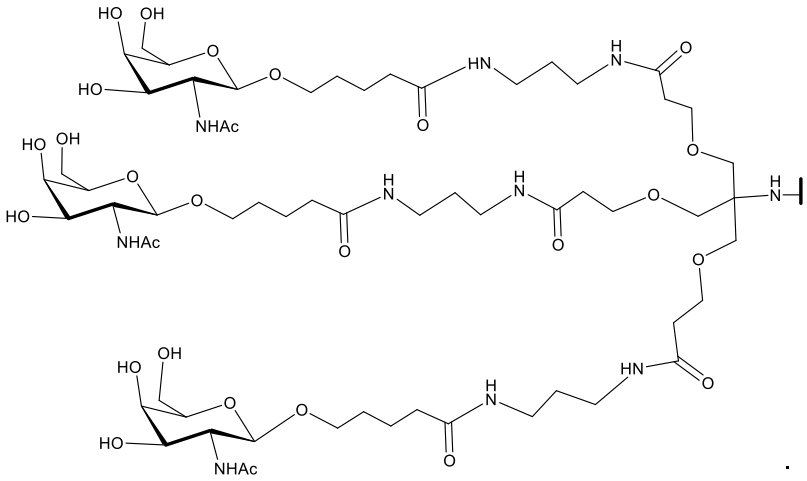
Certos Conjugados

[00691] Em determinadas modalidades, os grupos de conjugado compreendem as características estruturais acima. Em determinadas modalidades, os grupos de conjugado têm a seguinte estrutura:

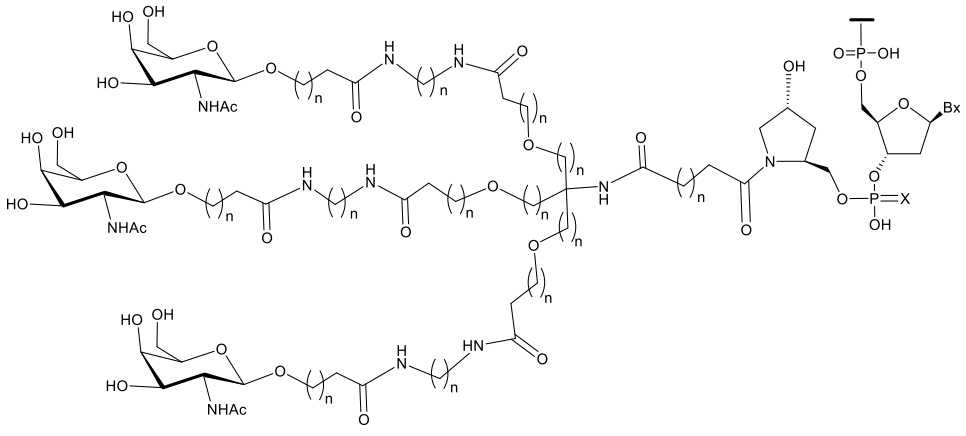


em que n é, independentemente, de 1 a 20.

[00692] Em determinadas modalidades, os grupos de conjugado têm a seguinte estrutura:



[00693] Em determinadas modalidades, os grupos de conjugado têm a seguinte estrutura:



em que n é, independentemente, de 1 a 20;

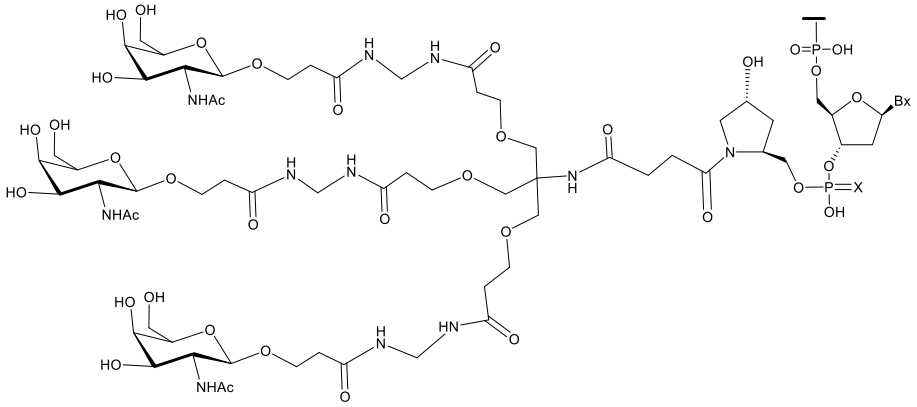
[00694] Z é H ou um suporte sólido ligante;

[00695] Q é um composto antissenso;

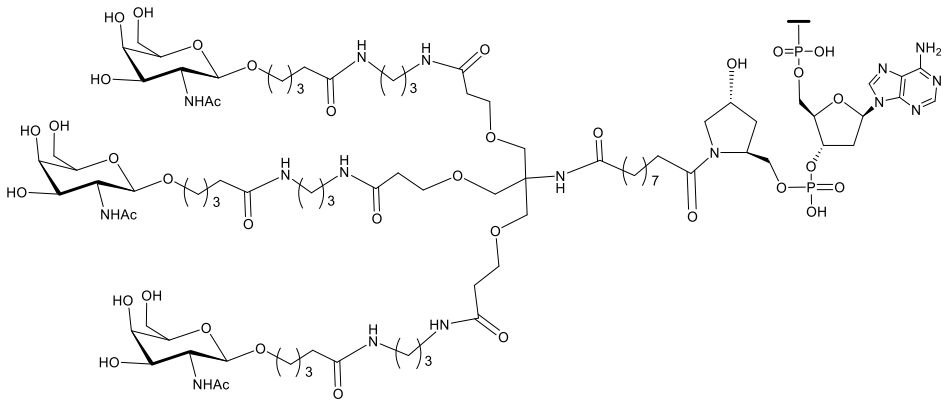
[00696] X é O ou S; e

[00697] Bx é uma porção de base heterocíclica.

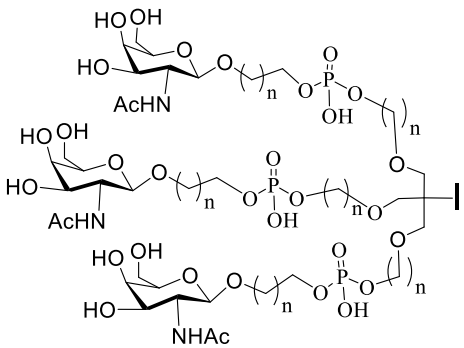
[00698] Em determinadas modalidades, os grupos de conjugado têm a seguinte estrutura:



[00699] Em determinadas modalidades, os grupos de conjugado têm a seguinte estrutura:

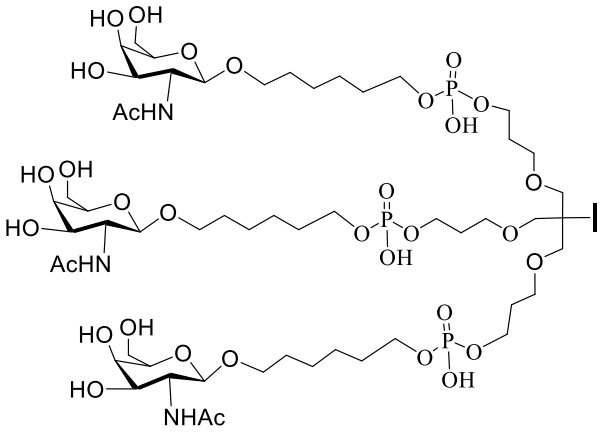


[00700] Em determinadas modalidades, os grupos de conjugado têm a seguinte estrutura:

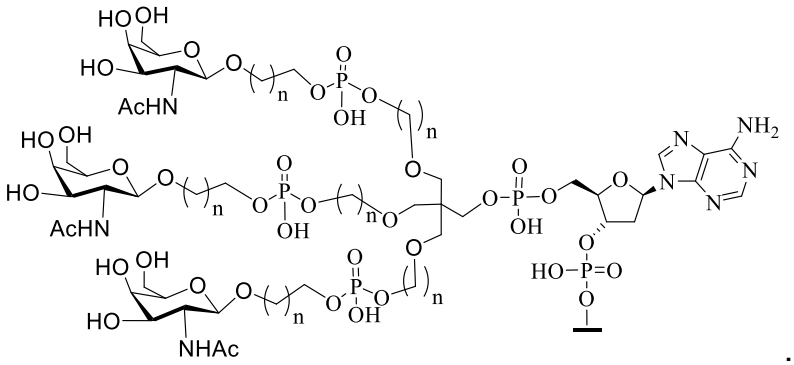


.

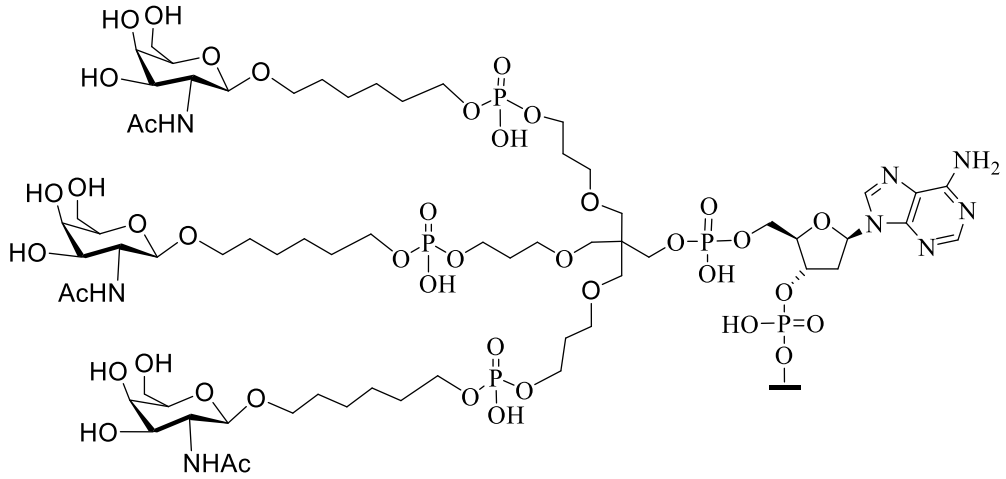
[00701] Em determinadas modalidades, os grupos de conjugado têm a seguinte estrutura:



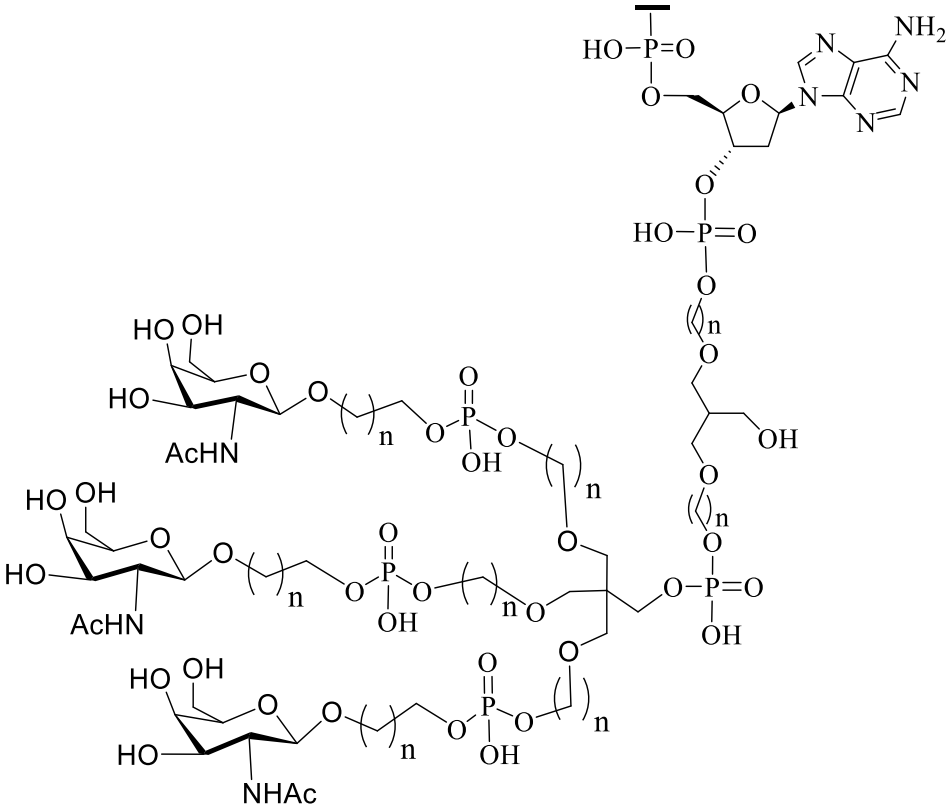
[00702] Em determinadas modalidades, os grupos de conjugado têm a seguinte estrutura:



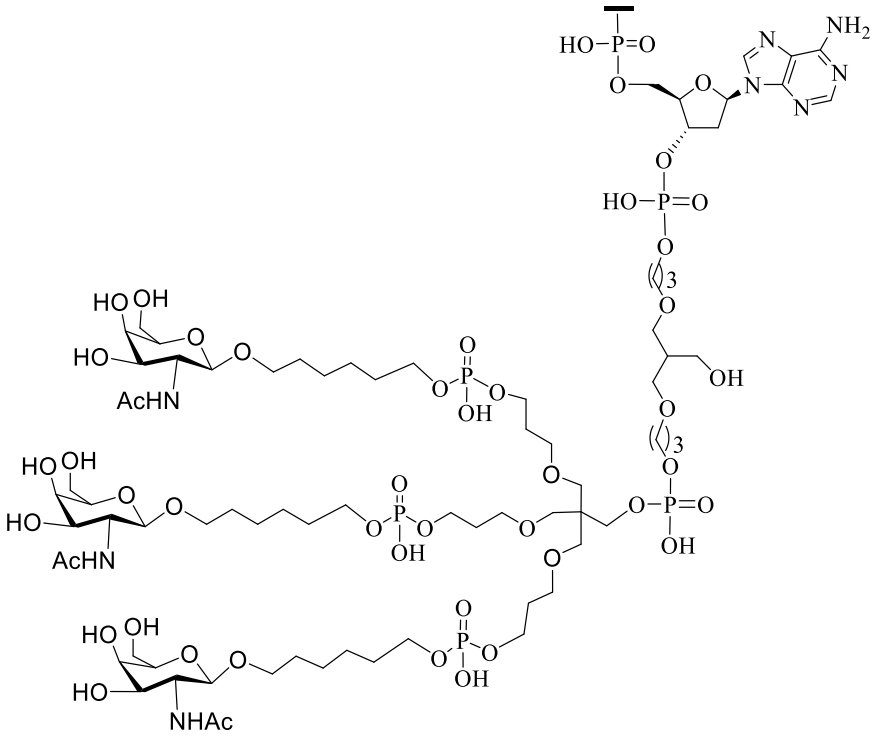
[00703] Em determinadas modalidades, os grupos de conjugado têm a seguinte estrutura:



[00704] Em determinadas modalidades, os grupos de conjugado têm a seguinte estrutura:

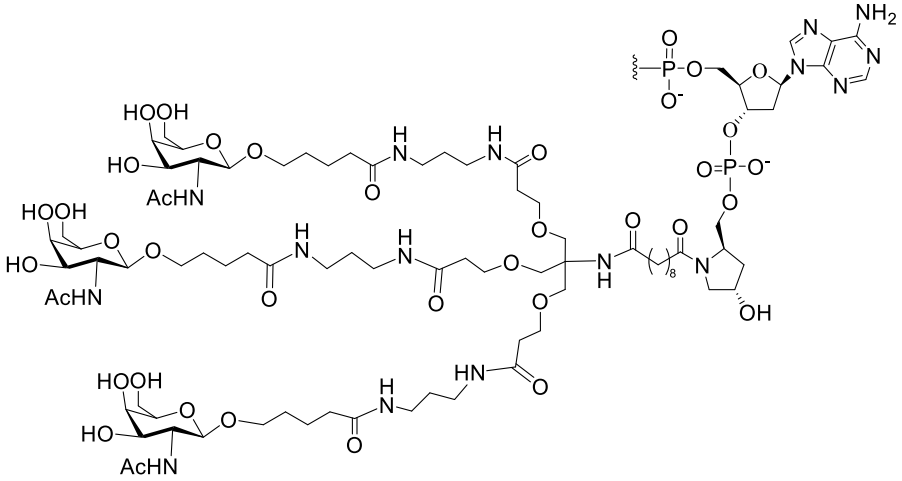


[00705] Em determinadas modalidades, os grupos de conjugado têm a seguinte estrutura:



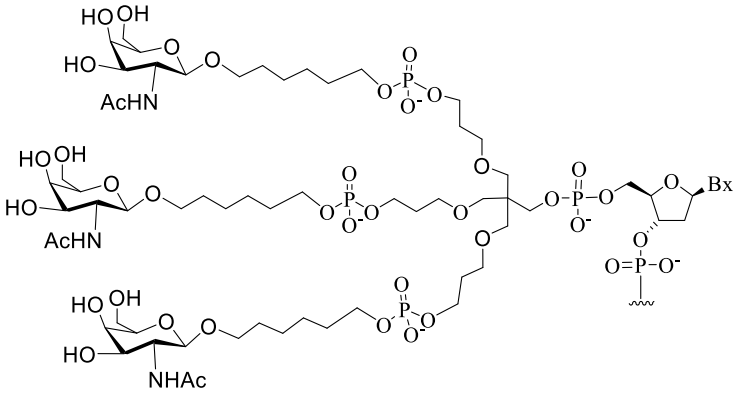
[00706] Em determinadas modalidades, os conjugados não compreendem uma pirrolidina.

[00707] Em determinadas modalidades, os grupos de conjugado têm a seguinte estrutura:



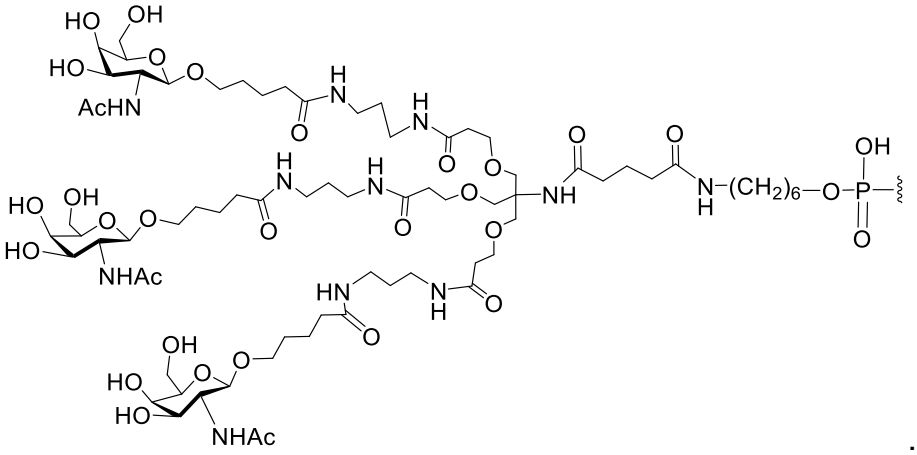
.

[00708] Em determinadas modalidades, os grupos de conjugado têm a seguinte estrutura:



.

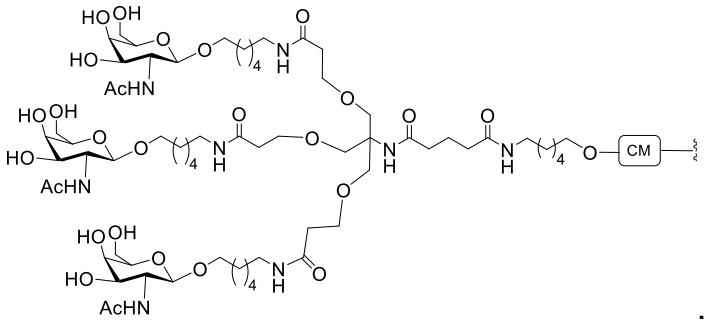
[00709] Em determinadas modalidades, os grupos de conjugado têm a seguinte estrutura:



.

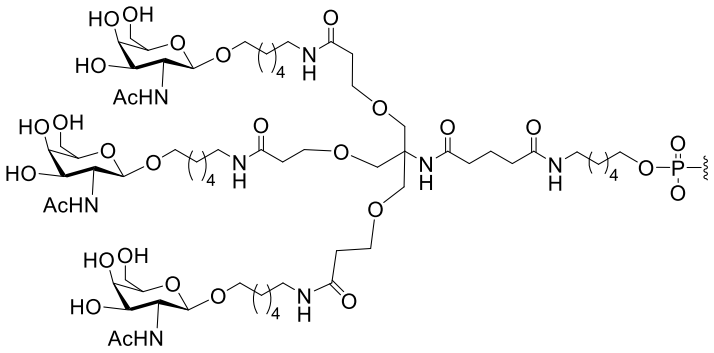
[00710] Em determinadas modalidades, os grupos de conjugado têm

a seguinte estrutura:



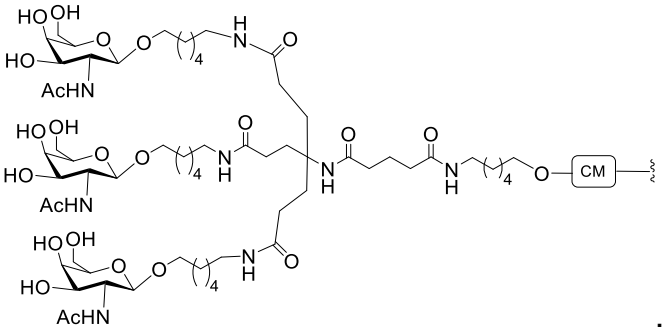
.

[00711] Em determinadas modalidades, os grupos de conjugado têm a seguinte estrutura:



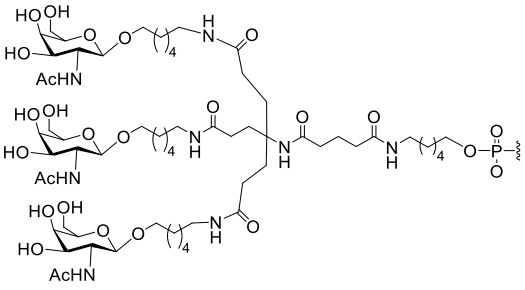
.

[00712] Em determinadas modalidades, os grupos de conjugado têm a seguinte estrutura:



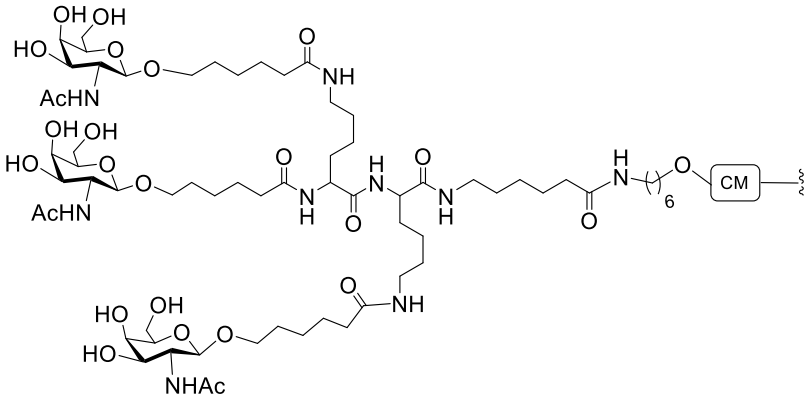
.

[00713] Em determinadas modalidades, os grupos de conjugado têm a seguinte estrutura:

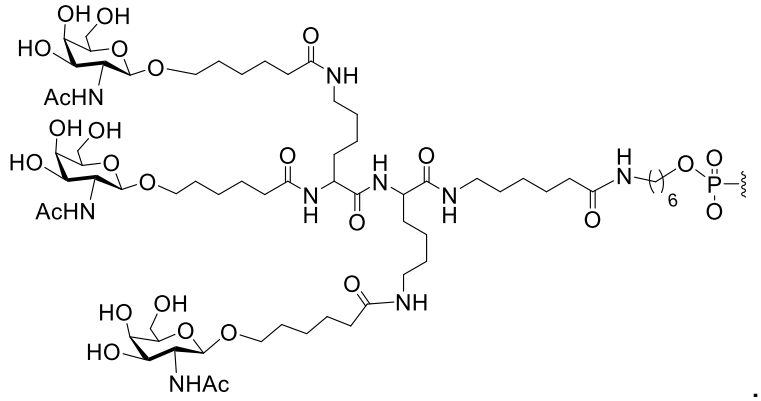


.

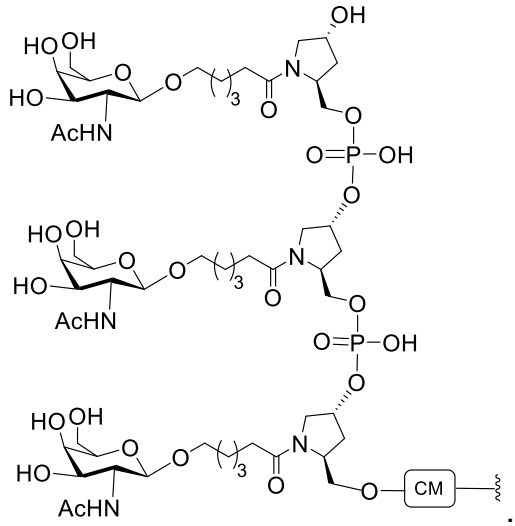
[00714] Em determinadas modalidades, os grupos de conjugado têm a seguinte estrutura:



[00715] Em determinadas modalidades, os grupos de conjugado têm a seguinte estrutura:

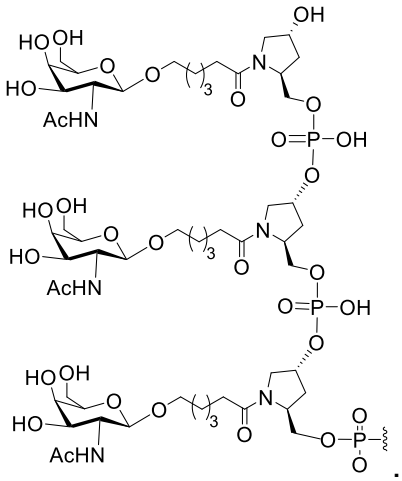


[00716] Em determinadas modalidades, os grupos de conjugado têm a seguinte estrutura:

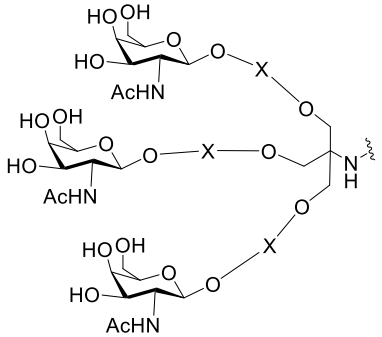


[00717] Em determinadas modalidades, os grupos de conjugado têm

a seguinte estrutura:

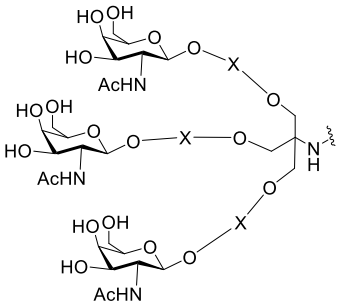


[00718] Em determinadas modalidades, a porção direcionada a células do grupo de conjugado tem a seguinte estrutura:



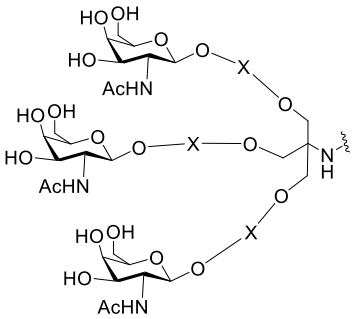
[00719] onde X é uma corrente substituída ou não substituída de seis a onze átomos consecutivamente ligados.

[00720] Em determinadas modalidades, a porção direcionada a células do grupo de conjugado tem a seguinte estrutura:



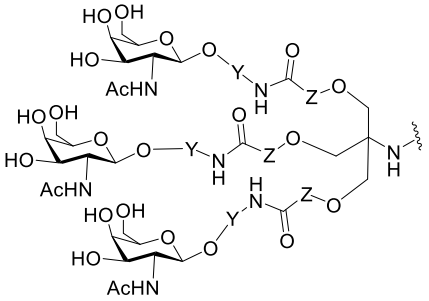
[00721] onde X é uma corrente substituída ou não substituída de dez átomos consecutivamente ligados.

[00722] Em determinadas modalidades, a porção direcionada a células do grupo de conjugado tem a seguinte estrutura:



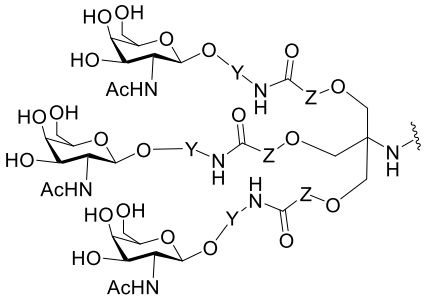
[00723] onde X é uma corrente substituída ou não substituída de quatro a onze átomos consecutivamente ligados e em que a corrente compreende exatamente uma ligação amida.

[00724] Em determinadas modalidades, a porção direcionada a células do grupo de conjugado tem a seguinte estrutura:



[00725] em que Y e Z são independentemente selecionados de um grupo alquila, alquenila ou alquinila substituído ou não substituído C_1-C_{12} ou um grupo compreendendo um éter, uma cetona, uma amida, um éster, um carbamato, uma amina, uma piperidina, um fosfato, uma fosfodiéster, um fosforotioato, um triazol, uma pirrolidina, um dissulfeto ou um tioéter.

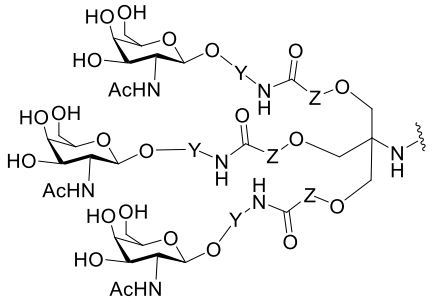
[00726] Em determinadas modalidades, a porção direcionada a células do grupo de conjugado tem a seguinte estrutura:



[00727] em que Y e Z são independentemente selecionados de um

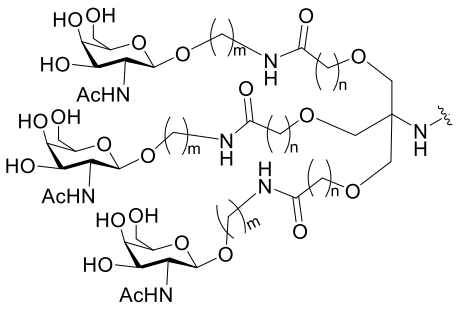
grupo alquila substituído ou não substituído C_1-C_{12}, ou um grupo compreendendo exatamente um éter ou exatamente dois éteres, uma amida, uma amina, uma piperidina, um fosfato, um fosfodiéster ou um fosforotioato.

[00728] Em determinadas modalidades, a porção direcionada a células do grupo de conjugado tem a seguinte estrutura:



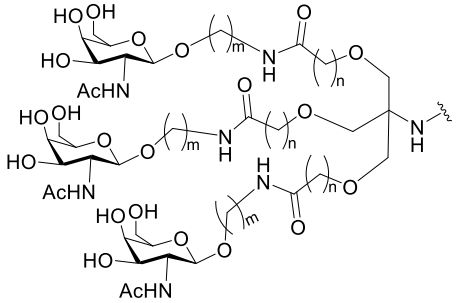
em que Y e Z são selecionados independentemente de um grupo alquila C_1-C_{12} substituído ou não substituído.

[00729] Em determinadas modalidades, a porção direcionada a células do grupo de conjugado tem a seguinte estrutura:



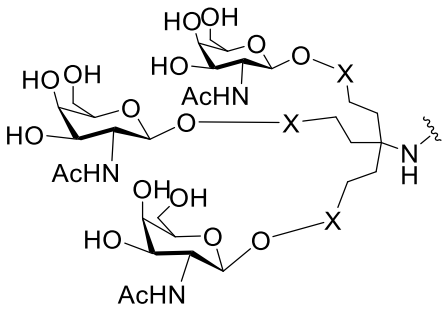
[00730] em que m e n são selecionados independentemente de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12.

[00731] Em determinadas modalidades, a porção direcionada a células do grupo de conjugado tem a seguinte estrutura:



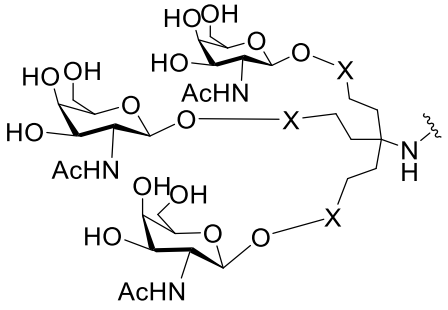
onde m é 4, 5, 6, 7 ou 8, e n é 1, 2, 3 ou 4.

[00732] Em determinadas modalidades, a porção direcionada a células do grupo de conjugado tem a seguinte estrutura:



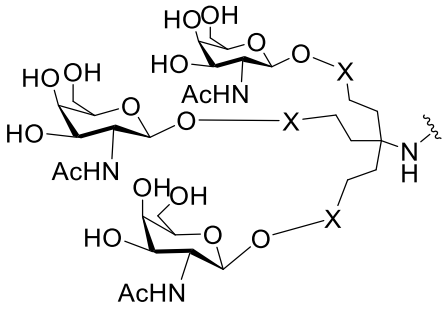
[00733] onde X é uma corrente substituída ou não substituída de quatro a treze átomos ligados consecutivamente, e onde X não compreende um grupo éter.

[00734] Em determinadas modalidades, a porção direcionada a células do grupo de conjugado tem a seguinte estrutura:



[00735] onde X é uma corrente substituída ou não substituída de oito átomos consecutivamente ligados, e onde X não compreende um grupo éter.

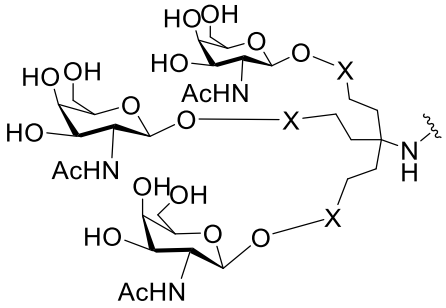
[00736] Em determinadas modalidades, a porção direcionada a células do grupo de conjugado tem a seguinte estrutura:



[00737] onde X é uma corrente substituída ou não substituída de

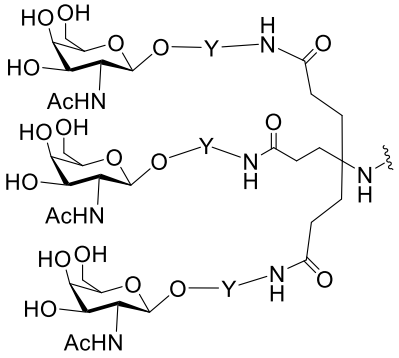
quatro a treze átomos consecutivamente ligados e em que a corrente compreende exatamente uma ligação amida, e onde X não compreende um grupo éter.

[00738] Em determinadas modalidades, a porção direcionada a células do grupo de conjugado tem a seguinte estrutura:



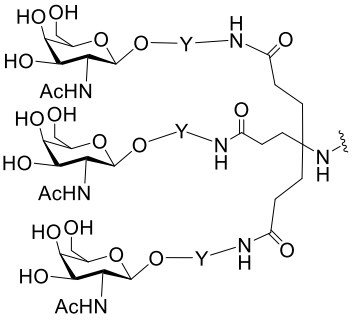
[00739] em que X é uma corrente substituída ou não substituída de quatro a treze átomos ligados consecutivamente e em que a corrente consiste em uma ligação amida e um grupo alquila C_2-C_{11} substituído ou não substituído.

[00740] Em determinadas modalidades, a porção direcionada a células do grupo de conjugado tem a seguinte estrutura:



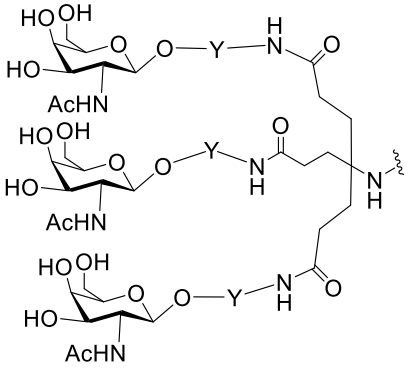
[00741] em que Y e Z são independentemente selecionados de um grupo alquila, alquenila ou alquinila C_1-C_{12} substituído ou não substituído ou um grupo compreendendo um éter, uma cetona, uma amida, um éster, um carbamato, uma amina, uma piperidina, um fosfato, uma fosfodiéster, um fosforotioato, um triazol, uma pirrolidina, um dissulfeto ou um tioéter.

[00742] Em determinadas modalidades, a porção direcionada a células do grupo de conjugado tem a seguinte estrutura:



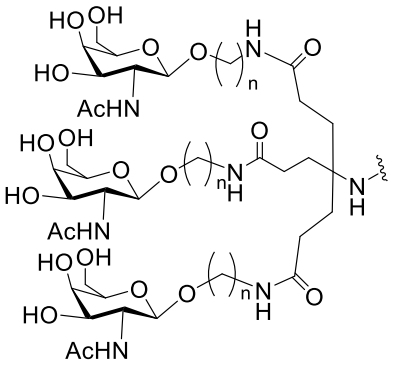
[00743] em que Y é selecionado a partir de um grupo alquila C_1-C_{12} substituído ou não substituído, ou um grupo compreendendo um éter, uma amina, uma piperidina, um fosfato, um fosfodiéster ou um fosforotioato.

[00744] Em determinadas modalidades, a porção direcionada a células do grupo de conjugado tem a seguinte estrutura:



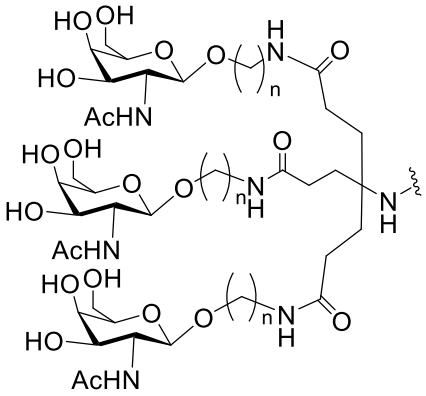
[00745] em que Y é selecionado de um grupo alquila C_1-C_{12} substituído ou não substituído.

[00746] Em determinadas modalidades, a porção direcionada a células do grupo de conjugado tem a seguinte estrutura:



[00747] em que n é 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ou 12.

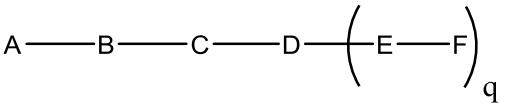
[00748] Em determinadas modalidades, a porção direcionada a células do grupo de conjugado tem a seguinte estrutura:



em que n é 4, 5, 6, 7 ou 8.

Certos compostos antissenso conjugados

[00749] Em determinadas modalidades, os conjugados estão ligados a um nucleosídeo do oligonucleotídeo antissenso nas posições 2', 3', 5' do nucleosídeo. Em determinadas modalidades, um composto antissenso conjugado tem a seguinte estrutura:



em que

[00750] A é o oligonucleotídeo antissenso;

[00751] B é a porção clivável

[00752] C é o ligador do conjugado

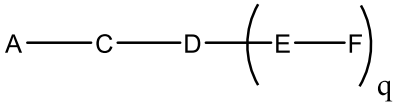
[00753] D é o grupo de ramificação

[00754] cada E é uma corrente;

[00755] cada F é um ligante; e

[00756] q é um número inteiro entre 1 e 5.

[00757] Em determinadas modalidades, um composto antissenso conjugado tem a seguinte estrutura:



em que

[00758] A é o oligonucleotídeo antissenso;

[00759] C é o ligador do conjugado

[00760] D é o grupo de ramificação

[00761] cada E é uma corrente;

[00762] cada F é um ligante; e

[00763] q é um número inteiro entre 1 e 5.

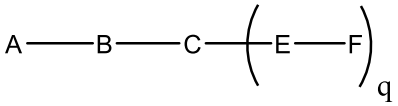
[00764] Em determinadas modalidades, o ligador conjugado compreende pelo menos uma ligação clivável.

[00765] Em determinadas modalidades, o grupo de ramificação compreende pelo menos uma ligação clivável.

[00766] Em determinadas modalidades, cada corrente compreende pelo menos uma ligação clivável.

[00767] Em determinadas modalidades, os conjugados estão ligados a um nucleosídeo do oligonucleotídeo antissenso nas posições 2', 3', 5' do nucleosídeo.

[00768] Em determinadas modalidades, um composto antissenso conjugado tem a seguinte estrutura:



em que

[00769] A é o oligonucleotídeo antissenso;

[00770] B é a porção clivável

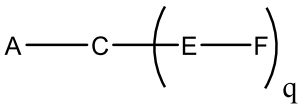
[00771] C é o ligador do conjugado

[00772] cada E é uma corrente;

[00773] cada F é um ligante; e

[00774] q é um número inteiro entre 1 e 5.

[00775] Em determinadas modalidades, os conjugados estão ligados a um nucleosídeo do oligonucleotídeo antissenso nas posições 2', 3', 5' do nucleosídeo. Em determinadas modalidades, um composto antissenso conjugado tem a seguinte estrutura:



em que

[00776] A é o oligonucleotídeo antissenso;

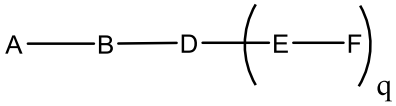
[00777] C é o ligador do conjugado

[00778] cada E é uma corrente;

[00779] cada F é um ligante; e

[00780] q é um número inteiro entre 1 e 5.

[00781] Em determinadas modalidades, um composto antissenso conjugado tem a seguinte estrutura:



em que

[00782] A é o oligonucleotídeo antissenso;

[00783] B é a porção clivável

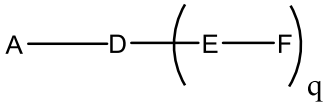
[00784] D é o grupo de ramificação

[00785] cada E é uma corrente;

[00786] cada F é um ligante; e

[00787] q é um número inteiro entre 1 e 5.

[00788] Em determinadas modalidades, um composto antissenso conjugado tem a seguinte estrutura:



em que

[00789] A é o oligonucleotídeo antissenso;

[00790] D é o grupo de ramificação

[00791] cada E é uma corrente;

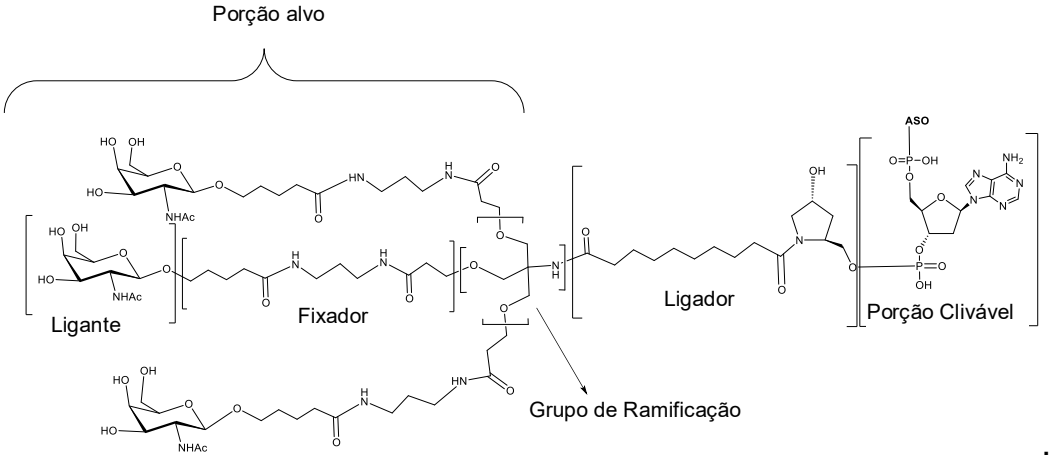
[00792] cada F é um ligante; e

[00793] q é um número inteiro entre 1 e 5.

[00794] Em determinadas modalidades, o ligador conjugado compreende pelo menos uma ligação clivável.

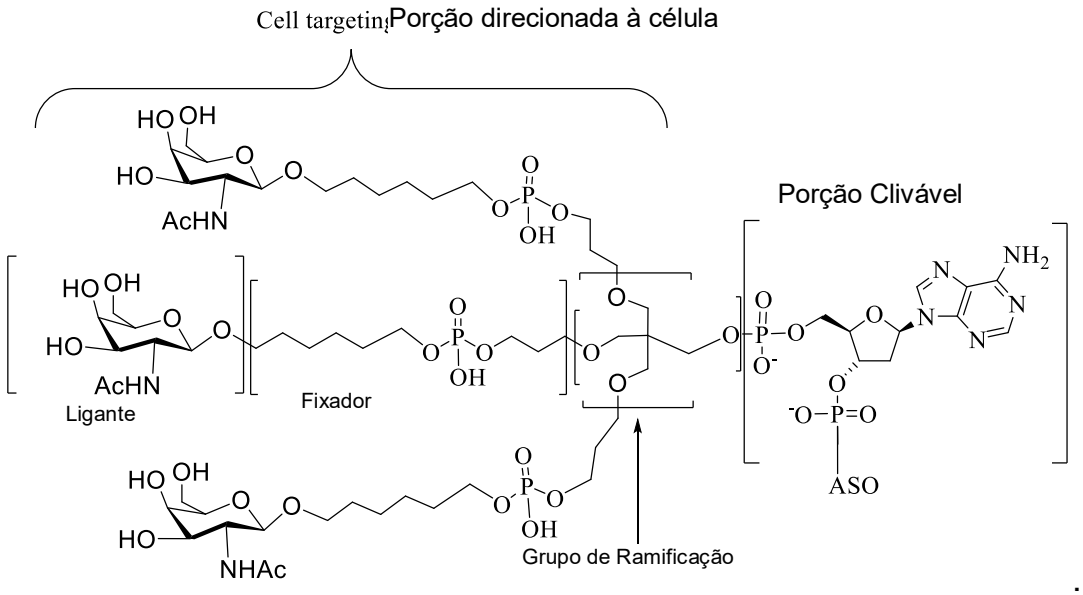
[00795] Em determinadas modalidades, cada corrente compreende pelo menos uma ligação clivável.

[00796] Em determinadas modalidades, um composto antissenso conjugado tem uma estrutura selecionada entre os itens a seguir:



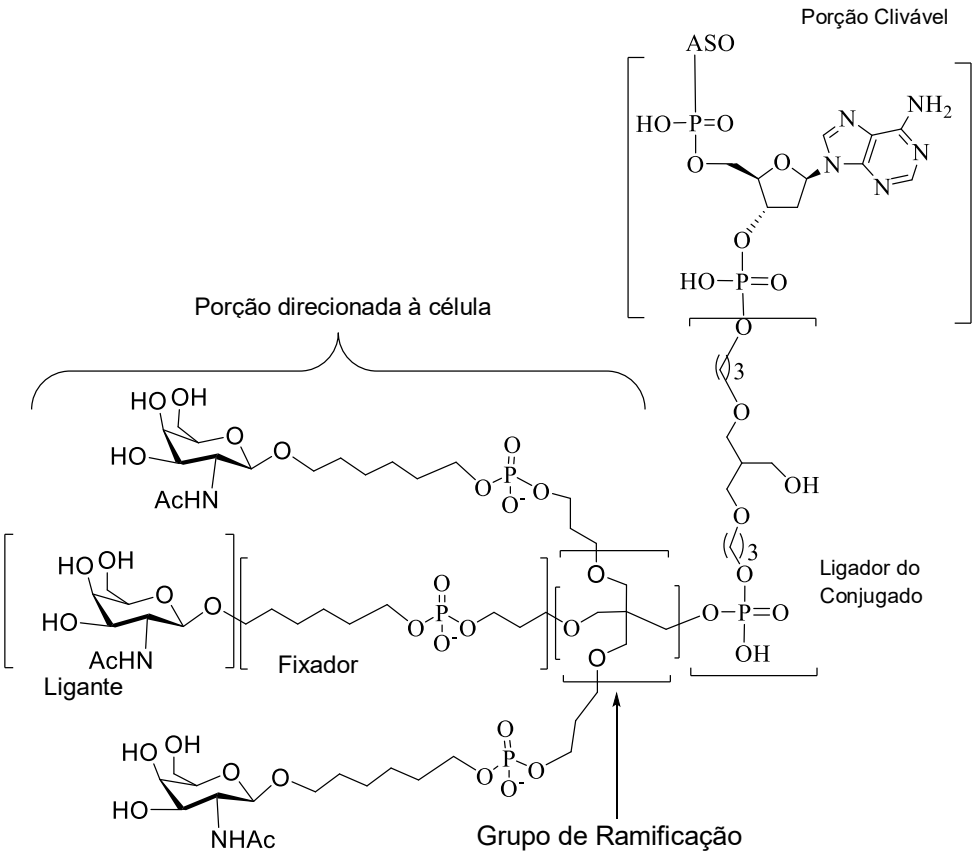
.

[00797] Em determinadas modalidades, um composto antissenso conjugado tem uma estrutura selecionada entre os itens a seguir:

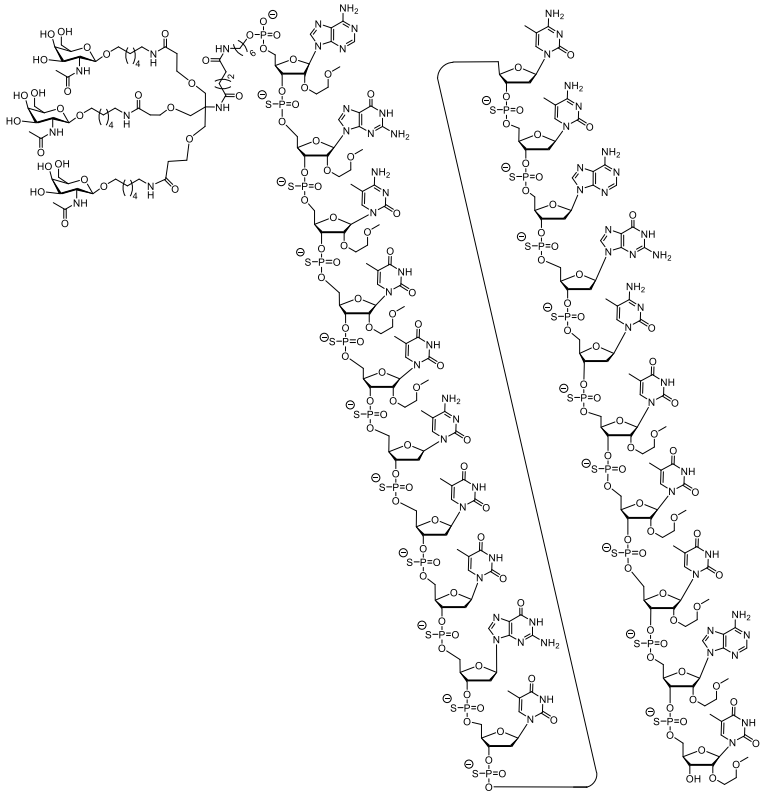


.

[00798] Em determinadas modalidades, um composto antissenso conjugado tem uma estrutura selecionada entre os itens a seguir:



[00799] Em determinadas modalidades, um composto antissenso conjugado tem a seguinte estrutura:



[00800] Patentes Representativas dos Estados Unidos, publicações de pedido de patente dos Estados Unidos e publicações de pedido de patente internacionais que ensinam a preparação de determinados conjugados observados acima, compostos antissenso conjugados, correntes, ligadores, grupos de ramificação, ligantes, frações cliváveis, bem como outras modificações , incluem, sem limitação, US 5.994.517, US 6.300.319, US 6.660.720, US 6.906.182, US 7.262.177, US 7.491.805, US 8.106.022, US 7.723.509, US 2006/0148740, US 2011/0123520, WO 2013/033230 e WO 2012/037254, cada uma das quais está incorporada aqui em sua totalidade por referência.

[00801] Publicações representativas que ensinam a preparação de determinados conjugados observados acima, compostos antissenso conjugados, correntes, ligadores, grupos de ramificação, ligantes, frações cliváveis, bem como outras modificações, incluem, sem limitação, BIESSEN et al., "The Cholesterol Derivative of a Triantennary Galactoside with High Affinity for the Hepatic Asialoglycoprotein Receptor: a Potent Cholesterol Lowering Agent" J. Med. Chem. (1995) 38:1846-1852, BIESSEN et al., "Synthesis of Cluster Galactosides with High Affinity for the Hepatic Asialoglycoprotein Receptor" J. Med. Chem. (1995) 38:1538-1546, LEE et al., "New and more efficient multivalent glyco-ligands for asialoglycoprotein receptor of mammalian hepatocytes" Bioorganic & Medicinal Chemistry (2011) 19:2494-2500, RENSEN et al., "Determination of the Upper Size Limit for Uptake and Processing of Ligands by the Asialoglycoprotein Receptor on Hepatocytes in Vitro and in Vivo" J. Biol. Chem. (2001) 276(40):37577-37584, RENSEN et al., "Design and Synthesis of Novel N-Acetylgalactosamine-Terminated Glycolipids for Targeting of Lipoproteins to the Hepatic Asialoglycoprotein Receptor" J. Med. Chem. (2004) 47:5798-5808, SLIEDREGT et al., "Design and Synthesis of Novel Amphiphilic Dendritic Galactosides for Selective Targeting of Liposomes to the Hepatic Asialoglycoprotein Receptor" J. Med.

Chem. (1999) 42:609-618, e Valentijn et al., "Solid-phase synthesis of lysine-based cluster galactosides with high affinity for the Asialoglycoprotein Receptor" Tetrahedron, 1997, 53(2), 759-770, cada um dos quais está incorporado aqui em sua totalidade por referência.

[00802] Em determinadas modalidades, os compostos antissenso conjugados compreendem um oligonucleotídeo à base de RNase H (tal como um gapmer) ou um oligonucleotídeo modulador de splice (tal como um oligonucleotídeo totalmente modificado) e qualquer grupo de conjugado compreendendo pelo menos um, dois ou três grupos GalNAc. Em determinadas modalidades, um composto antissenso conjugado compreende qualquer grupo de conjugado encontrado em qualquer uma das seguintes referências: Lee, *Carbohydr Res*, 1978, 67, 509-514; Connolly et al., *J Biol Chem*, 1982, 257, 939-945; Pavia et al., *Int J Pep Protein Res*, 1983, 22, 539-548; Lee et al., *Biochem*, 1984, 23, 4255-4261; Lee et al., *Glycoconjugate J*, 1987, 4, 317-328; Toyokuni et al., *Tetrahedron Lett*, 1990, 31, 2673-2676; Biessen et al., *J Med Chem*, 1995, 38, 1538-1546; Valentijn et al., *Tetrahedron*, 1997, 53, 759-770; Kim et al., *Tetrahedron Lett*, 1997, 38, 3487-3490; Lee et al., *Bioconjug Chem*, 1997, 8, 762-765; Kato et al., *Glycobiol*, 2001, 11, 821-829; Rensen et al., *J Biol Chem*, 2001, 276, 37577-37584; Lee et al., *Methods Enzymol*, 2003, 362, 38-43; Westerlind et al., *Glycoconj J*, 2004, 21, 227-241; Lee et al., *Bioorg Med Chem Lett*, 2006, 16(19), 5132-5135; Maierhofer et al., *Bioorg Med Chem*, 2007, 15, 7661-7676; Khorev et al., *Bioorg Med Chem*, 2008, 16, 5216-5231; Lee et al., *Bioorg Med Chem*, 2011, 19, 2494-2500; Kornilova et al., Analyt Biochem, 2012, 425, 43-46; Pujol et al., *Angew Chemie Int Ed Engl*, 2012, 51, 7445-7448; Biessen et al., *J Med Chem*, 1995, 38, 1846-1852; Sliedregt et al., *J Med Chem*, 1999, 42, 609-618; Rensen et al., *J Med Chem*, 2004, 47, 5798-5808; Rensen et al., *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26, 169-175; van Rossenberg et al., *Gene Ther*, 2004, 11, 457-464; Sato et al., *J Am*

Chem Soc, 2004, 126, 14013-14022; Lee et al., *J Org Chem*, 2012, 77, 7564-7571; Biessen et al., FASEB J, 2000, 14, 1784-1792; Rajur et al., Bioconjug Chem, 1997, 8, 935-940; Duff et al., Methods Enzymol, 2000, 313, 297-321; Maier et al., Bioconjug Chem, 2003, 14, 18-29; Jayaprakash et al., Org Lett, 2010, 12, 5410-5413; Manoharan, Antisense Nucleic Acid Drug Dev, 2002, 12, 103-128; Merwin et al., Bioconjug Chem, 1994, 5, 612-620; Tomiya et al., Bioorg Med Chem, 2013, 21, 5275-5281; Pedidos internacionais WO1998/013381; WO2011/038356; WO1997/046098; WO2008/098788; WO2004/101619; WO2012/037254; WO2011/120053; WO2011/100131; WO2011/163121; WO2012/177947; WO2013/033230; WO2013/075035; WO2012/083185; WO2012/083046; WO2009/082607; WO2009/134487; WO2010/144740; WO2010/148013; WO1997/020563; WO2010/088537; WO2002/043771; WO2010/129709; WO2012/068187; WO2009/126933; WO2004/024757; WO2010/054406; WO2012/089352; WO2012/089602; WO2013/166121; WO2013/165816; Patentes U.S. 4.751.219; 8.552.163; 6.908.903; 7.262.177; 5.994.517; 6.300.319; 8.106.022; 7.491.805; 7.491.805; 7.582.744; 8.137.695; 6.383.812; 6.525.031; 6.660.720; 7.723.509; 8.541.548; 8.344.125; 8.313.772; 8.349.308; 8.450.467; 8.501.930; 8.158.601; 7.262.177; 6.906.182; 6.620.916; 8.435.491; 8.404.862; 7.851.615; Publicações de Pedido de Patente U.S. Publicados US2011/0097264; US2011/0097265; US2013/0004427; US2005/0164235; US2006/0148740; US2008/0281044; US2010/0240730; US2003/0119724; US2006/0183886; US2008/0206869; US2011/0269814; US2009/0286973; US2011/0207799; US2012/0136042; US2012/0165393; US2008/0281041; US2009/0203135; US2012/0035115; US2012/0095075; US2012/0101148; US2012/0128760;

US2012/0157509; US2012/0230938; US2013/0109817; US2013/0121954; US2013/0178512; US2013/0236968; US2011/0123520; US2003/0077829; US2008/0108801; e US2009/0203132; cada um dos quais está incorporado aqui em sua totalidade por referência.

Certos Usos e Recursos

[00803] Em determinadas modalidades, os compostos antissenso conjugados exibem potente redução de RNA alvo in vivo. Em determinadas modalidades, os compostos antissenso não conjugados se acumulam nos rins. Em determinadas modalidades, os compostos antissenso conjugados se acumulam no fígado. Em determinadas modalidades, os compostos antissenso conjugados são bem tolerados. Essas propriedades rendem compostos antissenso conjugados particularmente úteis para inibição de muitos RNAs alvo, incluindo, entre outros, aqueles envolvidos em doenças metabólicas, cardiovasculares e outras doença, distúrbios ou condições. Assim, aqui são apresentados métodos de tratamento dessas doenças, distúrbios ou condições contactando tecidos do fígado com os compostos antissenso conjugados direcionados aos RNAs associados a essas doenças, distúrbios ou condições. Assim, são também apresentados métodos para atenuar qualquer variedade de doenças metabólicas, cardiovasculares e outras doenças ou condições com os compostos antissenso conjugados da presente invenção.

[00804] Em determinadas modalidades, os compostos antissenso conjugados são mais potentes do que a contraparte não conjugada em uma concentração de tecido específica. Sem querer se vincular a qualquer teoria ou mecanismo, em determinadas modalidades, o conjugado pode permitir que o composto antissenso conjugado entre na célula de maneira mais eficiente ou entre na célula de forma mais produtiva. Por

exemplo, em determinadas modalidades os compostos antissenso conjugados podem apresentar uma redução-alvo maior em comparação com a sua contraparte não conjugada, em que o composto antissenso conjugado e sua contraparte não conjugada estão presentes no tecido nas mesmas concentrações. Por exemplo, em determinadas modalidades, os compostos antissenso conjugados podem apresentar redução-alvo maior em comparação com a sua contraparte não conjugada, em que o composto antissenso conjugado e sua contraparte não conjugada estão presentes no fígado nas mesmas concentrações.

[00805] A absorção produtiva e não produtiva de oligonucleotídeos foi discutida anteriormente (ver, por exemplo, Geary, R. S., E. Wancewicz, et al. (2009). "Effect of Dose and Plasma Concentration on Liver Uptake and Pharmacologic Activity of a 2'-Methoxyethyl Modified Chimeric Antisense Oligonucleotide Targeting PTEN." Biochem. Pharmacol. 78(3): 284-91; & Koller, E., T. M. Vincent, et al. (2011). "Mechanisms of single-stranded phosphorothioate modified antissenso oligonucleotide accumulation in hepatocytes." Nucleic Acids Res. 39(11): 4795-807). Os grupos conjugados aqui descritos podem melhorar a absorção produtiva.

[00806] Em determinadas modalidades, os grupos de conjugado descritos aqui podem melhorar ainda mais a potência, aumentando a afinidade do composto antissenso conjugado por um tipo específico de célula ou tecido. Em determinadas modalidades, os grupos conjugados aqui descritos podem melhorar ainda mais a potência aumentando o reconhecimento do composto antissenso conjugado por um ou mais receptores de superfície da célula. Em determinadas modalidades, os grupos de conjugado descritos aqui podem melhorar ainda mais a potência, facilitando a endocitose do composto antissenso conjugado.

[00807] Em determinadas modalidades, a porção clivável pode melhorar ainda mais a potência, permitindo que o conjugado seja clivado a

partir do oligoucleotídeo antissenso após o composto antissenso conjugado ter entrado na célula. Nesse sentido, em determinadas modalidades, os compostos antissenso conjugados podem ser administrados em doses menores do que seria necessário para os oligonucleotídeos antissenso não conjugados.

[00808] Ligações fosforotioato foram incorporadas nos oligonucleotídos antissenso anteriormente. Tais ligações fosforotioato são resistentes às nucleases e assim melhoram a estabilidade do oligonucleotídeo. Além disso, as ligações de fosforotioato também ligam certas proteínas, o que resulta em acúmulo de oligonucleotídeo no fígado. Oligonucleotídeos com mesnos ligações fosforotioato se acumulam menos no fígado e mais nos rins (ver, por exemplo, Geary, R., "Pharmacokinetic Properties of 2'-O-(2-Methoxyethyl)-Modified Oligonucleotide Analogs in Rats," Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, Vol. 296, No. 3, 890-897; & Pharmacological Properties of 2'-O-Methoxyethyl Modified Oligonucleotides in Antisense a Drug Technology, Capítulo 10, Crooke, S.T., ed., 2008). Em determinadas modalidades, os oligonucelotídeos com menos ligações internucleosídicas fosforotioato e mais ligações internucleosídicas fosfodiéster se acumulam menos no fígado e mais nos rins. Ao tratar doenças no fígado, não é desejável, por vários motivos (1) que menos fármacos entrem no sítio de ação desejado (fígado); (2) que o fármaco saia na urina; e (3) que os rins sejam expostos a uma concentração relativamente alta de fármacos que pode resultar em toxicidade nos rins. Assim, para doenças do fígado, as ligações fosforotioato fornecem benefícios importantes.

[00809] Em determinadas modalidades, entretanto, a administração de oligonucleotídeos uniformemente ligados por ligações internucleosídicas fosforotioato induz uma ou mais reações pró-inflamatórias. (ver, por exemplo: J Lab Clin Med. setembro de 1996;128(3):329-38. "Ampli-

fication of antibody production by phosphorothioate oligodeoxynucleotides". Branda et al.; e ver também, por exemplo: Toxicologic Properties in Antisense a Drug Technology, Capítulo 12, páginas 342-351, Crooke, S.T., ed., 2008). Em determinadas modalidades, a administração de oligonucleotídeos em que a maioria das ligações internucleosídicas compreendem ligações internucleosídicas fosforotioato induz uma ou mais reações pró-inflamatórias.

[00810] Em determinadas modalidades, o grau de efeito pró-inflamatório pode depender de várias variáveis (por exemplo, modificação da estrutura principal, efeitos fora do alvo, modificações nucleobásicas e/ou modificações nucleosídeas) ver, por exemplo: Toxicologic Properties in Antisense a Drug Technology, Capítulo 12, páginas 342-351, Crooke, S.T., ed., 2008). Em determinadas modalidades, o grau de efeito pró-inflamatório pode ser atenuado pelo ajuste de uma ou mais variáveis. Por exemplo, o grau de efeito pró-inflamatório de um determinado oligonucleotídeo pode ser mitigado pela substituição de qualquer número de ligações internucleosídeas de fosfotioato com ligações internucleosídeas de fosfodiéster reduzindo, assim, o número total de ligações internucleosídeas de fosforotioato.

[00811] Em determinadas modalidades, seria desejável reduzir o número de ligações fosforotioato, se isso pudesse ser feito sem perder a estabilidade e sem mudar a distribuição do fígado para os rins. Por exemplo, em determinadas modalidades, o número de ligações fosforotioato pode ser reduzido, substituindo-se as ligações fosforotioato com ligações fosfodiéster. Em uma modalidade, o composto antissenso tendo menos ligações fosforotioato e mais ligações fosfodiéster pode induzir menos reações pró-inflamatórias ou nenhuma reação pró-inflamatória. Embora o composto antissenso tenha menos ligações fosforotioato e mais ligações fosfodiéster, ele pode induzir menos reações pró-

inflamatórias, o composto antissenso tendo menos ligações fosforotioato e mais ligações fosfodiéster pode não se acumular no fígado e pode ser menos eficaz na mesma dose ou na dose igual , em comparação a um composto antissenso tendo mais ligações fosforotioato. Em determinadas modalidades é, portanto, desejável projetar um composto antissenso que tenha várias ligações fosfodiéster e várias ligações fosforotioato, mas que possua também estabilidade e boa distribuição no fígado.

[00812] Em determinadas modalidades, os compostos antissenso conjugados se acumulam mais no fígado e menos nos rins do que as contrapartes não conjugadas, até mesmo quando algumas ligações fosforotioato são substituídas por menos ligações internucleosídicas fosfodiéster pró-inflamatórias. Em determinadas modalidades, os compostos antissenso conjugados se acumulam mais no fígado e não são tão excretados na urina em comparação com suas contrapartes não conjugadas, até mesmo quando algumas das ligações fosforotioato são substituídas por menos ligações internucleosídicas fosfodiéster pró-inflamatórias. Em determinadas modalidades, o uso de um conjugado permite a concepção de fármacos antissenso mais potentes e melhor tolerados. Com efeito, em determinadas modalidades, os compostos antissenso conjugados têm índices terapêuticos maiores do que as contrapartes não conjugadas. Isso permite que o composto antissenso conjugado seja administrado em uma dose absoluta maior, porque há um risco menor de uma resposta pró-inflmatória e menor risco de toxicidade renal. Esta dose maior, permite que a dose tenha uma frequência menor, já que espera-se que o clearance (metabolismo) seja semelhante. Além disso, porque o composto é mais potente, como descrito acima, a concentração pode diminuir antes da próxima dose sem perder a atividade terapêutica, permitindo até mesmo períodos mais longos entre dosagem.

[00813] Em determinadas modalidades, a inclusão de algumas ligações fosforotioato permanece desejável. Por exemplo, as ligações terminais são vulneráveis às exonucleases e assim, em determinadas modalidades, essas ligações são fosforotioato ou outra ligação modificada. As ligações internucleosídicas que ligam dois desoxinucleosídeos são vulneráveis às endonucleases e assim, em determinadas modalidades, essas ligações são fosforotioato ou outra ligação modificada. As ligações internucleosídicas entre um nucleosídeo modificado e um desoxinucleosídeo onde o desoxinucleosídeo está no lado 5' dos desoxinucleosídeos da ligação são vulneráveis às endonucleases e assim, em determinadas modalidades, essas ligações são fosforotioato ou outra ligação modificada. As ligações internucleosídicas entre dois nucleosídeos modificados de determinados tipos e entre um desoxinucleosídeo e um nucleosídeo modificado de deterinado tipo onde o nucleosídeo modificado está no lado 5' da ligação são suficientemente resistentes à digestão pela nuclease, que a ligação pode ser fofodiéster.

[00814] Em determinadas modalidades, o oligonucleotídeo antissenso de um composto antissenso conjugado compreende menos de 16 ligações fosforotioato. Em determinadas modalidades, o oligonucleotídeo antissenso de um composto compreende menos que 15 ligações fosforotioato. Em determinadas modalidades, o oligonucleotídeo antissenso de um composto antissenso conjugado compreende menos de 14 ligações fosforotioato. Em determinadas modalidades, o oligonucleotídeo antissenso de um composto compreende menos que 13 ligações fosforotioato. Em determinadas modalidades, o oligonucleotídeo antissenso de um composto antissenso conjugado compreende menos de 12 ligações fosforotioato. Em determinadas modalidades, o oligonucleotídeo antissenso de um composto antissenso conjugado compreende menos de 11 ligações fosforotioato. Em determinadas modalidades, o oligonucleotídeo antissenso de um composto antissenso conjugado

compreende menos de 10 ligações fosforotioato. Em determinadas modalidades, o oligonucleotídeo antissenso de um composto antissenso conjugado compreende menos de 9 ligações fosforotioato. Em determinadas modalidades, o oligonucleotídeo antissenso de um composto antissenso conjugado compreende menos de 8 ligações fosforotioato.

[00815] Em determinadas modalidades, os compostos antissenso compreendendo um ou mais grupos conjugados descritos aqui aumentaram a atividade e/ou potência e/ou tolerabilidade em comparação com um composto antissenso em que falta um ou mais grupo conjugado. Nesse sentido, em determinadas modalidades, a anexação desses grupos conjugados a um oligonucleotídeo é desejável. Esses grupos conjugados podem ser anexados às extremidades 5'-, e/ou 3' de um oligonucleotídeo. Em certos casos, a anexação na extremidade 5' é sinteticamente desejável. Normalmente, os oligonucleotídeos são sintetizados pela anexação do nucleosídeo terminal 3' a um suporte sólido e acoplamento sequencial de nucleosídeos de 3' a 5' usando técnicas que são bem conhecidas na técnica. Nesse sentido, se um grupo de conjugado é desejado no terminal 3', é possível (1) anexar o grupo de conjugado ao nucleosídeo do terminal 3' e anexar esse nucleosídeo conjugado ao suporte sólido para preparação subsequente do oligonucleotídeo ou (2) anexar o grupo de conjugado ao nucleosídeo do terminal 3' de um nucleosídeo completo após a síntese. Nenhuma dessas abordagens é muito eficiente e, portanto, ambas são caras. Em particular, a anexação do nucleosídeo conjugado ao suporte sólido, demonstrada nos Exemplos deste documento, é um processo ineficiente. Em determinadas modalidades, anexar um grupo de conjugado ao nucleosídeo do terminal 5' é sinteticamente mais fácil do que a anexação na extremidade 3'. É possível anexar um nucleosídeo do terminal 3' não conjugado ao suporte sólido e preparar o oligonucleotídeo usando reações padrão e bem caracterizadas. Assim, é necessário apenas anexar um nucleosídeo 5'

tendo um grupo de conjugado na etapa final de acoplamento. Em determinadas modalidades, isto é mais eficiente do que a anexação direta de um nucleosídeo conjugado ao suporte sólido, como normalmente é feito para preparar o oligonucleotídeo conjugado em 3'. Os exemplos aqui demonstram anexação na extremidade 5'. Além disso, certos grupos conjugados têm vantagens sintéticas. Por exemplo, certos grupos conjugados compreendendo grupos de ligação de fósforo são sinteticamente mais simples e mais eficientemente preparados do que outros grupos conjugados, incluindo grupos conjugados relatados anteriormente (por exemplo, WO/2012/037254).

[00816] Em determinadas modalidades, os compostos antissenso conjugados são administrados a um indivíduo. Em determinadas modalidades, os compostos antissenso compreendendo um ou mais grupos conjugados descritos aqui aumentaram a atividade e/ou potência e/ou tolerabilidade em comparação com um composto antissenso sem um ou mais grupo conjugado. Sem vinculação ao mecanismo, acredita-se que o grupo de conjugado ajuda com a distribuição, entrega e/ou absorção em uma célula ou tecido alvo. Em determinadas modalidades, assim que estiver na célula ou tecido alvo, é desejável que todo ou parte do grupo de conjugado seja clivado para liberar o oligonucleotídeo ativo. Em determinadas modalidades, não é necessário que o grupo de conjugado inteiro seja clivado a partir do oligonucleotídeo. Por exemplo, no Exemplo 20, um oligonucleotídeo conjugado foi administrado a camundongos e várias espécies químicas diferentes, sendo que cada uma compreende uma parte diferente do grupo de conjugado restante no oligonucleotídeo, foram detectadas (Tabela 23a). Este composto antissenso conjugado demonstrou boa potência (Tabela 23). Assim, em determinadas modalidades, esse perfil metabólito de várias clivagens parciais do grupo de conjugado não interfere na atividade/potência. No entanto, em determinadas modalidades, é desejável que um profármaco

(oligonucleotídeo conjugados) produza um composto ativo único. Em certos casos, se várias formas do composto ativo forem encontradas, pode ser necessário determinar quantidades relativas e atividades para cada um. Em determinadas modalidades em que a revisão da regulamentação é necessária (por exemplo, USFDA ou análogo) é desejável ter uma espécie ativa única (ou predominantemente única). Em determinadas modalidades, é desejável que espécies ativas únicas sejam o oligonucleotídeo antissenso desprovido de qualquer parte do grupo conjugado. Em determinadas modalidades, os grupos conjugados na extremidade 5' são mais propensos a resultar em metabolismo completo do grupo conjugado. Sem vinculação ao mecanismo, pode ser que as enzimas endógenas responsáveis pelo metabolismo na extremidade 5' (por exemplo, nucleases 5') sejam mais ativas/eficientes do que as contrapartes 3'. Em determinadas modalidades, os grupos conjugados específicos são mais receptivos a metabolismo de uma espécie ativa única. Em determinadas modalidades, certos grupos conjugados são mais receptivos ao metabolismo do oligonucleotídeo.

D. Antissenso

[00817] Em determinadas modalidades, os compostos oligoméricos da presente invenção são compostos antissenso. Nessas modalidades, o composto oligomérico é complementar ao ácido nucleico alvo. Em determinadas modalidades, um ácido nucleico alvo é um RNA. Em determinadas modalidades, um ácido nucleico alvo é um RNA não codificante. Em determinadas modalidades, um ácido nucleico alvo codifica uma proteína. Em determinadas modalidades, um ácido nucleico alvo é selecionado a partir de um mRNA, um pré-mRNA, um microRNA, um RNA não codificante, incluindo um RNA não codificante pequeno e um RNA direcionado pelo promotor. Em determinadas modalidades, os compostos oligoméricos são pelo menos parcialmente complementares a mais de um ácido nucleico alvo. Por exemplo, compostos oligoméricos

da presente invenção podem ser imitações de microRNA, que normalmente se ligam a vários alvos.

[00818] Em determinadas modalidades, os compostos antissenso compreendem uma parte tendo uma sequência nucleobásica pelo menos 70% complementar à sequência de nucleobases de um ácido nucleico alvo. Em determinadas modalidades, os compostos antissenso compreendem uma parte que tem uma sequência de nucleobase pelo menos 80% complementar à sequência de nucleobases de um ácido nucleico alvo. Em determinadas modalidades, os compostos antissenso compreendem uma parte que tem uma sequência de nucleobase pelo menos 90% complementar à sequência de nucleobases de um ácido nucleico alvo. Em determinadas modalidades, os compostos antissenso compõem uma parte tendo uma sequência de nucleobase pelo menos 95% complementar à sequência de nucleobases de um ácido nucleico alvo. Em determinadas modalidades, os compostos antissenso compreendem uma parte que tem uma sequência de nucleobase pelo menos 98% complementar à sequência de nucleobases de um ácido nucleico alvo. Em determinadas modalidades, os compostos antissenso compreendem uma parte que tem uma sequência de nucleobase que é 100% complementar à sequência de nucleobases de um ácido nucleico alvo. Em determinadas modalidades, os compostos antissenso são pelo menos 70%, 80%, 90%, 95%, 98% ou 100% complementares à sequência de nucleobases de um ácido nucleico alvo em todo o comprimento do composto antissenso.

[00819] Os mecanismos antissenso incluem qualquer mecanismo que envolva a hibridação de um composto oligoméricos com ácido nucleico alvo, em que a hibridização resulta em um efeito biológico. Em determinadas modalidades, esses resultados de hibridação na degradação do ácido nucleico alvo ou na ocupação com inibição ou estimula-

ção concomitantes da maquinaria celular envolvendo, por exemplo, tradução, transcrição ou poliadenilação do ácido nucleico alvo ou de um ácido nucleico com o qual o ácido nucleico alvo pode, de outro modo, interagir.

[00820] Um tipo de mecanismo antissenso envolvendo a degradação do RNA alvo é antissenso mediado por RNase H. RNase H é uma endonuclease celular que cliva a fita de RNA de um duplex de DNA. É conhecido na técnica que os compostos antissenso de fita única que são "similares ao DNA" eliciam atividade de RNase H nas células de mamíferos. A ativação de RNase H, portanto, resulta na clivagem do RNA alvo, aumentando, assim, a eficiência da inibição mediada por oligonucleotídeo similar ao DNA da expressão do gene.

[00821] Os mecanismos antissenso também incluem, sem limiação, mecanismos de RNAi, que utilizam a via RISC. Esses mecanismos de RNAi incluem, sem limitação, mecanismos de siRNA, ssRNA e microRNA. Esses mecanismos incluem a criação de um mímico de microRNA e/ou anti-microRNA.

[00822] Mecanismos antissenso incluem também, sem limitação, mecanismos que hibridizam ou mímico de RNA não codificante diferente do microRNA ou mRNA. Esse RNA não codificante inclui, entre outros, RNA direcionado ao promotor e RNA curto e longo que dar efeito à transcrição ou tradução de um ou mais ácidos nucleicos.

[00823] Em determinadas modalidades, os oligonucleotídeos que compreendem conjugados aqui descritos são compostos de RNAi. Em determinadas modalidades, oligonucleotídeos oligoméricos que compreendem conjugados aqui descritos são compostos de ssRNA. Em determinadas modalidades, os oligonucleotídeos que compreendem conjugados aqui descritos são emparelhados com um segundo composto oligomérico para formar um siRNA. Em algumas dessas modalidades, o segundo composto oligomérico também compreende um conjugado.

Em determinadas modalidades, o segundo composto oligomérico é qualquer ácido nucleico modificado ou não modificado. Em determinadas modalidades, os oligonucleotídeos que compreendem conjugados aqui descritos são uma fita antissenso em um composto de siRNA. Em determinadas modalidades, os oligonucleotídeos que compreendem os conjugados aqui descritos são uma fita senso em um composto de siRNA. Em modalidades em que o composto oligomérico conjugado é siRNA de fita dupla, o conjugado pode estar na fita senso, na fita antissenso ou na fita senso e na fita antissenso.

Apolipoproteína C-III (apoCIII)

[00824] Em determinadas modalidades, os compostos antissenso conjugados se direcionam a qualquer ácido nucleico de ApoCIII. Em determinadas modalidades, o ácido nucleico alvo codifica uma proteína alvo ApoCIII que é clinicamente relevante. Nessas modalidades, a modulação do ácido nucleico alvo resulta em benefício clínico.

[00825] O processo de direcionamento inclui, geralmente, determinação de pelo menos uma região, segmento ou sítio alvo no ácido nucleico alvo para que a interação antissenso ocorra de modo que resulte no efeito desejado.

[00826] Em determinadas modalidades, uma região alvo é uma região estruturalmente definida do ácido nucleico. Por exemplo, nessas modalidades, uma região alvo pode abranger UTR 3', UTR 5', um éxon, um íntron, uma região codificante, uma região de iniciação da tradução, região de término de tradução ou outra região ou definida de ácido nucleico ou segmento alvo.

[00827] Em determinadas modalidades, um segmento alvo é pelo menos uma parte de cerca de 8 nucleobases de uma região alvo ao qual o composto antissenso conjugado se direciona. Os segmentos-alvo podem incluir sequências de DNA ou RNA que compreendem pelo menos 8 nucleobases consecutivas do terminal 5' de um dos segmentos-alvo

(sendo que as nucleobases remanescentes são um trecho consecutivo do mesmo DNA ou RNA iniciando imediatamente a montante do terminal 5' do segmento-alvo e continuando até o DNA ou o RNA que compreende cerca de 8 a cerca de 30 nucleobases). Segmentos-alvo também são representados por sequências de DNA ou RNA que compreendem pelo menos 8 nucleobases consecutivos de terminal 3' de um dos segmentos-alvo (sendo que as nucleobases remanescentes são um trecho consecutivo do mesmo DNA ou RNA iniciando imediatamente a jusante do terminal 3' do segmento-alvo e continuando até o DNA ou o RNA que compreende cerca de 8 a 30 nucleobases). Segmentos-alvo também são representados por sequências de DNA ou RNA que compreendem pelo menos 8 nucleobases consecutivas de uma parte interna da sequência de um segmento-alvo e pode se estender em ambas as direções até o composto antissenso conjugado que compreende cerca de 8 a 30 nucleobases.

[00828] Em determinadas modalidades, os compostos antissenso direcionados ao ácido nucleico de ApoCIII podem ser modificados conforme descrito aqui. Em determinadas modalidades, os compostos antissenso podem ter uma porção de açúcar modificado, uma porção de açúcar não modificado ou uma mistura de frações de açúcar modificado e não modificado conforme descrito aqui. Em determinadas modalidades, os compostos antissenso podem ter uma ligação de internucleosídeo modificado, uma ligação de internucleosídeo não modificado ou uma ligação de internucleosídeo modificado e não modificado conforme descrito aqui. Em determinadas modalidades, os compostos antissenso podem ter uma nucleobase modificada, uma nucleobase não modificada ou uma mistura de nucleobases modificadas e não modificadas conforme descrito aqui. Em determinadas modalidades, os compostos antissenso podem ter um motivo, conforme descrito aqui.

[00829] Em determinadas modalidades, os compostos antissenso direcionados aos ácidos nucleicos de ApoCIII podem ser conjugados conforme descrito aqui.

[00830] ApoCIII é um constituinte do HDL e de lipoproteínas ricas em triglicerídeos (TG). Níveis elevados de ApoCIII estão associados a níveis de TG elevados e a doenças como doença cardiovascular, síndrome metabólica, obesidade e diabetes. Os níveis de TG elevados estão associados à pancreatite. ApoCIII retarda a clearance de lipoproteínas ricas em TG pela inibição de lipólise por meio da inibição da lipoproteína lipase (LPL) e por meio da interferência com a lipoproteína que se liga à matriz de glicosaminoglicano da superfície celular. Compostos antissenso que direcionam a ApoCIII foram previamente divulgados em WO2004/093783 e WO2012/149495, incorporados a este documento por referência na sua totalidade.

Certos Compostos Antissenso Conjugados Direcionados a um Ácido Nucleico da ApoCIII

[00831] Em determinadas modalidades, os compostos antissenso conjugados são direcionados a um ácido nucleico de ApoCIII tendo sequência do Nº de Acesso GENBANK® NM_000040.1 (incorporado a este documento como SEQ ID NO: 1); Acesso GENBANK NT_033899.8 truncado a partir de nucleotídeos 20262640 a 20266603 (incorporados aqui como SEQ ID NO: 2); e Nº de Acesso GENBANK NT_035088.1 trucado a partir dos nucleotídeos 6238608 a 6242565 (incorporado a este documento como SEQ ID NO: 3). Em determinadas modalidades, um composto antissenso conjugado é pelo menos 90%, pelo menos, 95% ou 100% complementar à SEQ ID NOs: 1-3.

[00832] Em determinadas modalidades, um composto antissenso conjugado direcionado à SEQ ID NO: 1 compreende uma sequência de pelo menos 8 nucleobases consecutivas da SEQ ID NO: 87. Em determinadas modalidades, um composto antissenso conjugado direcionado

à SEQ ID NO: 1 compreende uma sequência de nucleobase da SEQ ID NO: 87.

Tabela A: Compostos Antissenso direcionados à SEQ ID NO da ApoCIII: 1

Nº ISIS	Sítio de Início do Alvo	Sequência (5'-3')	Motivo	SEQ ID NO
304801	508	AGCTTCTTGTCCAGCTTTAT	eeeeedddddddddeeeee	87
647535	508	AGCTTCTTGTCCAGCTTTAT	eeeeedddddddddeeeeeod	87
616468	508	AGCTTCTTGTCCAGCTTTAT	eeeeedddddddddeeeee	87
647536	508	AGCTTCTTGTCCAGCTTTAT	eeoeoeoeoddddddddddeoeoeeeod	87

Indicações Terapêuticas da ApoCIII

[00833] Em determinadas modalidades, a invenção provê métodos para o uso de um composto antissenso conjugado direcionado a um ácido nucleico da ApoCIII para modular a expressão da ApoB em um indivíduo. Em determinadas modalidades, a expressão da ApoCIII é reduzida.

[00834] Em determinadas modalidades, a invenção provê métodos para o uso de um composto antissenso conjugado direcionado a um ácido nucleico da ApoCIII em uma composição farmacêutica para o tratamento de um indivíduo. Em determinadas modalidades, o indivíduo tem doença, distúrbio ou condição cardiovascular e/ou metabólica. Em determinadas modalidades, o indivíduo tem hipertrigliceridemia, hipertrigliceridemia não familiar, hipertrigliceridemia familiar, hipertrigliceridemia familiar heterozigótica, hipertrigliceridemia familiar homozigótica, dislipidemia mista, aterosclerose, risco de desenvolver aterosclerose, doença coronariana, histórico de doença coronariana, início precoce de doença coronariana, um ou mais fatores de risco para doença coronariana, diabetes tipo II, diabetes tipo II com dislipidemia, dislipidemia, hipertrigliceridemia, hiperlipidemia, hiperacidemia, esteatose hepática, esteatose hepática não alcoólica e/ou doença hepática gordurosa não alcoólica.

[00835] Em determinadas modalidades, a invenção provê métodos para o uso de um composto antissenso conjugado direcionado a um

ácido nucleico da ApoCIII na preparação de um medicamento.

Certos Conjugados GalNAc de Ácido Nucleico

[00836] Em determinadas modalidades, os compostos antissenso conjugados compreendem compostos antissenso com sequência de nucleobases e modificações químicas dos compostos antissenso na Tabela abaixo anexada ao conjugado de GalNAc. Todas as ligações internucleosídeas são ligações internucleosídeas de fosforotioato, salvo indicação em contrário. Um subscrito 'l' indica um nucleosídeo bicíclico de LNA. Um subscrito "d" indica um nucleosídeo 2'-desóxi. Um subscrito "e" indica um nucleosídeo modificado 2'-MOE. Um "V" indica 2-amino-2'-desoxiadenosina.

Tabela B

Sequência 5' a 3'	Motivo	Química	Ligações Internucleosídicas	SEQ ID NO:
$T_lG_lG_lC_dA_dA_dG_dC_dA_dT_dC_dC_dT_lG_lT_lA_d$	3-9-3-1	LNA/desóxi	fosforotioato	222
$C_lT_lC_lA_lA_dT_dC_dC_dA_dT_dG_dG_dC_lA_lG_lC_d$	4-8-3-1	LNA/desóxi	fosforotioato	223
$A_lC_lC_lA_dA_dG_dT_dT_dT_dC_dT_dT_dC_dA_lG_lC_l$	3-10-3	LNA/desóxi	fosforotioato	224
$G_lC_lA_dT_dT_dG_dG_dT_dA_dT_dT_lC_lA_l$	2-8-3	LNA/desóxi	fosforotioato	225
$T_lT_lC_lA_lG_lC_dA_dT_dT_dG_dG_dT_dA_dT_dT_dC_lA_lG_lT_lG_l$	5-10-5	LNA/desóxi	fosforotioato	226
$C_lA_lG_lC_dA_dT_dT_dG_dG_dT_dA_dT_dT_lC_lA_lG_d$	3-10-3	LNA/desóxi	fosforotioato	227
$C_lA_lG_lC_dA_dT_dT_dG_dG_dT_dA_dT_dT_lC_lA_l$	3-9-3	LNA/desóxi	fosforotioato	228
$A_lG_lC_lA_dT_dT_dG_dG_dT_dA_dT_dT_lC_lA_l$	3-8-3	LNA/desóxi	fosforotioato	229
$G_lC_lA_dT_dT_dG_dG_dT_dA_dT_dT_lC_l$	2-8-2	LNA/desóxi	fosforotioato	230
CGGCATGTCTATTTTGTA			fosforotioato	231
GGCTAAATCGCTCCACCAAG			fosforotioato	232
CTCTAGCGTCTTAAAGCCGA			fosforotioato	233
GCTGCATGATCTCCTTGGCG			fosforotioato	234
ACGTTGAGGGGCATCGTCGC			Morfolino	235
GGGTCTGCVGCGGGVTGGT			fosforotioato	236
GTTVCTVCTTCCVCCTGCCTG			fosforotioato	237
TATCCGGAGGGCTCGCCATGCTGCT			fosforotioato	238
$T_eC_eC_eC_eG_eC_eCTGTGACAT_eG_eC_eA_eT_eT_e$	6-8-6	MOE/desóxi		239
$C_eA_eG_eC_eAGCAGAGTCTTCAT_eC_eA_eT_e$	4-13-4	MOE/desóxi		240
$G_eG_eG_eA_eC_dG_dC_dG_dG_dC_dG_dC_dT_dC_dG_dG_dT_eC_eA_eT_e$	4-12-4	MOE/desóxi		241
$C_eC_eA_eC_eA_eA_dG_dC_dT_dG_dT_dC_dC_dA_dG_dT_eC_eT_eA_eA_e$	5-10-5	MOE/desóxi		242
$C_eC_eG_eC_dA_dG_dC_dC_dA_dT_dG_dC_dG_eC_eT_eC_eT_eT_eG_eG_e$	3-9-8	MOE/desóxi		243

F. Certas Composições Farmacêuticas

[00837] Em determinadas modalidades, a presente divulgação fornece composições farmacêuticas que compreendem um ou mais compostos antissenso. Em determinadas modalidades, essa composição farmacêutica compreende um diluente ou transportador farmaceuticamente aceitável adequado. Em determinadas modalidades, a composição farmacêutica compreende uma solução salina estéril e um ou mais

compostos antissenso. Em determinadas modalidades, essa composição farmacêutica consiste em uma solução salina estéril e em um ou mais compostos antissenso. Em determinadas modalidades, a solução salina é uma solução salina de qualidade farmacêutica. Em determinadas modalidades, a composição farmacêutica compreende um ou mais compostos antissenso e água estéril. Em determinadas modalidades, a composição farmacêutica consiste em um ou mais compostos antissenso e em água estéril. Em determinadas modalidades, a solução salina estéril é uma solução salina de qualidade farmacêutica. Em determinadas modalidades, uma composição farmacêutica compreende um ou mais compostos antissenso e solução salina tamponada com fosfato (PBS). Em determinadas modalidades, uma composição farmacêutica consiste em um ou mais compostos antissenso e solução salina tamponada com fosfato (PBS). Em determinadas modalidades, a solução salina estéril é uma PBS de qualidade farmacêutica.

[00838] Em determinadas modalidades, os compostos antissenso podem ser misturados com substâncias ativas e/ou inertes farmaceuticamente aceitáveis para a preparação de composições e formulações farmacêuticas. As composições e métodos para a formulação de composições farmacêuticas irão depender de vários critérios, incluindo, entre outros, via de administração, extensão da doença, ou dose a ser administrada.

[00839] As composições farmacêuticas que compreendem compostos antissenso englobam quaisquer sais farmaceuticamente aceitáveis, ésteres ou sais desses ésteres. Em determinadas modalidades, as composições farmacêuticas que compreendem compostos antissenso compreendem um ou mais oligonucleotídeos que, após administração a um animal, incluindo um ser humano, são capazes de proporcionar (direta ou indiretamente) o metabólito biologicamente ativo ou seu resíduo. As-

sim, por exemplo, a divulgação é concebida também para sais farmaceuticamente aceitáveis dos compostos antissenso, profármacos, sais farmaceuticamente aceitáveis desses profármacos e outros bioequivalentes. Os sais farmaceuticamente aceitáveis adequados incluem, entre outros, sais de sódio e de potássio.

[00840] Um profármaco pode incluir a incorporação de nucleosídeos adicionais em uma ou em ambas as extremidades de um oligonucleotídeo que são clivados por nucleases endógenas dentro do corpo, para formar o oligonucleotídeo antissenso ativo.

[00841] Frações lipídicas estão sendo utilizadas em terapias de ácido nucleico em vários métodos. Em alguns desses métodos, o ácido nucleico é introduzido em lipossomas pré-formados ou lipoplexos feitos de misturas de lípidos catiônicos e lípidos neutros. Em determinados métodos, os complexos de DNA com lipídios mono ou policatiônicos são formados sem a presença de um lípido neutro. Em determinadas modalidades, uma porção lipídica é selecionada para aumentar a distribuição de um agente farmacêutico para uma célula ou tecido específico. Em determinadas modalidades, uma porção lipídica é selecionada para aumentar a distribuição de um agente farmacêutico para um tecido adiposo. Em determinadas modalidades, uma porção lipídica é selecionada para aumentar a distribuição de um agente farmacêutico para um tecido muscular.

[00842] Em determinadas modalidades, as composições farmacêuticas aqui previstas compreendem um ou mais oligonucleotídeos modificados e um ou mais excipientes. Em determinadas modalidades, os excipientes são selecionados a partir da água, soluções salinas, álcool, polietilenoglicóis, gelatina, lactose, amilase, estearato de magnésio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, hidroximetilcelulose e polivinilpirrolidona.

[00843] Em determinadas modalidades, uma composição farmacêutica aqui prevista compreende um sistema de distribuição. Exemplos de sistemas de entrega incluem, entre outros, lipossomas e emulsões. Certos sistemas de entrega são úteis para a preparação de certas composições farmacêuticas, incluindo aquelas que compreendem compostos hidrofóbicos. Em determinadas modalidades, certos solventes orgânicos, como dimetilsulfóxido são usados.

[00844] Em determinadas modalidades, uma composição farmacêutica aqui prevista compreende uma ou mais moléculas de entrega específicas do tecido destinadas a entregar um ou mais agentes farmacêuticos da presente divulgação aos tecidos ou aos tipos de células específicas. Por exemplo, em determinadas modalidades, as composições farmacêuticas incluem lipossomas revestidos com um anticorpo específico para o tecido.

[00845] Em determinadas modalidades, uma composição farmacêutica aqui prevista compreende um sistema de co-solvente. Alguns desses sistemas de cossolvente compreendem, por exemplo, álcool benzílico, um surfactante não polar, um polímero orgânico miscível em água e uma fase aquosa. Em determinadas modalidades, estes sistemas cossolventes são utilizados para compostos hidrofóbicos. Um exemplo não limitante desse sistema cossolvente é o sistema cossolvente VPD, o qual é uma solução absoluta de etanol compreendendo 3% w/v de álcool benzílico, 8% w/v de surfactante não polar Polissorbato 80™ e 65 % w/v de polietilenoglicol 300. As proporções desses sistemas co-solventes podem variar consideravelmente sem alterar significativamente as suas características de solubilidade e toxicidade. Além disso, a identidade dos componentes co-solventes pode variar: por exemplo, outros surfactantes podem ser utilizados ao invés do Polissorbato 80™; o tamanho da porção de polietilenoglicol pode variar; outros polímeros biocompatíveis podem substituir o polietilenoglicol, por exemplo, polivinil

pirrolidona; e outros açúcares ou polissacáridos podem substituir a dextrose.

[00846] Em determinadas modalidades, uma composição farmacêutica aqui prevista é preparada para administração oral. Em determinadas modalidades, as composições farmacêuticas são preparadas para administração bucal.

[00847] Em determinadas modalidades, uma composição farmacêutica é preparada para administração por injeção (por exemplo, intravenosa, subcutânea, intramuscular, etc.). Em determinadas modalidades, uma composição farmacêutica compreende um transportador e é formulada em solução aquosa, como água ou tampões fisiologicamente compatíveis como solução de Hanks, solução de Ringer, ou tampão de solução salina fisiológica. Em determinadas modalidades, são incluídos outros ingredientes (por exemplo, ingredientes que ajudam na solubilidade ou que servem de conservantes). Em determinadas modalidades, as suspensões injetáveis são preparadas usando transportadores líquidos apropriados, agentes de suspensão e similares. São apresentadas certas composições farmacêuticas para injeção em forma de dosagem unitária, por exemplo, em ampolas ou em recipientes de doses múltiplas. Certas composições farmacêuticas para injeção são suspensões, soluções ou emulsões em veículos oleosos ou aquosos, e podem conter agentes de formulação como agentes de suspensão, estabilizantes e/ou dispersantes. Alguns solventes adequados para utilização em composições farmacêuticas para injeção incluem, entre outros, solventes lipofílicos e óleos graxos, como óleo de sésamo, ésteres de ácidos graxos sintéticos, como oleato de etila ou triglicerídeos e lipossomas. As suspensões de injeção aquosas podem conter substâncias que aumentam a viscosidade da suspensão, como carboximetilcelulose de sódio, sorbitol, ou dextrano. Opcionalmente, essas suspensões também podem

conter estabilizadores ou agentes adequados que aumentam a solubilidade dos agentes farmacêuticos para permitir a preparação de soluções altamente concentradas.

[00848] Em determinadas modalidades, uma composição farmacêutica é preparada para administração transmucosa. Em determinadas modalidades, penetrantes apropriados para a barreira a ser permeada são usados na formulação. Esses penetrantes são geralmente conhecidos na técnica.

[00849] Em determinadas modalidades, uma composição farmacêutica aqui prevista compreende um oligonucleotídeo em uma quantidade terapeuticamente eficaz. Em determinadas modalidades, a quantidade terapeuticamente eficaz é suficiente para prevenir, aliviar ou melhorar os sintomas de uma doença ou prolongar a sobrevivência do indivíduo a ser tratado. A determinação de uma quantidade terapeuticamente eficaz está bem dentro da capacidade dos versados na técnica.

[00850] Em determinadas modalidades, um ou mais oligonucleotídeos modificados aqui previstos são formulados como um profármaco. Em determinadas modalidades, mediante administração in vivo, um profármaco é quimicamente convertido em uma forma biologicamente, farmaceuticamente ou terapeuticamente mais ativa de um oligonucleotídeo. Em determinadas modalidades, os profármacos são úteis porque são mais fáceis de serem administrados do que a forma ativa correspondente. Por exemplo, em alguns casos, um profármaco pode ser mais biodisponível (por exemplo, através de administração por via oral) do que a forma ativa correspondente. Em certos casos, um profármaco pode ter solubilidade melhorada em comparação com a forma ativa correspondente. Em determinadas modalidades, os profármacos são menos solúveis em água do que a forma ativa correspondente. Em certos casos, esses profármacos possuem transmissão superior, através das membranas celulares, onde a solubilidade em água é prejudicial para a

mobilidade. Em determinadas modalidades, um profármaco é um éster. Em algumas dessas modalidades, o éster é metabolicamente hidrolisado em ácido carboxílico após administração. Em certos casos, o ácido carboxílico que contém composto é a forma ativa correspondente. Em determinadas modalidades, um profármaco compreende um peptídeo curto (poliaminoácido) ligado a um grupo ácido. Em determinadas modalidades, o peptídeo é clivado após a administração de modo a formar a forma ativa correspondente.

[00851] Em determinadas modalidades, a presente invenção fornece composições e métodos para reduzir a quantidade ou a atividade de um ácido nucleico alvo numa célula. Em determinadas modalidades, a célula está em um animal. Em determinadas modalidades, o animal é um mamífero. Em determinadas modalidades, o animal é um roedor. Em determinadas modalidades, o animal é um primata. Em determinadas modalidades, o animal é um primata não humano. Em determinadas modalidades, o animal é um ser humano.

[00852] Em determinadas modalidades, a presente divulgação fornece métodos de administração de uma composição farmacêutica compreendendo um oligonucleotídeo da presente divulgação a um animal. Vias de administração adequadas incluem, entre outras, oral, retal, transmucosa, intestinal, entérica, tópica, por supositório, através de inalação, por via intratecal, intracerebroventricular, intraperitoneal, intranasal, intraocular, intratumoral, e parentérica (por exemplo, intravenosa, intramuscular, intramedular, e subcutânea). Em determinadas modalidades, intratecais farmacêuticas são administradas para atingir exposições locais ao invés de sistêmicas. Por exemplo, as composições farmacêuticas podem ser injetadas diretamente na área de efeito desejado (por exemplo, no fígado).

Divulgação não limitante e incorporação por referência

[00853] Enquanto determinados compostos, composições e métodos descritos aqui foram descritos com especificidade em conformidade com determinadas modalidades, os exemplos a seguir servem apenas para ilustrar os compostos descritos aqui e não se destinam a limitar o mesmo. Cada referência, número de acesso GenBank, e similares, citados no presente pedido de patente, são incorporados por referência na sua totalidade.

[00854] Embora a listagem de sequências que acompanha este depósito identifique cada sequência como "RNA" ou "DNA" conforme necessário, na realidade, essas sequências podem ser modificadas com qualquer combinação de modificações químicas. Os versados na técnica apreciarão de imediato que essa designação "RNA" ou "DNA" para descrever oligonucleotídeos modificados é, em certos casos, arbitrária. Por exemplo, um oligonucleotídeo que compreende um nucleosídeo compreendendo uma porção de açúcar 2'-OH e uma base timina poderia ser descrito como um DNA que possui um açúcar modificado (2'-OH para 2'-H natural do DNA) ou como um RNA que possui uma base modificada (timina (uracila metilada) para uracila natural do RNA).

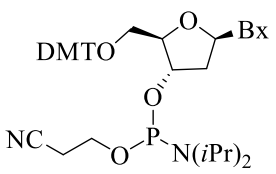
[00855] Por conseguinte, as sequências de ácido nucleico aqui providas, incluindo, entre outros, aquelas na listagem de sequência, destinam-se a englobar ácidos nucleicos com qualquer combinação de RNA e/ou DNA natural ou modificada, incluindo, entre outros, esses ácidos nucleicos modificados com nucleobases modificadas. A título de exemplo e sem limitação, um oligonucleotídeo com uma sequência de nucleobases "ATCGATCG" engloba quaisquer oligonucleotídeos com essa sequência de nucleobases, modificada ou não modificada, incluindo, entre outros, esses compostos que compreendem bases do RNA, como aquelas com uma sequência "AUCGAUCG "e aquelas que possuem algumas bases de DNA e algumas bases de RNA, como "AUCGATCG " e oligonucleotídeos com outras bases modificadas,

como "AT^{me}CGAUCG," onde ^{me}C indica uma base de citosina que compreende um grupo metila na posição 5.

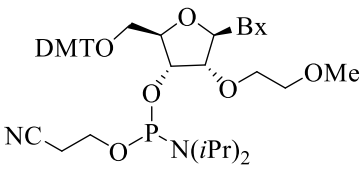
EXEMPLOS

[00856] Os exemplos a seguir ilustram determinadas modalidades da presente divulgação e não são limitantes. Além disso, se modalidades específicas forem providas, os inventores contemplaram um pedido genérico dessas modalidades específicas. Por exemplo, a divulgação de um oligonucleotídeo que tem um motivo específico provê suporte razoável para oligonucleotídeos adicionais que têm o mesmo motivo ou motivo semelhante. E, por exemplo, se uma modificação específica de alta afinidade surgir em uma posição específica, outras modificações de alta afinidade na mesma posição são consideradas adequadas, salvo indicação contrária.

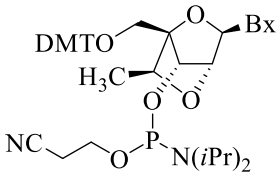
Exemplo 1: Método Geral para a Preparação de Fosforamiditos, Compostos 1, 1a e 2



1



1a

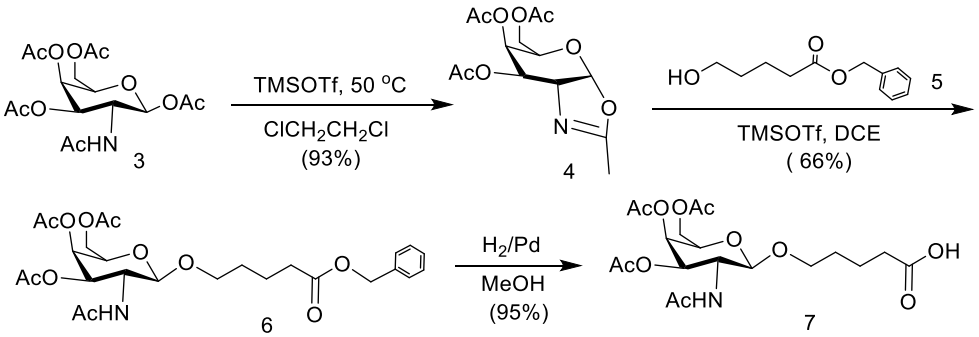


2

Bx é uma base heterocíclica

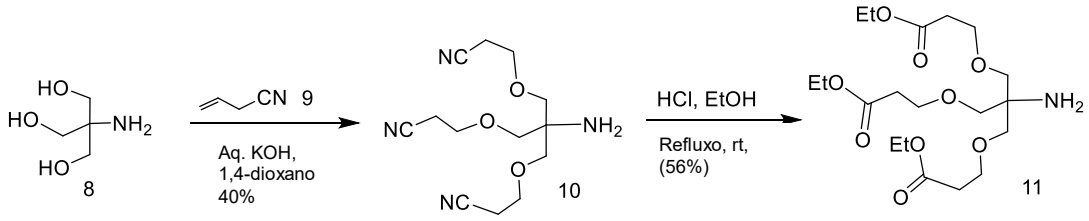
[00857] Os compostos 1, 1a e 2 foram preparados de acordo com procedimentos bem conhecidos na técnica, descritos na especificação aqui contida (ver Seth et al., Bioorg. Med. Chem., 2011, 21(4), 1122-1125, J. Org. Chem., 2010, 75(5), 1569-1581, Nucleic Acids Symposium Series, 2008, 52(1), 553-554).; e também publicado nos Pedidos Internacionais PCT (WO 2011/115818, WO 2010/077578, WO2010/036698, WO2009/143369, WO 2009/006478 e WO 2007/090071) e patente US Nº 7569686).

Exemplo 2: Preparação do Composto 7



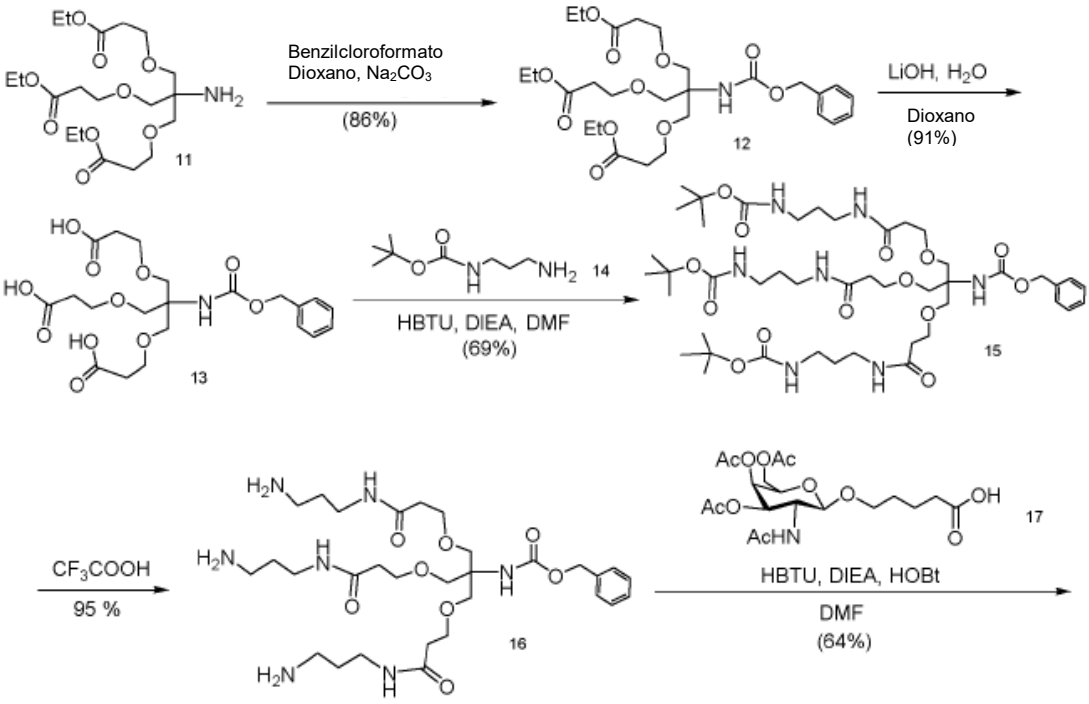
[00858] Os compostos 3 (2-acetamida-1,3,4,6-tetra-O-acetil-2-desóxi-β-Dgalactopiranose ou galactosamina pentaacetato) estão comercialmente disponíveis. O composto 5 foi preparado de acordo com procedimentos publicados (Weber *et al., J. Med. Chem*., 1991, *34*, 2692).

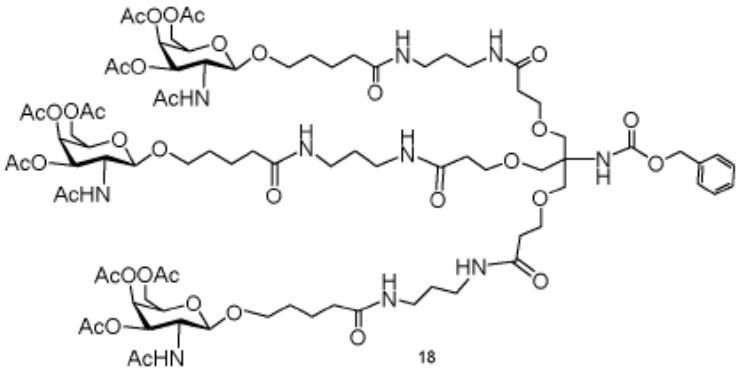
Exemplo 3: Preparação do Composto 11



[00859] Os compostos 8 e 9 estão comercialmente disponíveis.

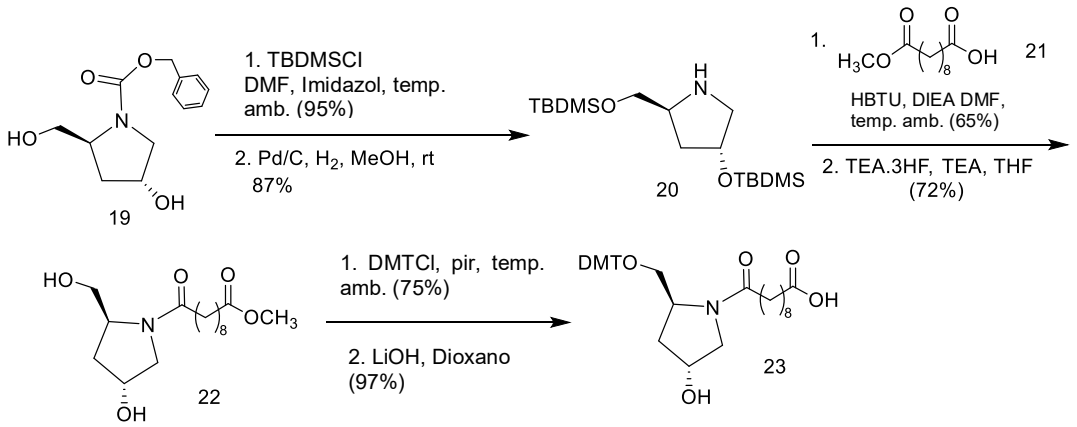
Exemplo 4: Preparação do Composto 18





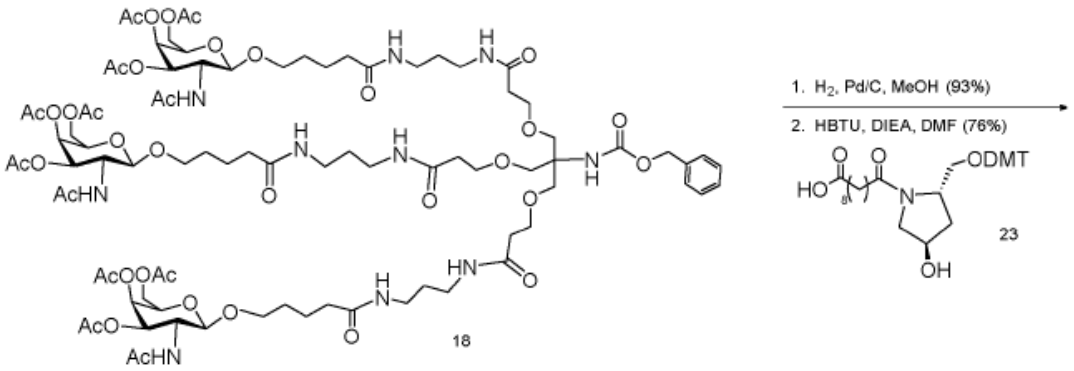
[00860] O composto 11 foi preparado de acordo com os procedimentos ilustrados no Exemplo 3. O composto 14 está comercialmente disponível. O composto 17 foi preparado usando procedimentos similares relatados por Rensen *et al., J. Med. Chem.,* 2004, *47,* 5798-5808.

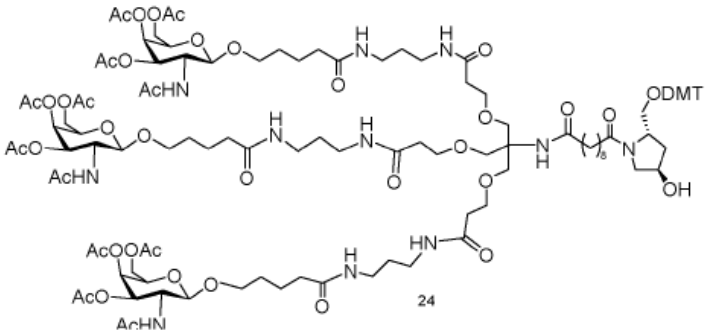
Exemplo 5: Preparação do Composto 23



[00861] Os compostos 19 e 21 estão comercialmente disponíveis.

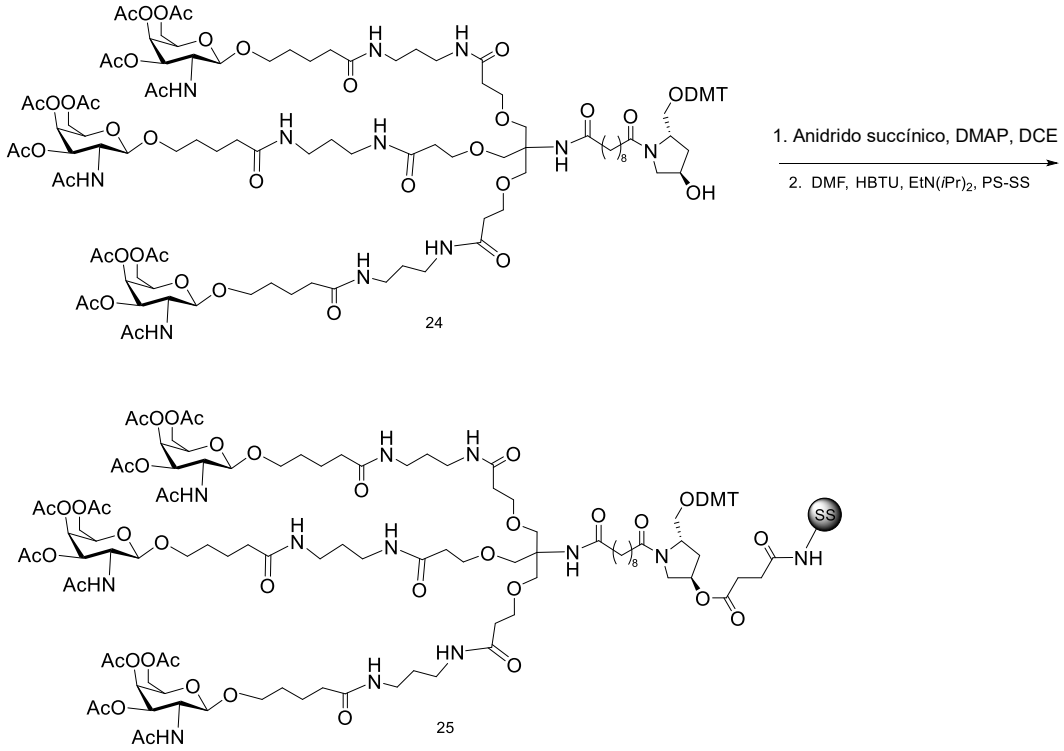
Exemplo 6: Preparação do Composto 24





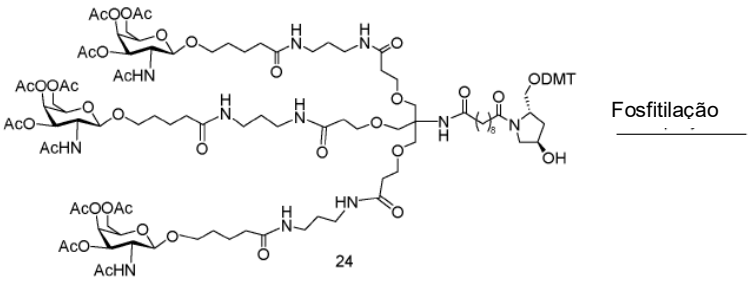
[00862] Os compostos 18 e 23 foram preparados de acordo com os procedimentos ilustrados nos Exemplos 4 e 5.

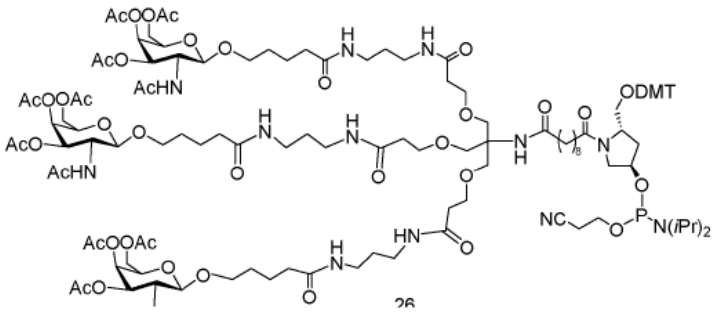
Exemplo 7: Preparação do Composto 25



[00863] O composto 11 foi preparado de acordo com os procedimentos ilustrados no Exemplo 6.

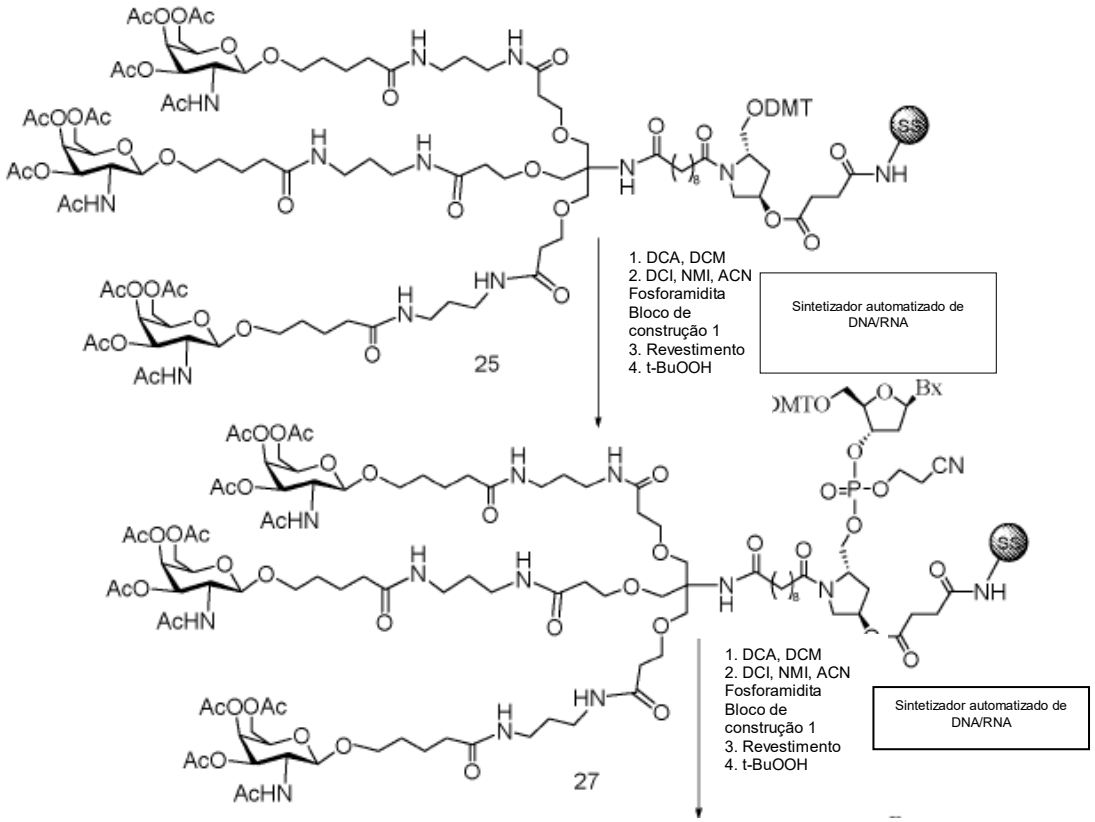
Exemplo 8: Preparação do Composto 26

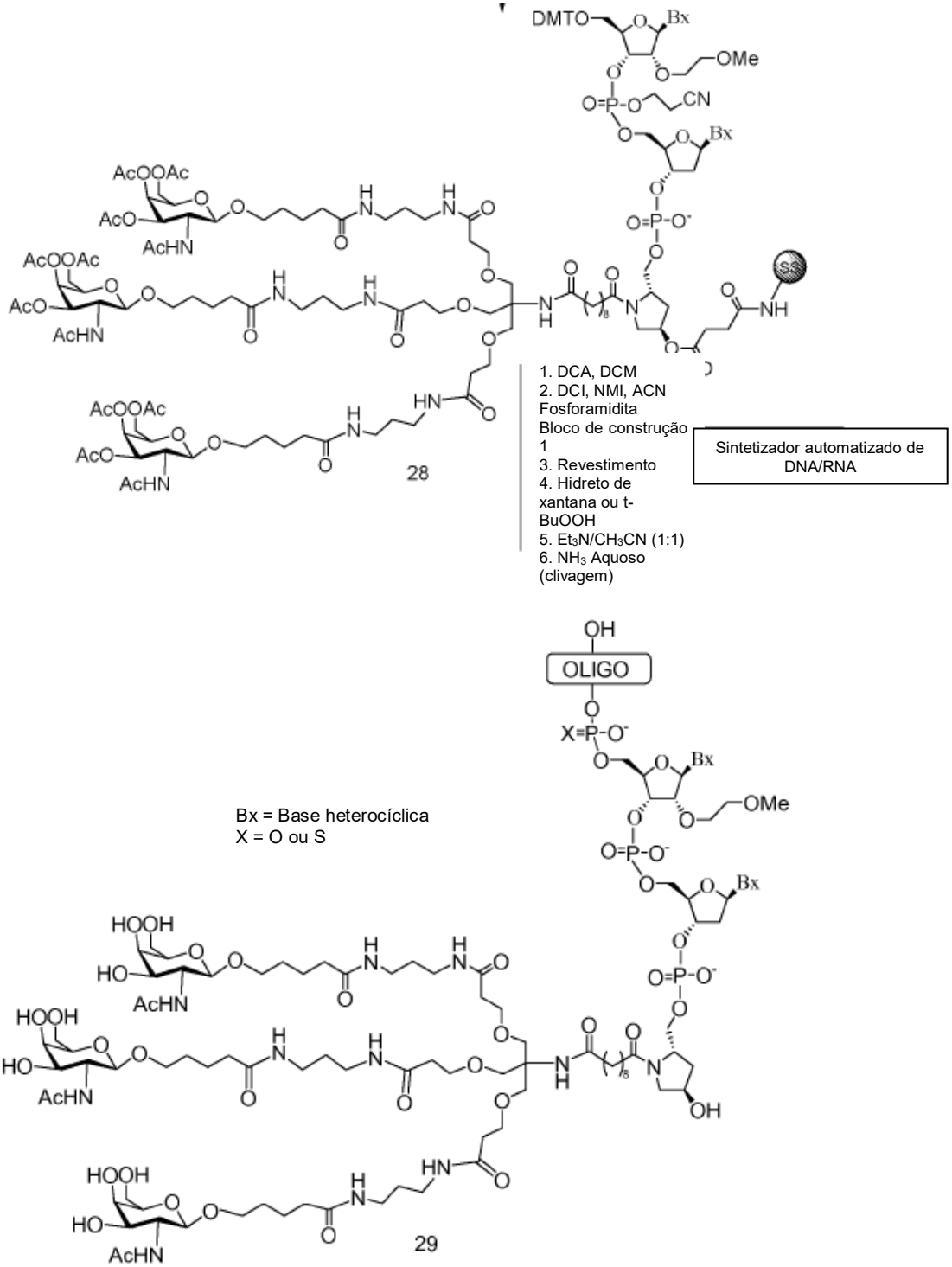




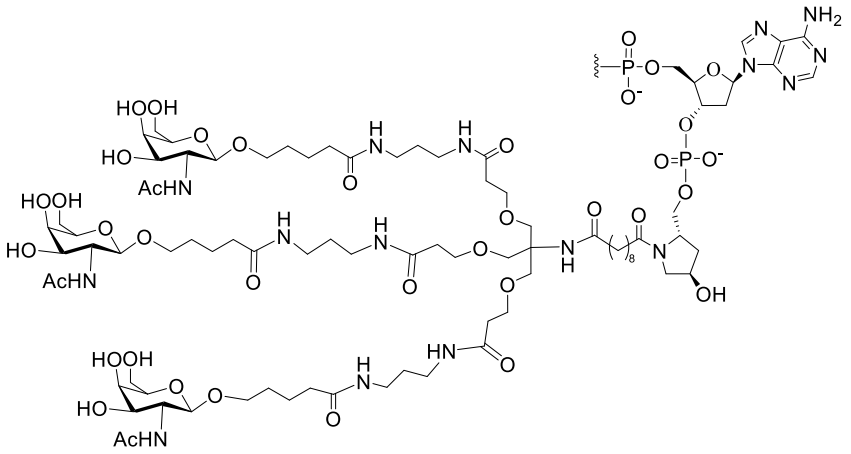
O composto 24 é preparado de acordo com os procedimentos ilustrados no Exemplo 6.

Exemplo 9: Preparação geral de ASOs conjugados compreendendo GalNAc$_3$-1 no terminal 3', Composto 29

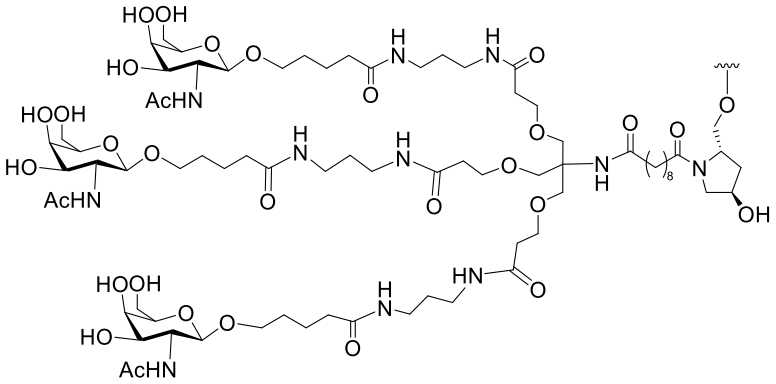




[00864] onde GalNAc$_3$-1 protegida tem a estrutura:



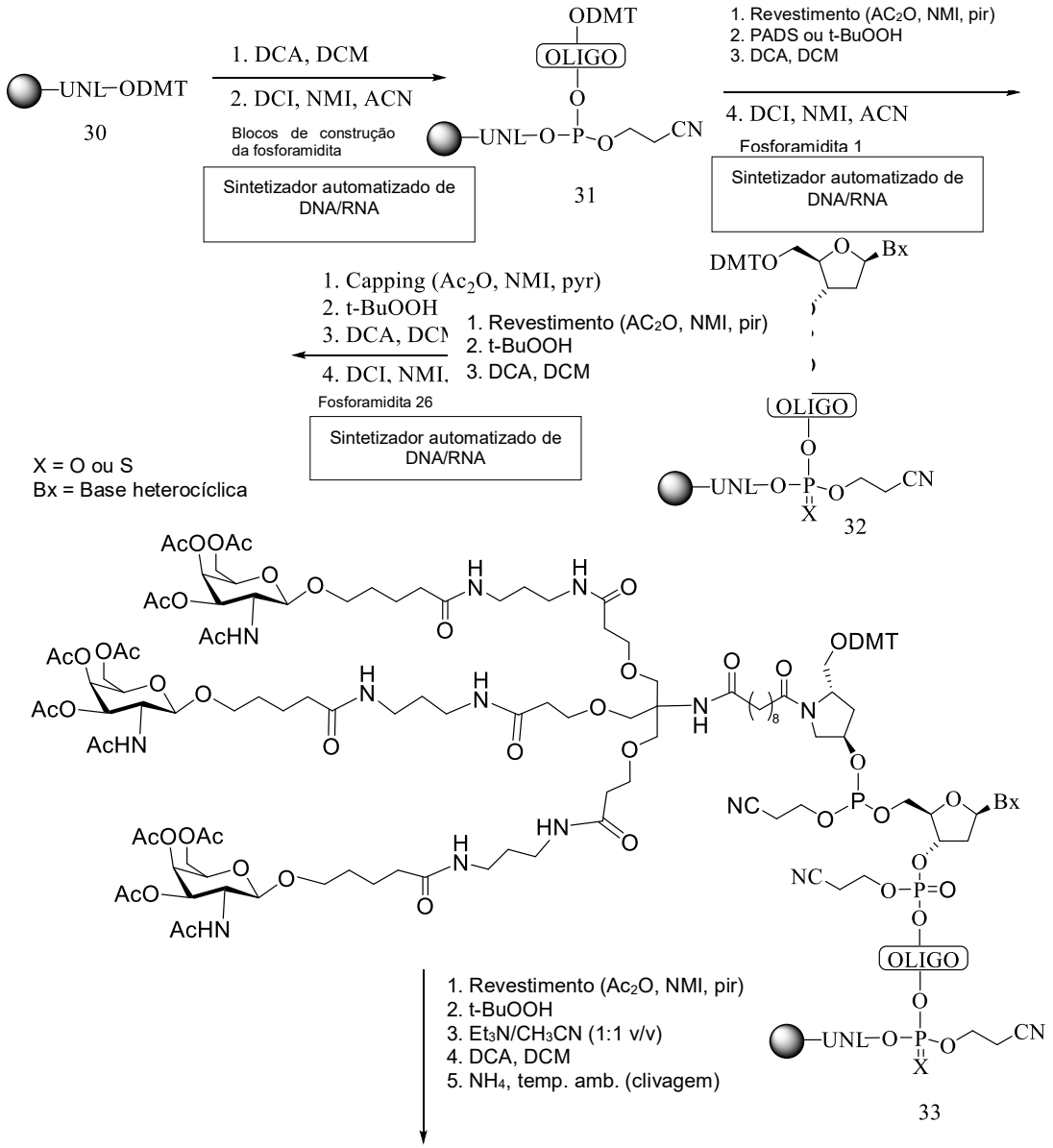
[00865] A parte do agrupamento de GalNAc3 do grupo de conjugado GalNAc3-1 (GalNAc3-1a) pode ser combinada com qualquer porção clivável para fornecer uma variedade de grupos conjugados. Onde GalNAc3-1um tem a fórmula:

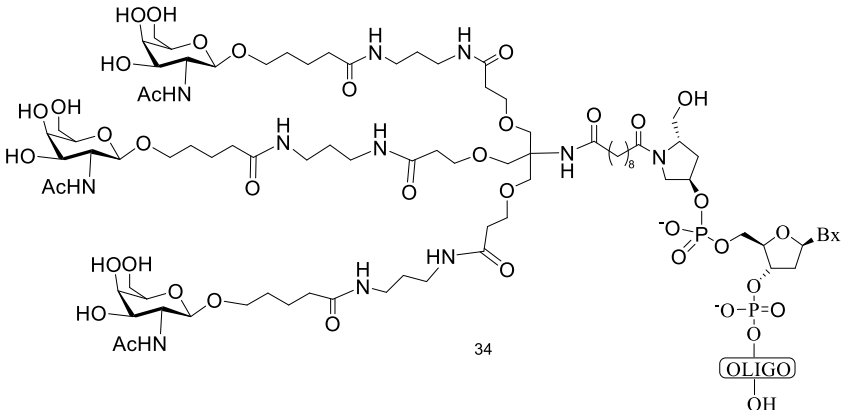


[00866] O suporte sólido ligou GalNAc3-1 protegida, Composto 25, foi preparado de acordo com os procedimentos ilustrados no Exemplo 7. Composto 29 oligomérico compreendendo **GalNAc$_3$-1** no terminal 3' foi preparado utilizando procedimentos padrão em síntese de DNA/RNA automatizado (ver Dupouy *et al., Angew. Chem. Int. Ed.,* 2006, *45,* 3623-3627). Blocos de construção de fosforamidita, Compostos 1 e 1a foram preparados de acordo com os procedimentos ilustrados no Exemplo 1. As fosforamiditas ilustradas pretendem ser representativas e não pretendem ser limitantes como outros blocos de construção de fosforamidita podem ser utilizados para preparar compostos oligoméricos com uma sequência e composição predeterminada. A ordem e quantidade de fosforamiditas adicionadas ao suporte sólido podem ser ajustadas

para preparar compostos oligoméricos com lacunas como descrito aqui. Esses compostos oligoméricos lacunados podem ter uma composição predeterminada e uma sequência de base mencionada por um determinado alvo.

[00867] **Exemplo 10: Preparação geral de ASOs conjugados compreendendo GalNAc$_3$-1 no terminal 5', Composto 34**

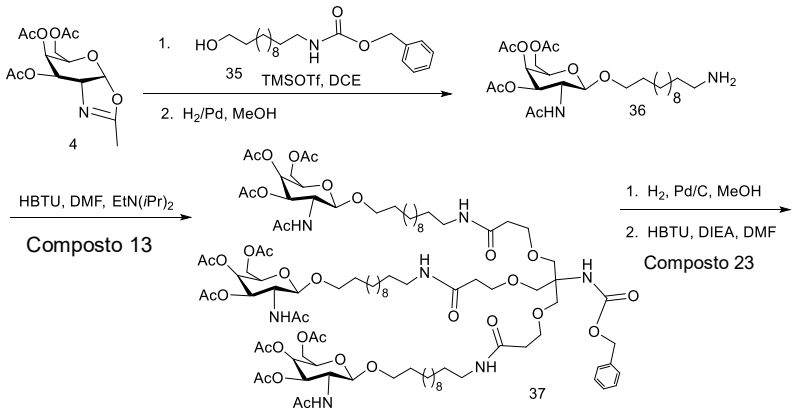


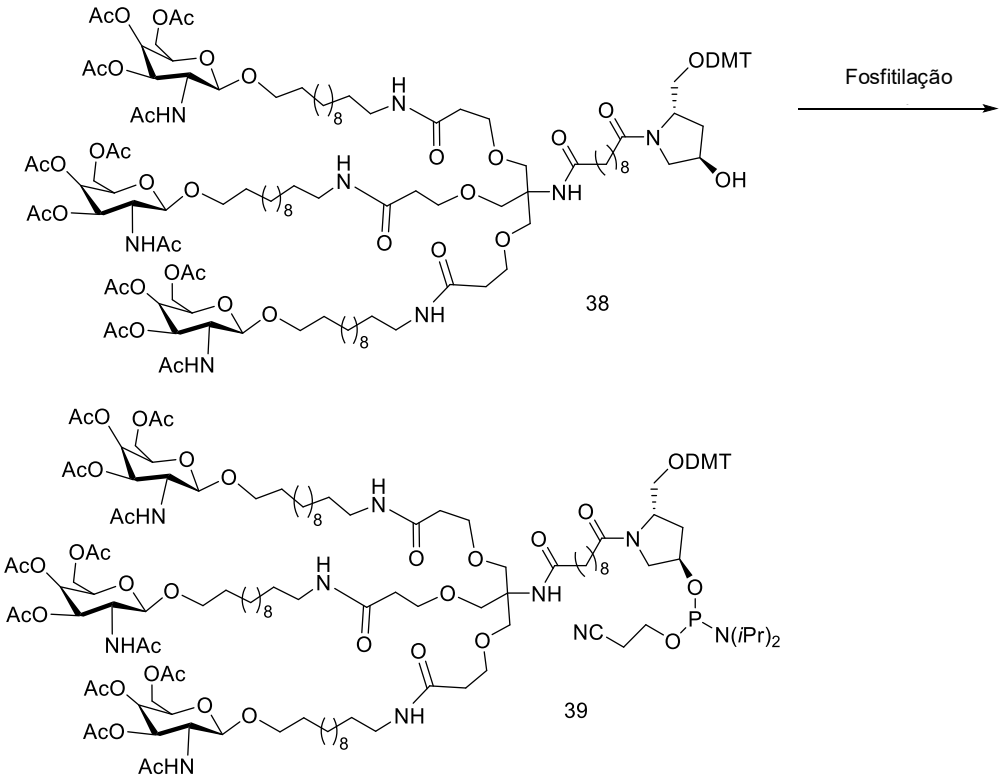


34

[00868] O UnylinkerTM 30 encontra-se disponível comercialmente. Composto Oligomérico 34 compreendendo um agrupamento GalNAc3-1 no terminal 5' é preparado utilizando procedimentos padrão em síntese de DNA/RNA automatizado (ver Dupouy et al., Angew. Chem. Int. Ed., 2006, 45, 3623-3627). Blocos de construção de fosforamidita, Compostos 1 e 1a foram preparados de acordo com os procedimentos ilustrados no Exemplo 1. As fosforamiditas ilustradas pretendem ser representativas e não pretendem ser limitantes como outros blocos de construção de fosforamidita podem ser utilizados para preparar compostos oligoméricos com uma sequência e composição predeterminada. A ordem e quantidade de fosforamiditas adicionadas ao suporte sólido podem ser ajustadas para preparar compostos oligoméricos com lacunas como descrito aqui. Esses compostos oligoméricos lacunados podem ter uma composição predeterminada e uma sequência de base mencionada por um determinado alvo.

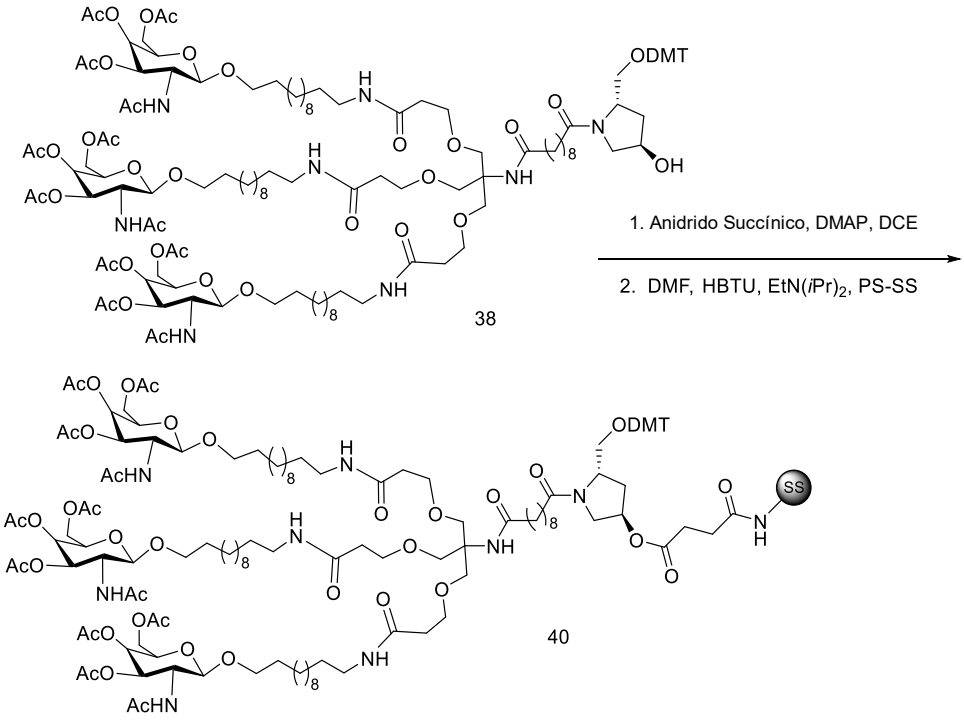
Exemplo 11: Preparação do Composto 39





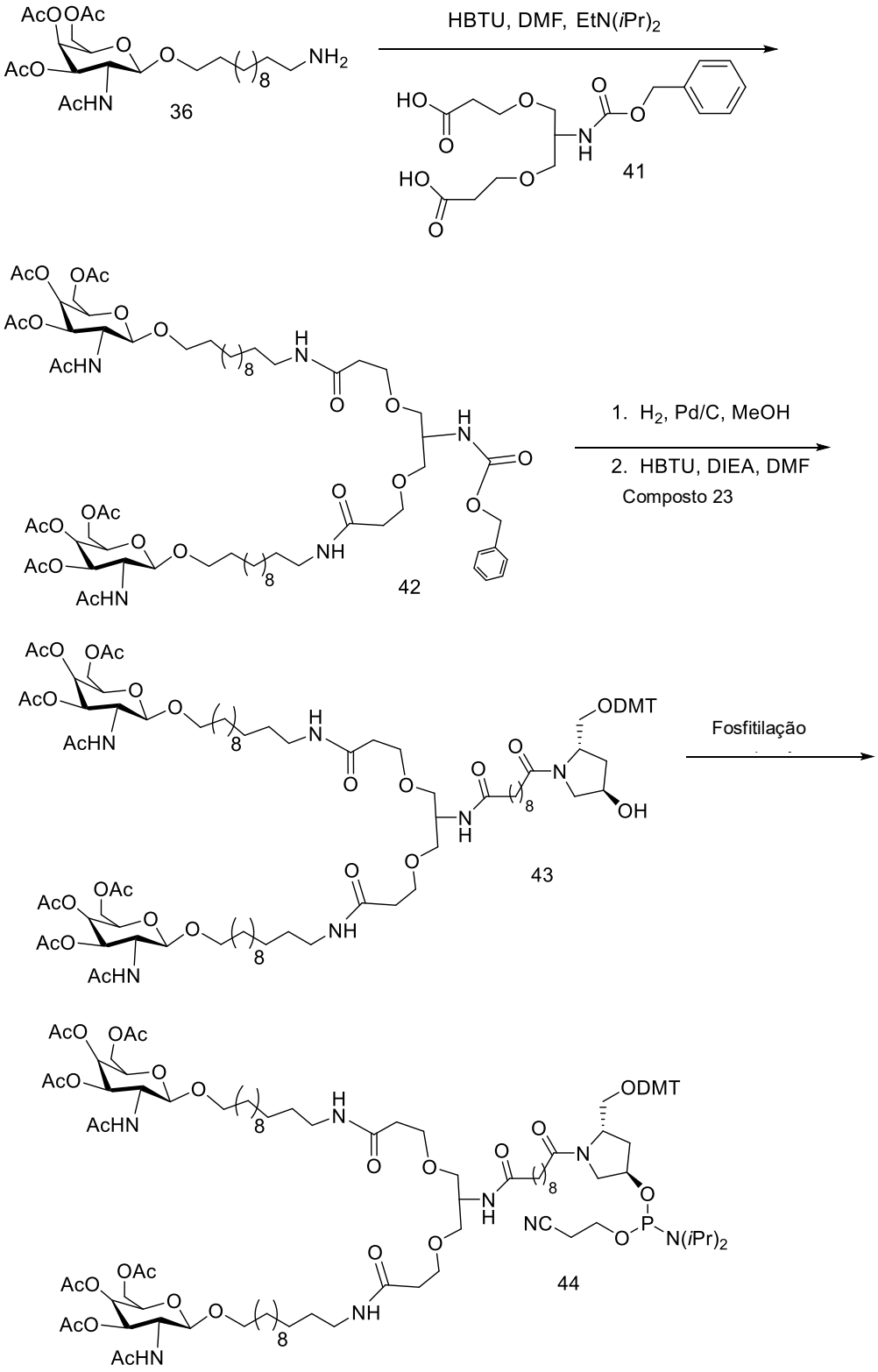
[00869] Os compostos 4, 13 e 23 foram preparados de acordo com os procedimentos ilustrados nos Exemplos 2, 4 e 5. Composto 35 é preparado utilizando processos semelhantes publicados em Rouchaud *et al., Eur. J. Org. Chem.,* 2011, *12*, 2346-2353.

Exemplo 12: Preparação do Composto 40



[00870] O composto 38 é preparado de acordo com os procedimentos ilustrados no Exemplo 11.

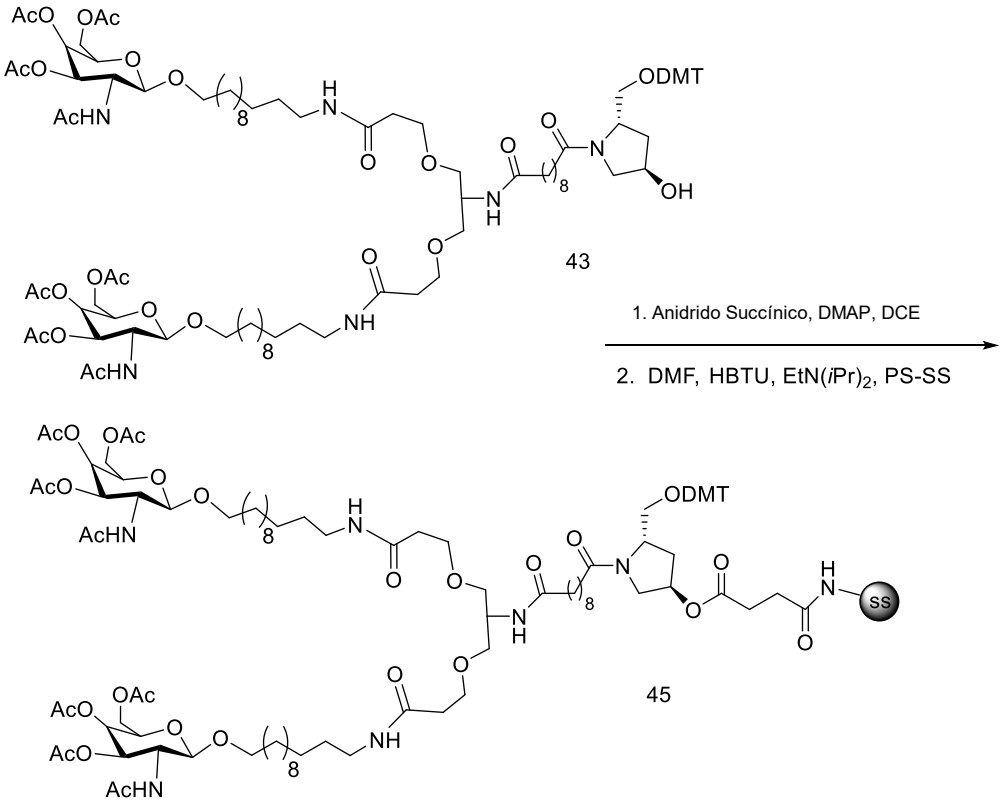
[00871] **Exemplo 13: Preparação do Composto 44**



[00872] Os compostos 23 e 36 são preparados de acordo com os

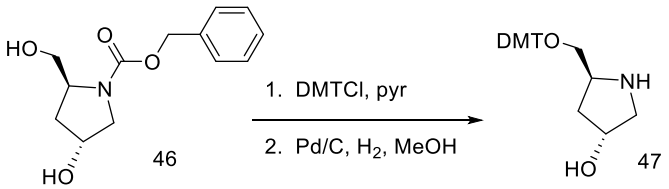
procedimentos ilustrados nos exemplos 5 e 11. Composto 41 é preparado utilizando processos semelhantes publicados em WO 2009082607.

Exemplo 14: Preparação do Composto 45



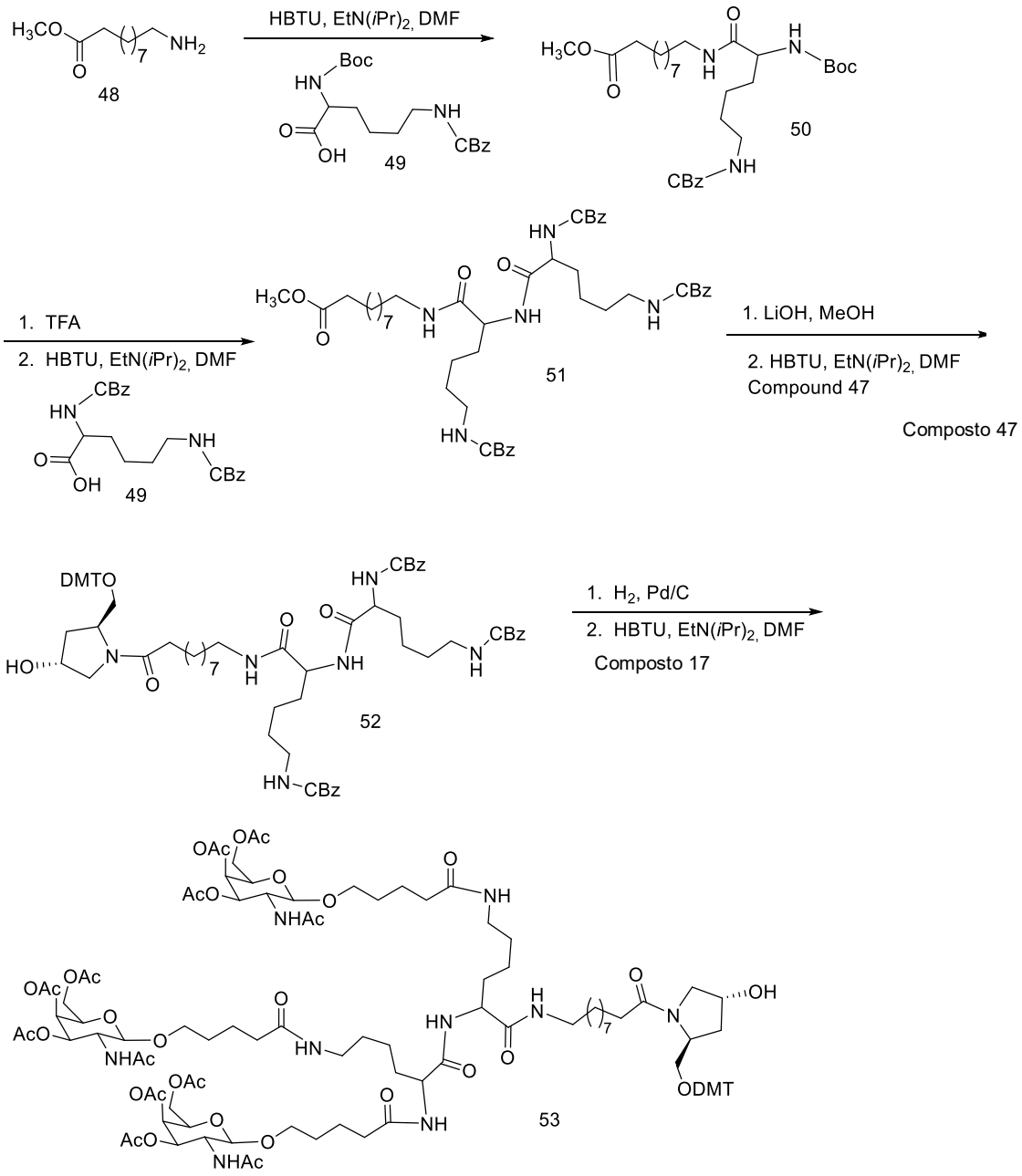
[00873] O composto 43 é preparado de acordo com os procedimentos ilustrados no Exemplo 13.

Exemplo 15: Preparação do Composto 47



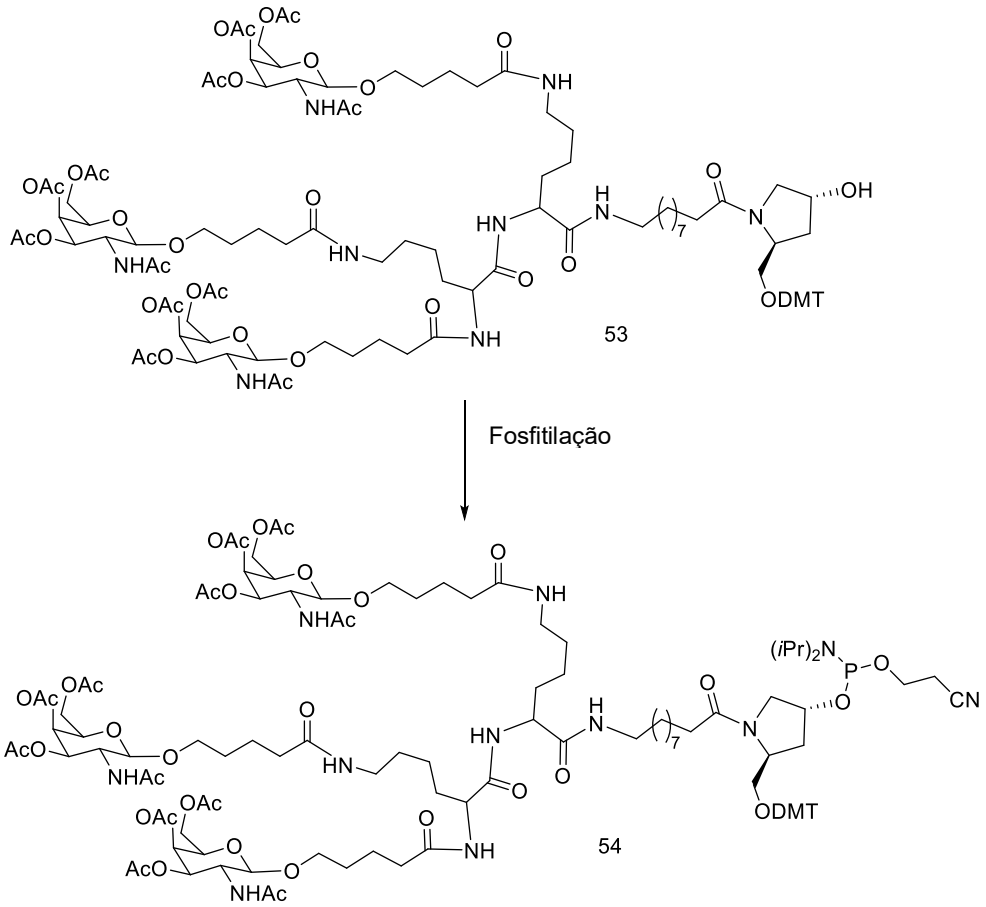
[00874] O composto 14 está comercialmente disponível.

Exemplo 16: Preparação do Composto 53



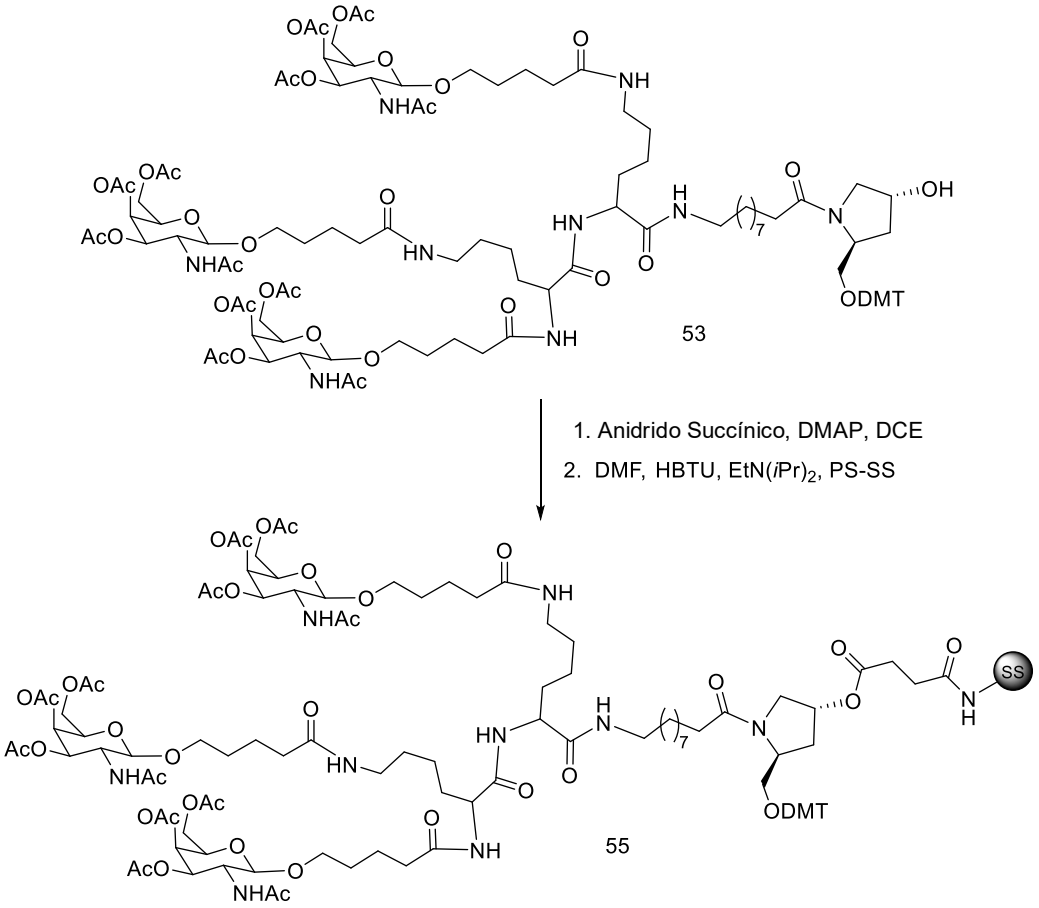
[00875] Os compostos 48 e 49 estão comercialmente disponíveis. Os compostos 17 e 47 são preparados de acordo com os procedimentos ilustrados nos Exemplos 4 e 15.

Exemplo 17: Preparação do Composto 54



[00876] O composto 53 é preparado de acordo com os procedimentos ilustrados no Exemplo 16.

Exemplo 18: Preparação do Composto 55



[00877] O composto 53 é preparado de acordo com os procedimentos ilustrados no Exemplo 16.

Exemplo 19: Método geral para a preparação de ASOs conjugados compreendendo GalNAc$_3$-1 na posição 3' por meio de técnicas em fase sólida (preparação de ISIS 647535, 647536 e 651900)

[00878] Salvo indicação em contrário, todos os reagentes e soluções utilizadas para a síntese dos compostos oligoméricos são adquiridas de fontes comerciais. Blocos de construção de fosforamidita padrão e suporte sólido são usados para a incorporação de resíduos de nucleosídeos que incluem, por exemplo, T, A, G, e resíduos ^{m}C. Uma solução de fosforamidita a 0,1 M em anidro acetonitrila foi utilizada para β-D-2'-desoxirribonucleosídeo e 2'-MOE.

[00879] As sínteses ASO foram realizadas em sintetizador ABI 394

(escala de 1-2 μmol) ou em sintetizador oligopiloto GE Healthcare Bioscience ÄKTA (escala de 40-200 μmol) pelo método de acoplamento de fosforamidita em suporte sólido VIMAD carregado de GalNAc3-1 (110 μmol/g, Guzaev et al., 2003) empacotada na coluna. Para a etapa de acoplamento, as fosforamiditas foram entregues 4 vezes em excesso sobre a carga sobre o suporte sólido e a condensação de fosforamidita foi realizada por 10 min. Todas as outras etapas seguiram os protocolos padrão fornecidos pelo fabricante. Uma solução de ácido dicloroacético a 6% em tolueno foi utilizada para remover o grupo de dimetoxitritilo (DMT) do grupo 5'-hidroxila do nucleotídeo. 4,5-Dicianoimidazol (0,7 M) em anidro CH3CN foi usado como ativador passo durante a etapa de acoplamento. As ligações de fosforotioato foram introduzidas por sulfurização com solução a 0,1 M de hidreto de xantano em piridina/CH3CN 1:1 para um tempo de contato de 3 minutos. Uma solução de 20% terc-butilhidroperóxido em CH3CN contendo 6% de água foi utilizada como um agente oxidante para prover ligações internucleosídeas de fosfodiéster com um tempo de contato de 12 minutos.

[00880] Depois da sequência desejada foi montada, os grupos protetores de cianoetil fosfato foram desprotegidos utilizando uma mistura 1:1 (v/v) de uma mistura de trietilamina e acetonitrila, com um tempo de contato de 45 minutos. ASOs de ligação de suporte sólido foram suspensos em amônia aquosa (28-30% em peso) e aquecidos a 55°C por 6 h.

[00881] Os ASOs não ligados foram então filtrados e a amônia foi fervida. O resíduo foi purificado por cromatografia líquida de alta pressão numa coluna de troca aniônica forte (GE Healthcare Bioscience, Fonte 30Q, 30 μm, com 2,54 x 8 cm, A = 100 mM acetato de amônia em 30% de CH3CN aquoso, B = 1,5 M de NaBr, em A, 0-40% de B em 60 min, fluxo 14 mL min-1, λ = 260 nm). O resíduo foi dessalinizado por HPLC numa coluna de fase inversa para produzir ASOs desejados com

um rendimento isolado de 15-30% com base na carga inicial sobre o suporte sólido. ASOs foram caracterizados pela análise MS acoplado íon-par-HPLC com sistema Agilent 1100 MSD.

[00882] Os oligonucleotídeos antissenso que não compreendem um conjugado foram sintetizados utilizando procedimentos de síntese de oligonucleotídeos convencionais bem conhecidos na técnica.

[00883] Usando esses métodos, três compostos antissenso separados que direcionam à ApoC III estavam preparados. Como resumido na Tabela 17 abaixo, três compostos antissenso que direcionam à ApoC III tinham a mesma sequência de nucleobases; ISIS 304801 é um gapmer 5-10-5 MOE com todas as ligações de fósforotioato; ISIS 647535 é o mesmo que ISIS 304801, salvo se tinha GalNAc3-1 conjugada na extremidade 3'; e ISIS 647536 é o mesmo que ISIS 647535 salvo se determinadas ligações internucleosídeas desse composto forem ligações de fosfodiéster. Como resumido ainda na Tabela 17, dois compostos antissenso separados que direcionam SRB-1 foram sintetizados. ISIS 440762 foi um gapmer 2-10-2 cEt com todas as ligações internucleosídeas de fósforotioato; ISIS 651900 é o mesmo que ISIS 440762, exceto que se incluiu uma GalNAc3-1 na sua extremidade 3'.

Tabela 17

ASO Modificado direcionando ApoC III e SRB-1

ASO	Sequência (5' e 3')	Alvo	Massa CalCd	Massa Observada	Nº SED ID
ISIS 304801	$A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}\ T_{es}T_{es}T_{es}A_{es}T_{e}$	ApoC III	7165.4	7164,4	244
ISIS 647535	$A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{es}T_{es}T_{es}A_{es}T_{eo}\mathbf{A_{do'}\text{-}GalNAc_3\text{-}1_a}$	ApoC III	9239.5	9237,8	245
ISIS 647536	$A_{es}G_{eo}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{eo}T_{eo}T_{es}A_{es}T_{eo}\mathbf{A_{do'}\text{- }GalNAc_3\text{-}1_a}$	ApoC III	9142.9	9140,8	245
ISIS 440762	$T_{ks}{}^{m}C_{ks}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ks}{}^{m}C_{k}$	SRB-1	4647.0	4646,4	246
ISIS 651900	$T_{ks}{}^{m}C_{ks}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ks}{}^{m}C_{ko}\mathbf{A_{do'}\text{-}GalNAc_3\text{-}1_a}$	SRB-1	6721.1	6719,4	247

[00884] Subscritos: "e" indica nucleosídeo modificado de 2'-MOE; "d" indica β-D-2'-desoxirribosenucleosídeo; "k" indica 6'-*(S)*-CH_3 nucleosídeo bicíclico (por exemplo cEt); "s" indica ligações de internucleosídeo de fosforotioato (PS); "o" indica ligações de internucleosídeo de fosfodi-

éster (PO); e "o'" indica -O-P(=O)(OH)-. Subscrito "m" indica 5-metilcitosinas. "**GalNAc$_3$-1**" indica um grupo de conjugado tendo a estrutura mostrada anteriormente em Exemplo 9. Observar que **GalNAc$_2$-1 compreende uma adenosina clivável que liga a ASO para o restante do conjugado que é nomeado 'GalNAc$_3$-1$_a$."** Esta nomenclatura é usada na tabela acima, para mostrar a sequência de nucleobases completo, incluindo a adenosina, que faz parte do conjugado. Sendo assim, na tabela acima, as sequências também poderiam ser listadas como terminando com "**GalNAc$_3$-1"** com o "**A$_{do}$"** omitido. Esta convenção de uso do subscrito "a" para indicar a parte de um grupo de conjugado desprovido de nucleosídeo clivável ou porção clivável é usada nesses Exemplos. Esta parte de um grupo de conjugado desprovido de porção clivável é denominada "agrupamento" ou "agrupamento conjugado" ou agrupamento "GalNAc$_3$". Em determinados casos, é conveniente descrever um grupo de conjugado apresentando, separadamente, seu agrupamento e sua porção clivável.

Exemplo 20: Inibição antissenso dependente de dose de ApoC III humana em camundongos transgênicos huApoC III

[00885] ISIS 304801 e ISIS 647535, cada um direcionando ApoC III humana e descrita acima, foram testados separadamente e avaliados em um estudo dependente da dose para sua capacidade de inibir ApoC III humana em camundongos transgênicos ApoC III humana.

Tratamento

[00886] Camundongos transgênicos ApocIII humana foram mantidos num ciclo de luz/escuro de 12 horas e foram alimentados *ad libitum* Teklad lab Chow. Os animais foram aclimatados por pelo menos 7 dias no centro de investigação antes do início do experimento. ASOs foram preparados em PBS e esterilizados pela filtração através de um filtro de 0,2 mícron. ASOs foram dissolvidos em PBS 0,9% para injeção.

[00887] ApoC III humana de camundongos transgênicos foram injetada por via intraperitoneal uma vez por semana por duas semanas com ISIS 304801 ou 647535 em 0,08, 0,25, 0,75, 2,25 ou 6,75 μmol/kg ou com PBS como controle. Cada grupo de tratamento consistiu em 4 animais. Quarenta e oito horas após a administração da última dose, foi retirado sangue de cada camundongo e os camundongos foram sacrificados e os tecidos foram coletados.

Análise de ApoC III mRNA

[00888] Os níveis de mRNA de ApoC III nos fígados dos camundongos foram determinados usando PCR em tempo real e reagente de quantificação RIBOGREEN® RNA (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) de acordo com protocolos padrão. Os níveis de mRNA de ApoC III foram determinados em relação ao RNA total (usando Ribogreen), antes da normalização para controle tratado com PBS. Os resultados abaixo são apresentados como a média percentual dos níveis de mRNA de ApoC III para cada grupo de tratamento, normalizado para o controle tratado com PBS e é indicado como "% PBS". A metade da dosagem máxima eficaz (ED_{50}) de cada ASO é também apresentada na Tabela 18, abaixo.

[00889] Como ilustrado, ambos os compostos antissenso reduziram o RNA da ApoC III em relação ao controle com PBS. Adicionalmente, o composto antisenso conjugado a **$GalNAc_3$-1** (ISIS 647535) foi significativamente mais pontente do que o composto antisenso que não possui o conjugado **$GalNAc_3$-1** (ISIS 304801).

Tabela 18

Efeito do tratamento de ASO nos níveis de mRNA de ApoC III em camundongos transgênicos ApoC III humana

ASO	Dose (μmol/kg)	% PBS	ED_{50} (μmol/kg)	Conjugado 3'	Ligação/comprimento do internucleosídeo	SEQ ID Nº
PBS	0	100	--	-	--	
ISIS 304801	0,08	95	0,77	Nenhuma	PS/20	244
	0,75	42				
	2,25	32				
	6,75	19				
ISIS 647535	0,08	50	0,074	$GalNAc_3$-1	PS/20	245
	0,75	15				

	2,25	17				
	6,75	8				

Análise da Proteína ApoC III (Ensaio Turbidométrico)

[00890] Análise da proteína ApoC III do plasma foi determinada usando procedimentos relatados por Graham et al, Circulation Research, publicado online antes da impressão em 29 de março de 2013.

[00891] Cerca de 100 µl de plasma isolado de camundongos foram analisados sem diluição, usando um Analisador Clínico Olympus e um ensaio de ApoC III turbidométrico comercialmente disponível (Kamiya, Cat Nº KAI-006, Kamiya biomédica, Seattle, WA). O protocolo do ensaio foi realizado como descrito pelo fornecedor.

[00892] Como mostrado na Tabela 19 abaixo, ambos os compostos antissenso reduziram a proteína ApoC III em relação ao controle com PBS. Adicionalmente, o composto antisenso conjugado a **$GalNAc_3$-1** (ISIS 647535) foi significativamente mais pontente do que o composto antisenso que não possui o conjugado **$GalNAc_3$-1** (ISIS 304801).

Tabela 19

Efeito do tratamento de ASO nos níveis da proteína do plasma ApoC III em camundongos transgênicos ApoC III humana

ASO	Dose (µmol/kg)	% PBS	ED_{50} (µmol/kg)	Conjugado 3'	Internucleosídeo Ligação/comprimento	SEQ ID Nº
PBS	0	100	--	--	--	
ISIS 304801	0,08	86	0,73	Nenhuma	PS/20	244
	0,75	51				
	2,25	23				
	6,75	13				
ISIS 647535	0,08	72	0,19	$GalNAc_3$-1	PS/20	245
	0,75	14				
	2,25	12				
	6,75	11				

[00893] Triglicerídeos e colesterol do plasma foram extraídos pelo método de Bligh e Dyer (Bligh, E.G. e Dyer, W.J. Can. J. Biochem. Physiol 37: 911-917, 1959)(Bligh, E and Dyer, W, *Can J Biochem Physiol*, 37, 911-917, 1959)(Bligh, E and Dyer, W, *Can J Biochem Physiol*, 37, 911-917, 1959) e medidos pelo uso do analisador clínico Beckmann Coulter e reagentes comercialmente disponíveis.

[00894] Os níveis de triglicerídeo foram medidos em relação aos camundongos injetados com PBS e são indicadas como "% PBS". Os resultados são apresentados na Tabela 20. Como ilustrado, ambos os compostos antissenso reduziram os níveis de triglicerídeo. Adicionalmente, o composto antisenso conjugado a **GalNAc$_3$-1** (ISIS 647535) foi significativamente mais pontente do que o composto antisenso que não possui o conjugado **GalNAc$_3$-1** (ISIS 304801).

Tabela 20

Efeito do tratamento com ASO nos níveis de triglicerídeo em camundongos transgênicos

ASO	Dose (µmol/kg)	% PBS	ED_{50} (µmol/kg)	Conjugado 3'	Internucleosídeo Ligação/comprimento	SEQ ID Nº
PBS	0	100	--	--	--	
ISIS 304801	0,08	87	0,63	Nenhuma	PS/20	244
	0,75	46				
	2,25	21				
	6,75	12				
ISIS 647535	0,08	65	0,13	**GalNAc$_3$-1**	PS/20	245
	0,75	9				
	2,25	8				
	6,75	9				

[00895] As amostras de plasma foram analisadas por HPLC para determinar a quantidade de colesterol total e as diferentes frações de colesterol (HDL e LDL). Os resultados são apresentados nas Tabelas 21 e 22. Como ilustrado, ambos os compostos antissenso reduziram os níveis de colesterol total; ambos reduziram o LDL; e ambos aumentaram o HDL. Adicionalmente, o composto antisenso conjugado a **GalNAc$_3$-1** (ISIS 647535) foi significativamente mais pontente do que o composto antisenso que não possui o conjugado **GalNAc$_3$-1** (ISIS 304801). Um aumento nos níveis de HDL e uma diminuição nos níveis de LDL é um efeito benéfico cardiovascular de inibição antissenso de ApoC III.

Tabela 21

Efeito do tratamento com ASO nos níveis de colesterol total em camundongos transgênicos

ASO	Dose (µmol/kg)	Colesterol total (mg/dl)	Conjugado 3'	Internucleosídeo Ligação/comprimento	SEQ ID Nº
PBS	0	257	--	--	
ISIS 304801	0,08	226	Nenhuma	PS/20	244

	0,75	164			
	2,25	110			
	6,75	82			
ISIS 647535	0,08	230	$GalNAc_3$-1	PS/20	245
	0,75	82			
	2,25	86			
	6,75	99			

Tabela 22

Efeito do tratamento de ASO em níveis de colesterol HDL e LDL em camundongos transgênicos

ASO	Dose (µmol/kg)	HDL (mg/dL)	LDL (mg/dL)	Conjugado 3'	Internucleosídeo Ligação/comprimento	SEQ ID Nº
PBS	0	17	28	--	--	
ISIS 304801	0,08	17	23	Nenhuma	PS/20	244
	0,75	27	12			
	2,25	50	4			
	6,75	45	2			
ISIS 647535	0,08	21	21	$GalNAc_3$-1	PS/20	245
	0,75	44	2			
	2,25	50	2			
	6,75	58	2			

Análise Farmacocinética (PK)

[00896] A PK do ASO também foi avaliada. As amostras de fígado e de rim foram picadas e extraídas utilizando protocolos convencionais. As amostras foram analisadas em MSD1 utilizando IP-HPLC-MS. O nível do tecido (µg/g) de comprimento total e ISIS 304801 e 647535 foi medido e os resultados estão apresentados na Tabela 23. Como ilustrado, as concentrações do fígado dos compostos antissenso totais de comprimento completo eram semelhantes para os dois compostos antissenso. Assim, mesmo que o composto antissenso conjugado de <g id="5841">GalNAc<g id="5842">3</g>-1</g> seja mais ativo no fígado (como demonstrado pelos dados do RNA e da proteína acima), ele não está presente em concentrações substancialmente elevadas no fígado. De fato, o EC_{50} calculado (apresentado na Tabela 23) confirma que o aumento observado na potência do composto conjugado não pode ser inteiramente atribuído ao aumento do acúmulo. Este resultado sugere que o conjugado melhorou a potência por um mecanismo diferente da acumulação no fígado sozinho, possivelmente pela melhoria da absorção produtiva do composto antissenso nas células.

[00897] Os resultados também mostram que a concentração do composto antissenso conjugado **GalNAc$_3$-1no** rim é menor do que o do composto antissenso desprovido do conjugado de **GalNAc**. Há várias implicações terapêuticas benéficas. Para indicações terapêuticas em que não se busca a atividade no rim, a exposição do rim arrisca a toxicidade renal, sem benefício correspondente. Além disso, a alta concentração no rim geralmente resulta na perda do composto na urina resultando em uma depuração mais rápida Portanto, para alvos não renais, o acúmulo no rim não é desejado. Estes conjugados sugerem que a conjugação **GalNAc$_3$-1** reduz a acumulação nos rins.

Tabela 23

Análise PK do tratamento com ASO em camundongos transgênicos

ASO	Dose (µmol/kg)	Fígado (µg/g)	Rim (µg/g)	Fígado EC_{50} (µg/g)	Conjugado 3'	Internucleosídeo Ligação/comprimento	SEQ ID Nº
ISIS 304801	0,1	5,2	2,1	53	Nenhuma	PS/20	244
	0,8	62,8	119,6				
	2,3	142,3	191,5				
	6,8	202,3	337,7				
ISIS 647535	0,1	3,8	0,7	3,8	$GalNAc_3$-1	PS/20	245
	0,8	72,7	34,3				
	2,3	106,8	111,4				
	6,8	237,2	179,3				

[00898] Os metabólitos de ISIS 647535 também foram identificados e suas massas foram confirmadas pela análise de espectrometria de massa de alta resolução. Os locais de clivagem e as estruturas dos metabólitos observados são mostrados abaixo. % relativa de ASO de comprimento completo foi calculado utilizando procedimentos convencionais e os resultados são apresentados na Tabela 23a. O metabólito principal de ISIS 647535 foi ASO de comprimento completo desprovido do conjugado inteiro (ou seja, ISIS 304.801), que resulta da clivagem no sítio de clivagem A, mostrado abaixo. Além disso, metabólitos adicionais resultantes de outros sítios de clivagem também foram observados. Estes resultados sugerem que a introdução de outras ligações cliváveis como ésteres, peptídeos, dissulfuretos, fosforamidatos ou acil-hidrazonas entre o açúcar **GalNAc$_3$-1** e ASO, que podem ser clivados pelas enzimas

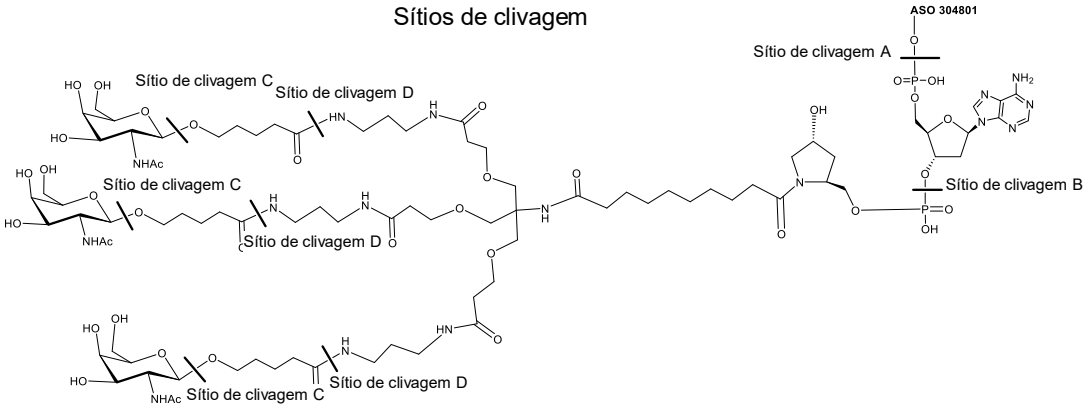
dentro da célula, ou que podem clivar no ambiente redutivo do citosol, ou que são lábeis ao pH ácido no interior dos endossomos e lisossomos também pode ser úteis.

Tabela 23a

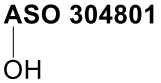
Metabólitos de comprimento completo de ISIS 647535

Metabólito	ASO	Sítio de clivagem	% Relativa
1	ISIS 304801	A	36,1
2	ISIS 304801 + dA	B	10,5
3	ISIS 647535 menos [3 GalNAc]	C	16,1
4	ISIS 647535 menos [3 GalNAc + 1 5 corrente do ácido 5-hidróxi-pentanoico]	D	17,6
5	ISIS 647535 menos [2 GalNAc + 2 correntes do ácido 5-hidróxi-pentanoico]	D	9,9
6	ISIS 647535 menos [3 GalNAc + 3 5 correntes do ácido 5-hidróxi-pentanoico]	D	9,8

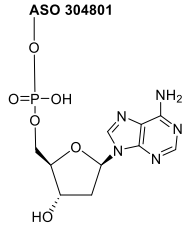
Sítios de clivagem



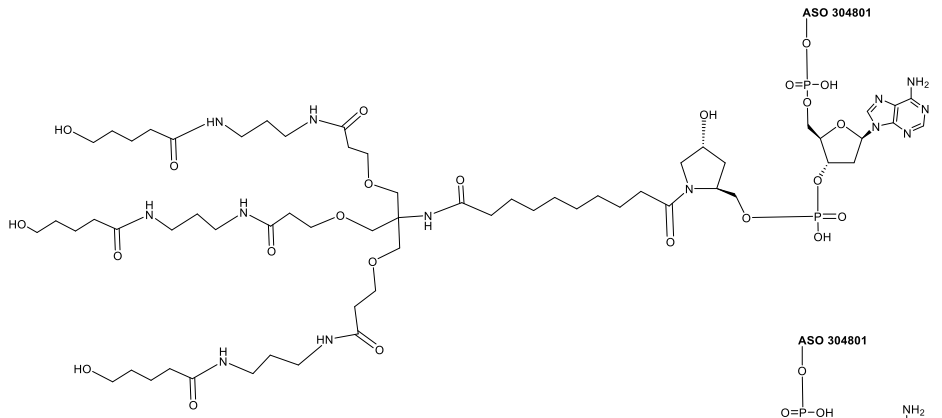
Metabólito 1



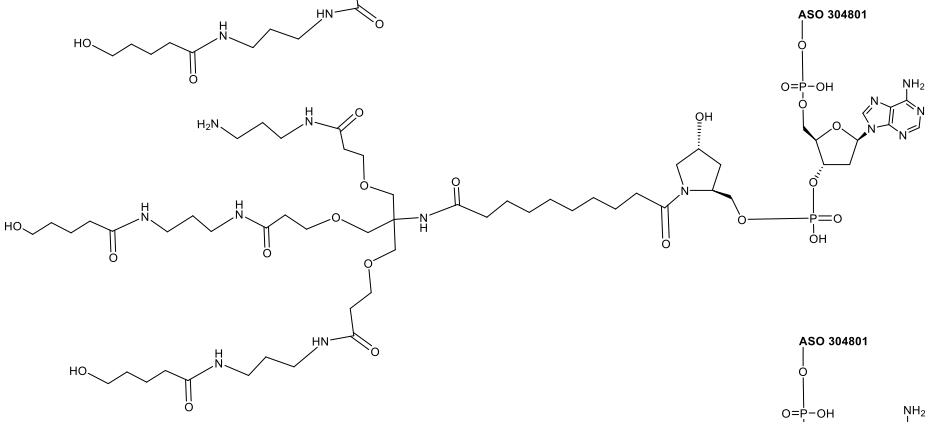
Metabólito 2



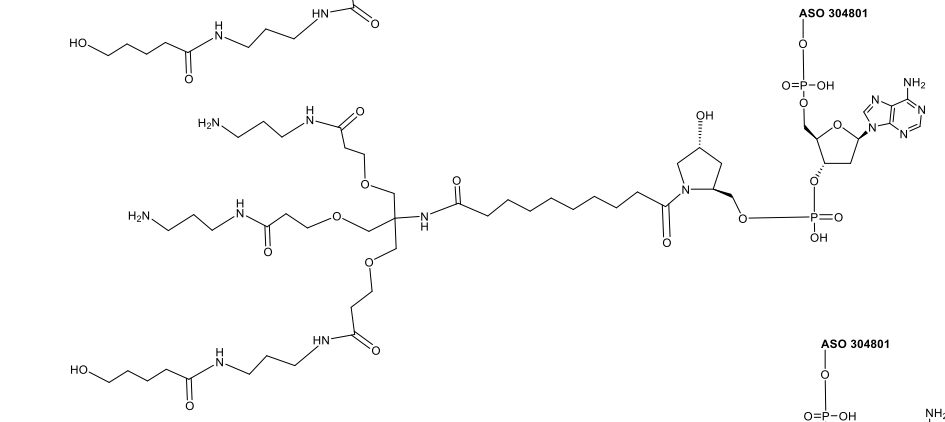
Metabólito 3



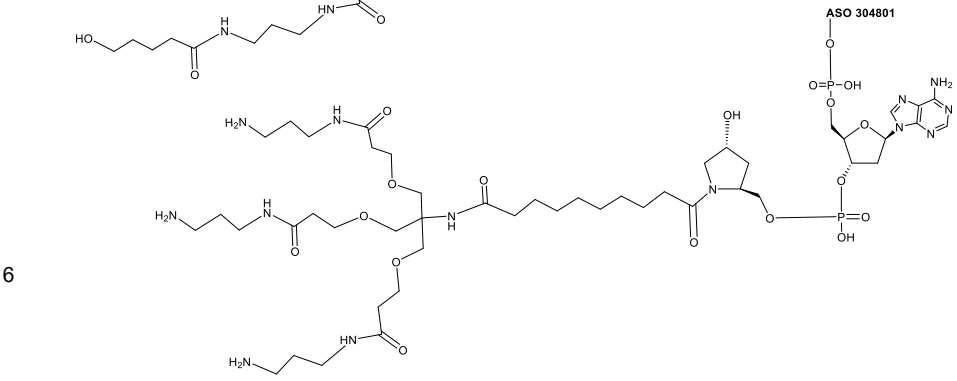
Metabólito 4



Metabólito 5



Metabólito 6



Exemplo 21: Inibição antissenso da ApoC III humana em camundongos transgênicos ApoC III humana em estudo de administração única

[00899] ISIS 304801, 647535 e 647536 cada direcionando ApoC III humana e descrito na Tabela 17, foram ainda avaliados num estudo de administração única pela sua capacidade de inibir a ApoC III humana em camundongos transgênicos ApoC III humana.

Tratamento

[00900] Camundongos transgênicos APOCIII humana foram mantidos num ciclo de luz/escuro de 12 horas e foram alimentados *ad libitum* Teklad lab Chow. Os animais foram aclimatados por pelo menos 7 dias no centro de investigação antes do início do experimento. ASOs foram preparados em PBS e esterilizados pela filtração através de um filtro de 0,2 mícron. ASOs foram dissolvidos em PBS 0,9% para injeção.

[00901] ApoC III humana de Camundongos transgênicos foram injetados por via intraperitoneal em uma dosagem mostrada abaixo com ISIS 304801, 647535 ou 647536 (descritas abaixo) ou com controle tratado com PBS. O grupo de tratamento consistiu em 3 animais e o grupo controle consistiu em 4 animais. Antes do tratamento, bem como após a última dose, o sangue foi retirado de cada camundongo e as amostras de plasma foram analisadas. Os camundongos foram sacrificados 72 horas após a última administração.

[00902] As amostras foram coletadas e analisadas para determinar o mRNA da ApoC III e os níveis proteicos no fígado; triglicerídeos plasmáticos; e colesterol, incluindo as frações HDL e LDL foram avaliadas como descrito acima (Exemplo 20). Os dados dessas análises são apresentados nas Tabelas 24-28 abaixo. Os níveis de transaminase, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) hepáticas no soro foram medidos em relação aos camundongos injetados com salina usando protocolos padrão. A níveis de ALT e AST mostrou que os compostos antissenso foram bem tolerados em todas as doses administradas.

[00903] Estes resultados mostram melhoria na potência para compostos antissenso compreendendo um conjugado **GalNAc$_3$-1** no terminal 3’ (ISIS 647535 e 647536) comparado ao composto antisenso com ausência de conjugado **GalNAc$_3$-1** (ISIS 304801). Adicionalmente, ISIS

647536, que compreende um conjugado **GalNAc$_3$-1** e algumas ligaçcoes de fosfodiéster foi tão potente como o ISIS 647535, que compreende o mesmo conjugado e todas as ligações de internucleosídeos dentro do ASO são fosforotioato.

Tabela 24

Efeito do tratamento de ASO nos níveis de mRNA de ApoC III em camundongos transgênicos ApoC III humana

ASO	Dose (mg/kg)	% PBS	ED_{50} (mg/kg)	Conjugado 3'	Ligação/comprimento do internucleosídeo	SEQ ID Nº
PBS	0	99	--	-	--	
ISIS 304801	1	104	13,2	Nenhuma	PS/20	244
	3	92				
	10	71				
	30	40				
ISIS 647535	0,3	98	1,9	**GalNAc$_3$-1**	PS/20	245
	1	70				
	3	33				
	10	20				
ISIS 647536	0,3	103	1,7	**GalNAc$_3$-1**	PS/PO/20	245
	1	60				
	3	31				
	10	21				

Tabela 25

Efeito do tratamento de ASO nos níveis da proteína do plasma ApoC III em camundongos transgênicos ApoC III humana

ASO	Dose (mg/kg)	% PBS	ED_{50} (mg/kg)	Conjugado 3'	Internucleosídeo Ligação/comprimento	SEQ ID Nº
PBS	0	99	--	--	--	
ISIS 304801	1	104	23,2	Nenhuma	PS/20	244
	3	92				
	10	71				
	30	40				
ISIS 647535	0,3	98	2,1	**GalNAc$_3$-1**	PS/20	245
	1	70				
	3	33				
	10	20				
ISIS 647536	0,3	103	1,8	**GalNAc$_3$-1**	PS/PO/20	245
	1	60				
	3	31				
	10	21				

Tabela 26

Efeito do tratamento com ASO nos níveis de triglicerídeo em camundongos transgênicos

ASO	Dose (mg/kg)	% PBS	ED_{50} (mg/kg)	Conjugado 3'	Internucleosídeo Ligação/comprimento	SEQ ID Nº
PBS	0	98	--	--	--	
ISIS 304801	1	80	29,1	Nenhuma	PS/20	244
	3	92				
	10	70				
	30	47				
ISIS 647535	0,3	100	2,2	**$GalNAc_3$-1**	PS/20	245
	1	70				
	3	34				
	10	23				
ISIS 647536	0,3	95	1,9	**$GalNAc_3$-1**	PS/PO/20	245
	1	66				
	3	31				
	10	23				

Tabela 27

Efeito do tratamento com ASO nos níveis de colesterol total em camundongos transgênicos

ASO	Dose (mg/kg)	% PBS	Conjugado 3'	Internucleosídeo Ligação/comprimento	SEQ ID Nº
PBS	0	96	--	--	
ISIS 304801	1	104	Nenhuma	PS/20	244
	3	96			
	10	86			
	30	72			
ISIS 647535	0,3	93	**$GalNAc_3$-1**	PS/20	245
	1	85			
	3	61			
	10	53			
ISIS 647536	0,3	115	**$GalNAc_3$-1**	PS/PO/20	245
	1	79			
	3	51			
	10	54			

Tabela 28

Efeito do tratamento de ASO em níveis de colesterol HDL e LDL em camundongos transgênicos

ASO	Dose (mg/kg)	HDL % PBS	LDL % PBS	Conjugado 3'	Internucleosídeo Ligação/comprimento	SEQ ID Nº
PBS	0	131	90	--	--	
ISIS 304801	1	130	72	Nenhuma	PS/20	244
	3	186	79			
	10	226	63			
	30	240	46			
ISIS 647535	0,3	98	86	**GalNAc$_3$-1**	PS/20	245
	1	214	67			
	3	212	39			
	10	218	35			
ISIS 647536	0,3	143	89	**GalNAc$_3$-1**	PS/PO/20	245
	1	187	56			
	3	213	33			
	10	221	34			

[00904] Estes resultados confirmam que o conjugado de **GalNAc$_3$-1** melhora a potência de um composto antissenso. Os resultados também mostram uma potência igual de compostos antissenso conjugado **GalNAc$_3$-1** onde os oligonucleótidos antissenso misturaram ligações (ISIS 647536 que tem seis ligações fosfodiéster) e uma versão completa de fósforotioato versão do mesmo composto antissenso (ISIS 647535).

[00905] As ligações fosforotioato proveem várias propriedades para compostos antissenso. Por exemplo, elas resistem à digestão da nuclease e ligam proteínas resultando no acúmulo do composto no fígado, em vez de no rim/urina. Estas são as propriedades desejáveis, especialmente quando tratam de uma indicação no fígado. No entanto, as ligações de fósforotioato também foram associadas a uma resposta inflamatória. Por conseguinte, a redução do número de ligações fósforotioato em um composto é esperada para reduzir o risco de inflamação, mas também para diminuir a concentração do composto no fígado, aumentar a concentração na urina e rim, diminuir a estabilidade na presença de nucleases, e reduzir a potência global. Os resultados presentes mostram que um composto antissenso de conjugado **GalNAc$_3$-1** onde determinadas ligações de fosforotioato foram substituídas com ligações de fosfodiéster é tão potente contra um alvo no fígado como um

equivalente tendo ligações completas de fosforotioato. Espera-se que esses sejam menos pró-inflamatórios (ver Exemplo 24 que descreve uma experiência que mostra a redução de resultados PS no efeito inflamatório reduzido).

Exemplo 22: Efeito de conjugado GalNAc$_3$-1 modificado de ASO direcionando SRB-1 *in vivo*

[00906] ISIS 440762 e 651900, cada um direcionando SRB-1 e descritos na Tabela 17, foram avaliados num estudo dependente da dose quanto à sua capacidade de inibir a SRB-1 em camundongos Balb/c.

Tratamento

[00907] Camundongos Balb/c machos de seis semanas de idade (Laboratório Jackson, Bar Harbor, ME) foram injetados por via subcutânea uma vez na dosagem mostrada abaixo com ISIS 440762, 651900 ou com controle tratado com PBS. Cada grupo de tratamento consistiu em 4 animais. Os camundongos foram sacrificados 48 horas após a administração final para determinar os níveis de mRNA de SRB-1 no fígado usando PCR em tempo real e reagente de quantificação de RNA RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) de acordo com protocolos padrão. Os níveis de mRNA de SRB-1 foram determinados em relação ao RNA total (usando Ribogreen), antes da normalização para controle tratado com PBS. Os resultados abaixo são apresentados como a média percentual dos níveis de mRNA de SRB-1 para cada grupo de tratamento, normalizado para o controle tratado com PBS e é indicado como "% PBS".

[00908] Como ilustrado na Tabela 29, ambos os compostos antisenso reduziram os níveis de mRNA do SRB-1. Adicionalmente, o composto antisenso conjugado a **GalNAc$_3$-1** (ISIS 651900) foi significativamente mais pontente do que o composto antisenso que não possui o conjugado **GalNAc$_3$-1** (ISIS 440762). Estes resultados demonstram que

o benefício da potência dos conjugados de**GalNAc$_3$-1**é observado utilizando oligonucleotídeos antissenso complementares a um alvo diferente e com nucleosídeos quimicamente diferentes, neste caso nucleosídeos modificados compreendem frações de açúcar etílico (uma porção de açúcar bicíclico).

Tabela 29

Efeito do tratamento com ASO sobre os níveis de mRNA de SRB-1 em camundongos Balb/c

ASO	Dose (mg/kg)	Fígado % PBS	ED_{50} (mg/kg)	Conjugado 3'		Ligação/comprimento do internucleosídeo	SEQ ID Nº
PBS	0	100		-		--	
ISIS 440762	0,7	85	2,2	Nenhuma		PS/14	246
	2	55					
	7	12					
	20	3					
ISIS 651900	0,07	98	0,3	**GalNAc$_3$-1**		PS/14	247
	0,2	63					
	0,7	20					
	2	6					
	7	5					

Exemplo 23: Protocolo do Ensaio de Células Mononucleares do Sangue Periférico Humano (hPBMC)

[00909] O ensaio de hPBMC foi realizado utilizando o método do BD Vautainer CPT. Uma amostra de todo o sangue de doadores voluntários com consentimento informado na clínica US HealthWorks (Faraday & El Camino Real, Carlsbad) foi obtida e recolhidos em tubos 4-15 BD Vacutainer CPT 8 ml (VWR Cat. Nº BD362753 O volume de sangue total inicial aproximado de sangue total nos tubos CPT para cada doador foi registrado utilizando a ficha de dados de ensaio PBMC.

[00910] A amostra de sangue foi misturada novamente imediatamente antes da centrifugação, invertendo suavemente os tubos de 8-10 vezes. Tubos CPT foram centrifugados à temperatura ambiente (18-25 ºC) em um rotor horizontal (swing-out) por 30 min. em 1500-1800 RCF com pausa (2700 RPM Beckman Allegra 6R). As células foram recuperadas a partir da interface buffy coat (entre Ficoll e camadas de gel de polímero); transferidas para um tubo cônico estéril de 50 ml e reunidos

em tubos 5 CPT/50 ml tubo/doador cônico. As células foram então lavadas duas vezes com PBS (Ca^{++}, Mg^{++} livre; GIBCO). Os tubos foram enchidos até 50 ml e misturados pela inversão diversas vezes. A amostra foi então centrifugada em 330 x g durante 15 minutos à temperatura ambiente (1215 rpm, em Beckman Allegra 6R) e foram aspirados sobrenadantes tanto quanto possíveis, sem perturbar o sedimento. O sedimento celular foi desalojado por agitação suave do tubo e as células foram ressuspensas em RPMI+10% FBS+pen/strep (~1 ml/10 ml volume de sangue total inicial). Uma amostra de 60 µl foi pipetada em um recipiente de amostra (Beckman Coulter) com 600 µl de reagente VersaLyse (Beckman Coulter Cat Nº A09777) e foi suavemente turbilhonada por 10-15 seg. A amostra foi incubada por 10 min em temperatura ambiente, sendo misturada novamente antes da contagem. A suspensão de células foi contada no analisador de viabilidade da célula Vicell XR (Beckman Coulter), utilizando o tipo de célula PBMC (fator de diluição de 1:11 foi armazenado com outros parâmetros). Foi registrada a célula viva/ml e a viabilidade. A suspensão de células foi diluída para 1 x 1^7 PBMC vivo/ml em RPMI+10% FBS+pen/strep.

[00911] As células foram plaqueadas a 5 x 10^5 em 50 uL/poço placa de cultura do tecido de 96 poços (Falcon Microtest). 50 µl/poço de 2x concentração de oligos/controles diluídos em RPMI+10% FBS+pen/strep foram adicionados conforme modelo experimental (100 µl/poço total). As placas foram colocadas no agitador e foram deixadas para misturar por aprox. 1 min. Após serem incubadas por 24 horas a 37 ºC; 5% de CO_2, as placas foram centrifugadas a 400 x g por 10 minutos antes da remoção do sobrenadante para o ensaio de citocina MSD (ou seja, IL-6, IL-10, IL-8 e MCP-1 humana).

Exemplo 24: Avaliação dos Efeitos Pró-Inflamatórios em Ensaio hPBMC para conjugado de $GalNAc_3$-1 ASOs

[00912] Os oligonucleotídeos antissenso (ASOs) listados na Tabela

30 foram avaliados quanto ao efeito pró-inflamatório no ensaio de hPBMC utilizando o protocolo descrito no Exemplo 23. ISIS 353512 é um padrão interno conhecido por ser um respondedor elevado para liberação de IL-6 no ensaio. Os hPBMCs foram isolados de doadores novos e voluntários e foram tratados com ASO em concentrações de 0, 0,0128, 0,064, 0,32, 1,6, 8, 40 e 200 μM. Após um tratamento de 24 horas, os níveis de citocinas foram medidos.

[00913] Os níveis de IL-6 foram utilizados como leitura primária. O EC_{50} e E_{max} foi calculado usando procedimentos padrão. Os resultados são expressos como a razão média de E_{max}/EC_{50} a partir de dois doadores e é mencionado como "E_{max}/EC_{50}." A menor razão indica uma diminuição relativa na resposta pró-inflamatória e a maior razão indica uma aumento relativo na resposta pró-inflamatória.

[00914] No que diz respeito aos compostos de teste, o composto menos pró-inflamatório foi o ASO ligado ao PS/PO (ISIS 616468). O ASO conjugado**GalNAc$_3$-1** ISIS 647535 era ligeiramente menos pró-inflamatório do que sua contraparte não conjugada ISIS 304801. Estes resultados indicam que a incorporação de algumas ligações PO reduz a reação pró-inflamatória e adição de um conjugado **GalNAc$_3$-1** não torna um composto mais pró-inflamatório e pode reduzir a resposta pró-inflamatória. Consequentemente, pode-se esperar que um composto antissenso compreendendo tantos ligações PS/PO mistas e um conjugado **GalNAc$_3$-1** produziria respostas pró-inflamatórias menores em relação a compostos totais antissenso ligados a PS com ou sem um conjugado **GalNAc$_3$-1**. Estes resultados mostram que os compostos de antissenso de conjugados **GalNAc$_3$-1** , particularmente aqueles com conteúdo reduzido de PS, são menos pró-inflamatórios.

[00915] Juntos, estes resultados sugerem que um composto conjugado de **GalNAc$_3$-1** particularmente com um conteúdo reduzido de PS, pode ser administrado em uma dose maior do que um composto total

antissenso de PS equivalente com ausência de um conjugado **GalNAc$_3$-1**. Uma vez que não se espera que a meia-vida seja substancialmente diferente para estes compostos, essa administração resultaria em uma dosagem menos frequente. Na verdade essa administração poderia ser ainda menos frequente, porque os compostos conjugados **GalNAc$_3$-1** são mais potentes (Ver Exemplos 20-22) e a nova dosagem é necessária uma vez que a concentração de um composto ficou abaixo de um nível desejado, onde esse nível desejado se baseia na potência.

Tabela 30

ASOs Modificados

ASO	Sequência (5' para 3')	Alvo	SEQ ID Nº
ISIS 104838	$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}G_{es}A_{es}T_{ds}T_{ds}A_{ds}G_{ds}A_{ds}G_{ds}$ $A_{ds}G_{ds}A_{ds}G_{ds}G_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{e}$	TNFα	248
ISIS 353512	$T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}T_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}$ $G_{ds}A_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{es}G_{es}G_{e}$	CRP	249
ISIS 304801	$A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}$ $^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}\ T_{es}T_{es}T_{es}A_{es}T_{e}$	ApoC III	244
ISIS 647535	$A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}$ $^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{es}T_{es}T_{es}A_{es}T_{eo}$**$A_{do'}$-GalNAc$_3-1_a$**	ApoC III	245
ISIS 616468	$A_{es}G_{eo}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}$ $^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{eo}T_{eo}T_{es}A_{es}T_{e}$	ApoC III	244

[00916] Subscritos: "e" indicam nucleosídeo 2'-MOE modificado; "d" indica β-D-2'-desoxirribonucleosídeo; "k" indica nucleosídeo bicíclico 6'-*(S)*-CH_3 (por exemplo, cEt); "s" indica ligações internucleosídeas de fosforotioato (PS); "o" indica ligações internucleosídeas de fosfodiéster (PO); e "o" indica -O-P(=O)(OH)-. O subscrito "m" indica 5-metilcitosinas. "**$A_{do'}$-GalNAc$_3$-1$_a$**" indica um conjugado tendo a estrutura **GalNAc$_3$-1** mostrada no Exemplo 9 ligada ao terminal 3' do oligonucleotídeo antisenso, conforme indicado.

Tabela 31

Efeito de Pró-inflamatório dos ASOs direcionando ApoC III no ensaio de hPBMC

ASO	EC_{50} (μM)	E_{max} (μM)	E_{max}/ EC_{50}	Conjugado 3'	Ligação/comprimento do internucleosídeo	SEQ ID Nº
ISIS 353512 (respondedor elevado)	0,01	265,9	26,590	Nenhuma	PS/20	249
ISIS 304801	0,07	106,55	1,522	Nenhuma	PS/20	244
ISIS 647535	0,12	138	1,150	**GalNAc$_3$-1**	PS/20	245
ISIS 616468	0,32	71,52	224	Nenhuma	PS/PO/20	244

Exemplo 25: Efeito do conjugado GalNAc$_3$-1 modificado ASO direcionando ApoC III humano *in vitro*

[00917] ISIS 304801 e 647535 descritos acima foram testados *in vitro.* As células de hepatócitos primários de camundongos transgênicos em uma densidade de 25.000 células por poço, foram tratados com concentrações de 0,03,0,08, 0,24, 0,74, 2,22, 6,67 e 20 μM de oligonucleotídeos modificados. Após um período de tratamento de aproximadamente 16 horas, o RNA foi isolado das células e os níveis de mRNA foram medidos por PCR em tempo real e os níveis de mRNA de hApoC III foram ajustados de acordo com o conteúdo total de RNA total, conforme medido por RIBOGREEN®.

[00918] A IC_{50} foi calculada usando métodos padrão e os resultados são apresentados na Tabela 32. Como ilustrado, uma potência comparável foi observada em células tratadas com ISIS 647535 em comparação com o controle, ISIS 304801.

Tabela 32

ASO Modificado direcionando ApoC III humano em hepatócitos primários

ASO	IC_{50} (μM)	Conjugado 3'	Ligação/comprimento do internucleosídeo	SEQ ID Nº
ISIS 304801	0,44	Nenhuma	PS/20	244
ISIS 647535	0,31	**$GalNAc_3$-1**	PS/20	245

[00919] Neste experimento, os benefícios de grande potência da conjugação de **$GalNAc_3$-1** observados *in vivo* não foram observados *in vitro*. Experimentos de absorção livres subsequentes em hepatócitos primários *in vitro* mostraram aumento da potência de oligonucletoídeos compreendendo vários conjugados GalNAc relativos aos oligonucleotídeos desprovidos do conjugado GalNAc. (ver Exemplos 60, 82 e 92)

Exemplo 26: Efeito das ligações PO/PS na Atividade do ASO da ApoC III

[00920] Camundongos transgênicos ApoC III humana foram injetados por via intraperitoneal uma vez em 25 mg/kg de ISIS 304801 ou 616468 (descritos acima) ou com controle tratado com PBS uma vez por semana por duas semanas. O grupo de tratamento consistiu em 3 animais e o grupo controle consistiu em 4 animais. Antes do tratamento,

bem como após a última dose, o sangue foi retirado de cada camundongo e as amostras de plasma foram analisadas. Os camundongos foram sacrificados 72 horas após a última administração.

[00921] As amostras foram coletadas e analisadas para determinar os níveis da proteína ApoC III no fígado descritos acima (Exemplo 20). Os dados dessas análises são apresentados na Tabela 33 abaixo.

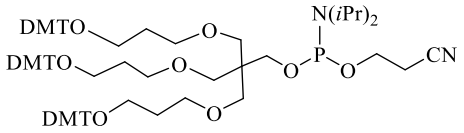
[00922] Estes resultados mostram redução na potência de compostos antissenso com PO/PS (ISIS 616468) nas asas relativas ao PS completo (ISIS 304801).

Tabela 33

Efeito do tratamento com ASO nos níveis da proteína ApoC III em camundongos transgênicos ApoC III humana

ASO	Dose (mg/kg)	% PBS	Conjugado 3'	Ligação/comprimento do internucleosídeo	SEQ ID Nº
PBS	0	99	-	--	
ISIS 304801	25 mg/kg/semana por 2 semanas	24	Nenhuma	PS completo	244
ISIS 616468	25 mg/kg/semana por 2 semanas	40	Nenhuma	14 PS/6 PO	244

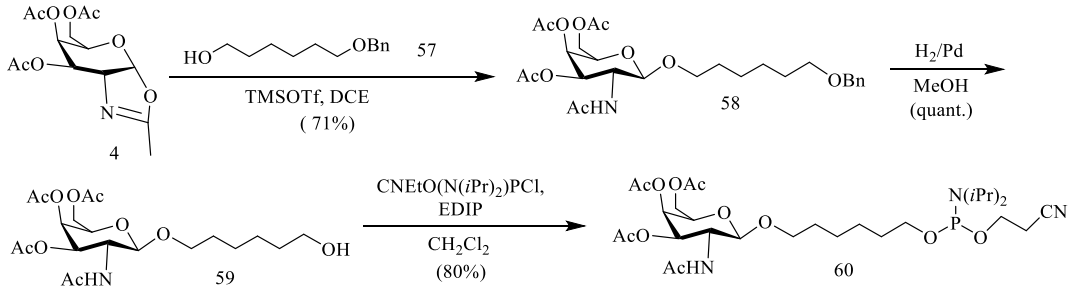
Exemplo 27: Composto 56



56

[00923] Composto 56 está comercialmente disponível de Glen Research, ou pode ser preparados de acordo com procedimentos publicados relatados por Shchepinov *et al., Nucleic Acids Research,* 1997, *25(22)*, 4447-4454.

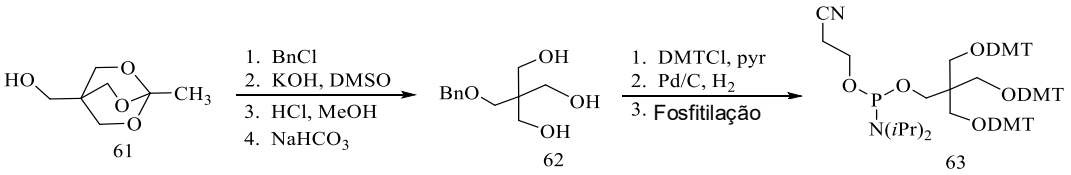
Exemplo 28: Preparação do Composto 60



[00924] O composto 4 foi preparado de acordo com os procedimentos ilustrados no Exemplo 2. O composto 57 está comercialmente disponível. Composto 60 foi confirmado por análise estrutural.

[00925] Composto 57 destina-se a ser representativo e não destina-se a ser limitante como outros dióis de alquila substituídos ou não substituídos monoprotegidos incluindo, entre outros, aqueles apresentados na especificação aqui contida podem ser utilizados para preparar fosforamiditas com uma composição predeterminada.

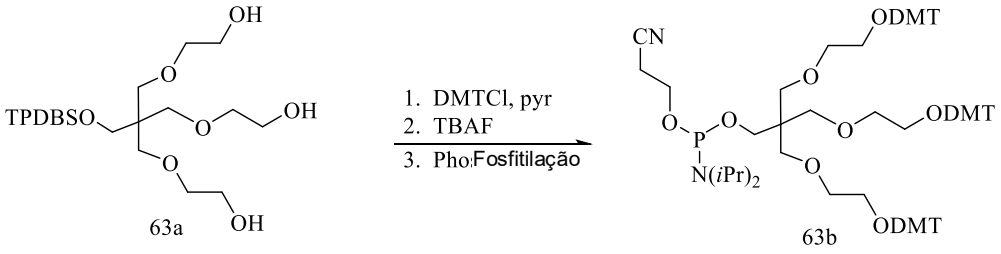
Exemplo 29: Preparação do Composto 63



[00926] Os compostos 61 e 62 são preparados utilizando procedimentos semelhantes aos relatados por Tober *et al., Eur. J. Org. Chem.,* 2013*, 3,* 566-577; and Jiang *et al., Tetrahedron,* 2007, *63(19),* 3982-3988.

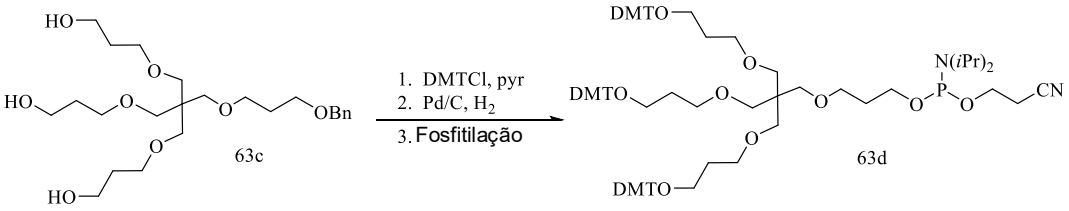
[00927] Alternativamente, o Composto 63 é preparado utilizando procedimentos semelhantes aos relatados na literatura científica e de patentes por Kim et al., Synlett, 2003, 12, 1838-1840; e Ki et al., , Pedido Internacional PCT publicado, WO 2004063208.

Exemplo 30: Preparação do Composto 63b



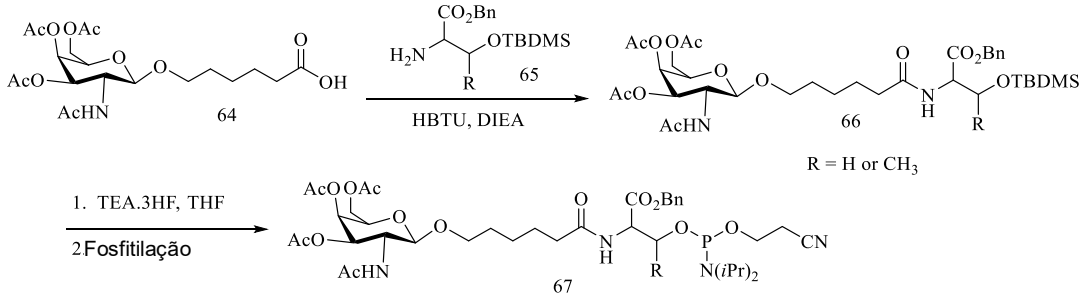
[00928] Composto 63a é preparado utilizando procedimentos semelhantes aos relatados por Hanessian *et al., Canadian Journal of Chemistry,* 1996*, 74(9),* 1731-1737.

Exemplo 31: Preparação do Composto 63d



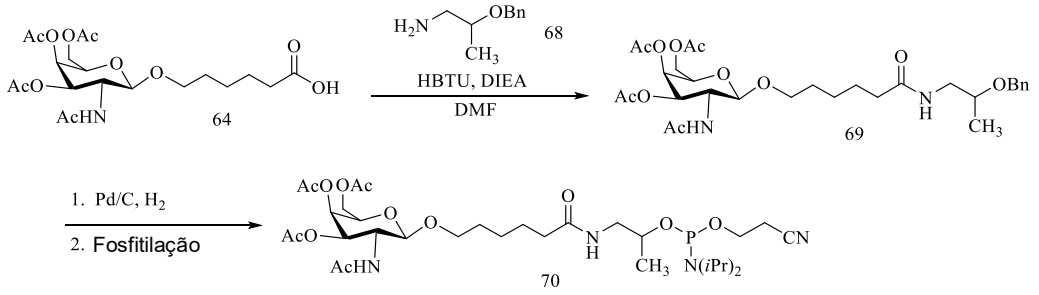
[00929] Composto 63c é preparado utilizando procedimentos semelhantes aos relatados por Chen *et al., Chinese Chemical Letters,* 1998, *9(5),* 451-453.

Exemplo 32: Preparação do Composto 67



[00930] O Composto 64 foi preparado de acordo com os procedimentos ilustrados no Exemplo 2. Composto 65 é preparado utilizando procedimentos semelhantes aos relatados por Or*et al.,* Pedido Internacional PCT publicado, WO 2009003009. Os grupos protetores utilizados para o Composto 65 são destinados a serem representativos e não pretendem ser limitantes como outros grupos protetores, incluindo, entre outros, aqueles apresentados na especificação aqui contida podem ser utilizados.

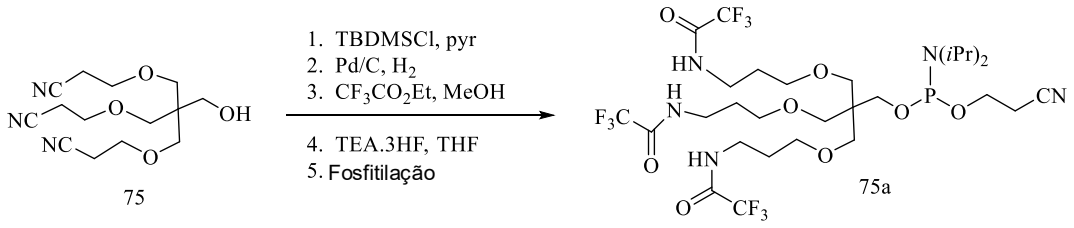
Exemplo 33: Preparação do Composto 70



[00931] O Composto 64 foi preparado de acordo com os procedimentos ilustrados no Exemplo 2. O composto 57 está comercialmente dis-

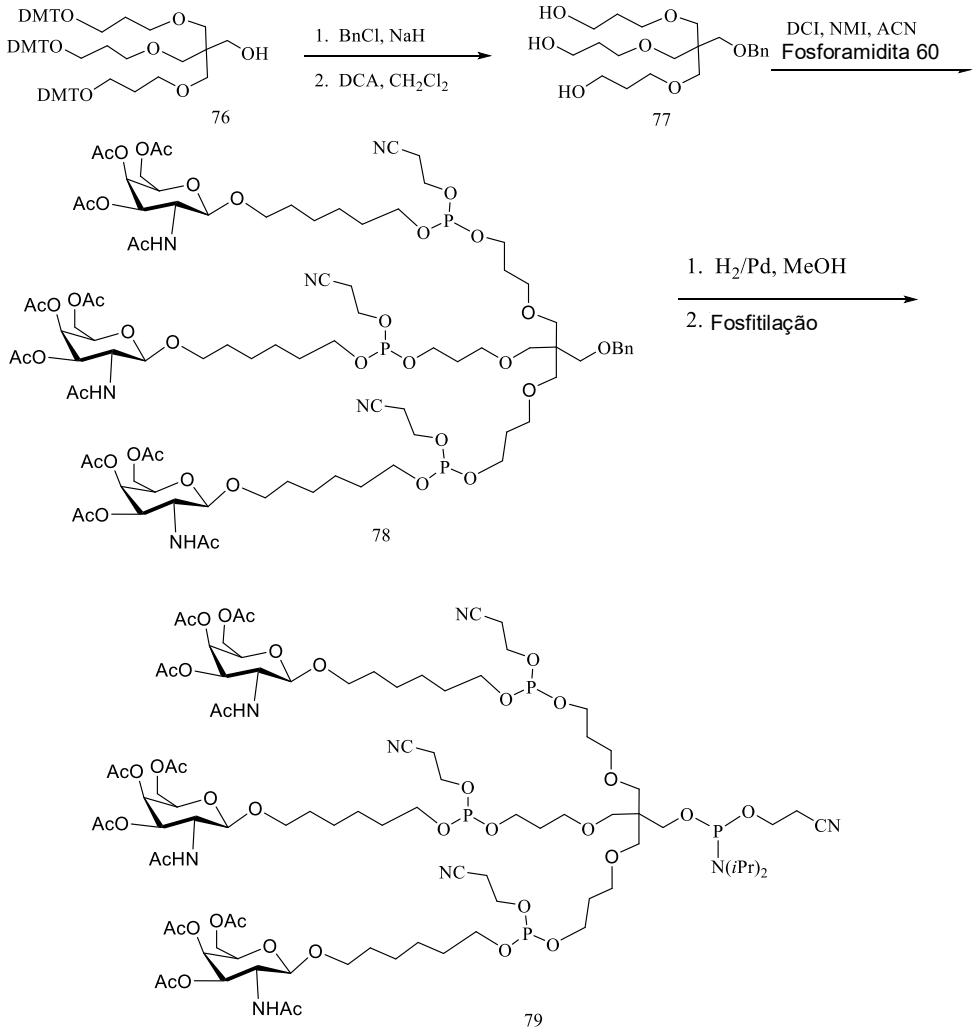
ponível. Os grupos protetores utilizados para o Composto 68 são destinados a serem representativos e não pretendem ser limitantes como outros grupos protetores, incluindo, entre outros, aqueles apresentados na especificação aqui contida podem ser utilizados.

Exemplo 34: Preparação do Composto 75a



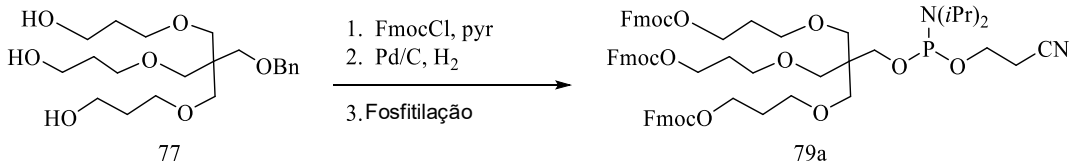
[00932] Composto 75 é preparado de acordo com os procedimentos publicados relatados por Shchepinov *et al., Nucleic Acids Research,* 1997, *25(22)*, 4447-4454.

Exemplo 35: Preparação do Composto 79



[00933] Composto 76 foi preparado de acordo com os procedimentos publicados relatados por Shchepinov *et al., Nucleic Acids Research,* 1997, *25(22)*, 4447-4454.

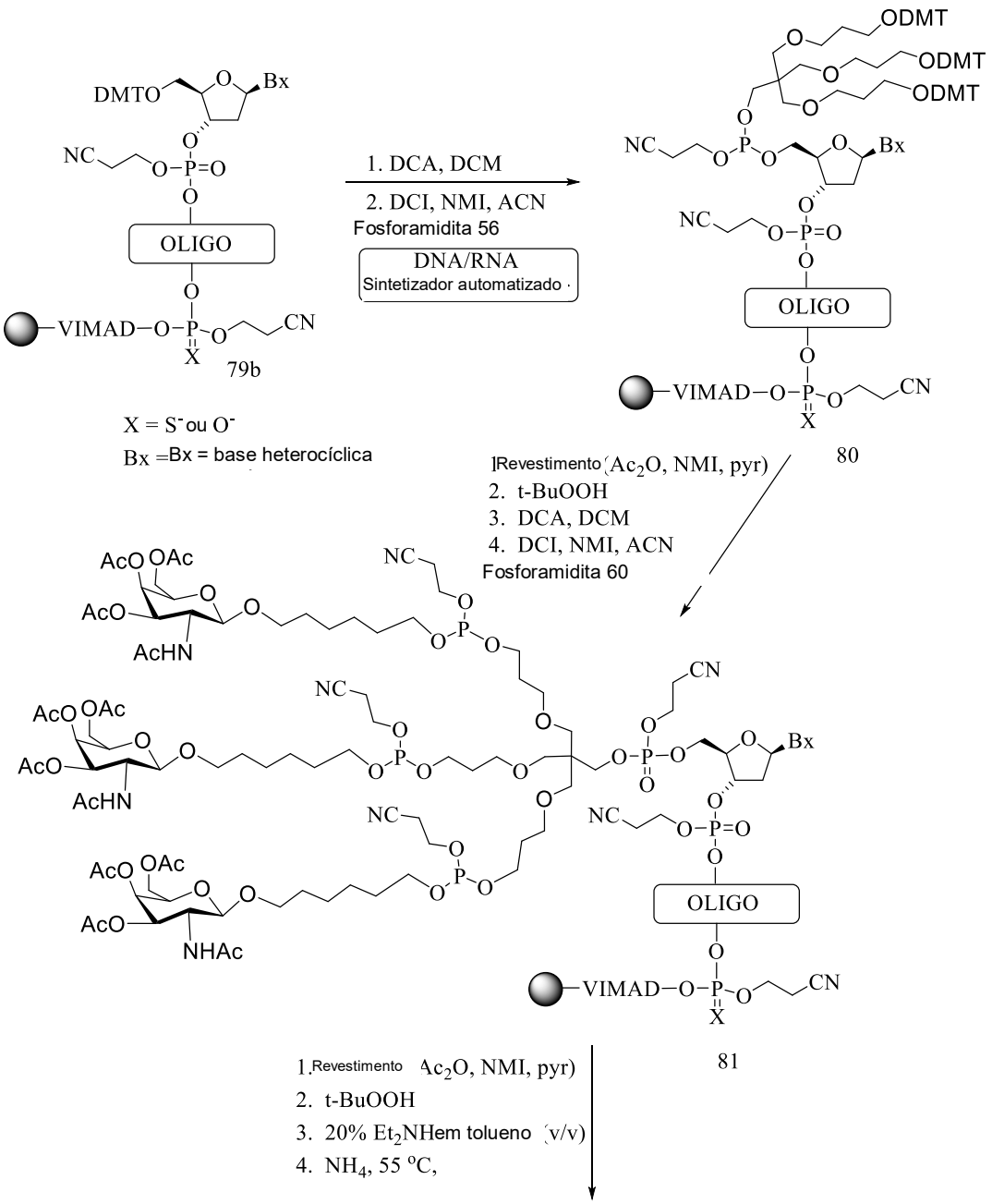
Exemplo 36: Preparação do Composto 79a

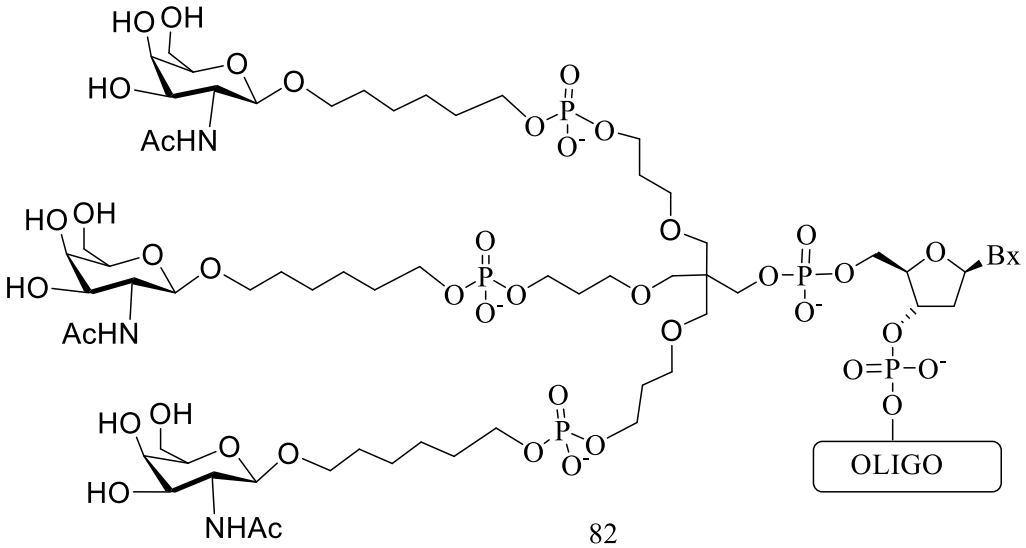


77 79a

[00934] O composto 77 é preparado de acordo com os procedimentos ilustrados no Exemplo 35.

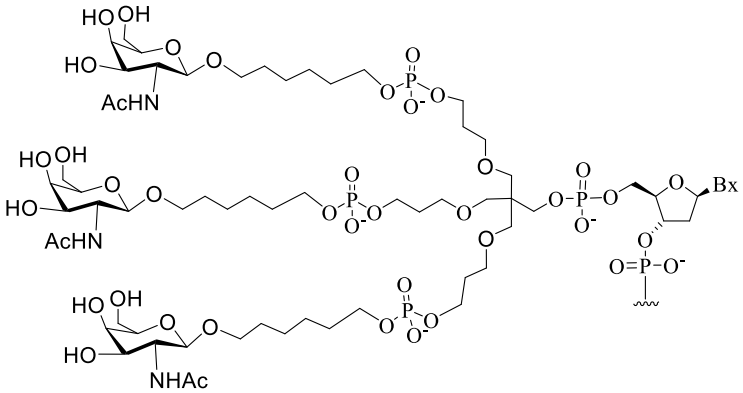
Exemplo 37: Método geral para a preparação do composto oligomérico conjugado 82 compreendendo um conjugado GalNAc$_3$-2 ligado ao fosfodiéster no terminal 5 ' *via* suporte sólido (Método I)


DMTO
Bx
NC
OLIGO
VIMAD
CN
79b
1. DCA, DCM
2. DCI, NMI, ACN
Fosforamidita 56
DNA/RNA
Sintetizador automatizado
ODMT
80
X = S- ou O-
Bx = base heterocíclica
1. Revestimento (Ac2O, NMI, pyr)
2. t-BuOOH
3. DCA, DCM
4. DCI, NMI, ACN
Fosforamidita 60
AcO
OAc
AcHN
NHAc
81
1. Revestimento (Ac2O, NMI, pyr)
2. t-BuOOH
3. 20% Et2NHem tolueno (v/v)
4. NH4, 55 °C,

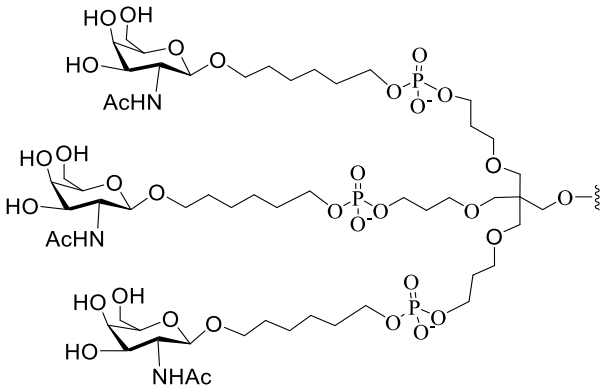


82

onde GalNAc GalNAc$_3$-2 tem a estrutura:



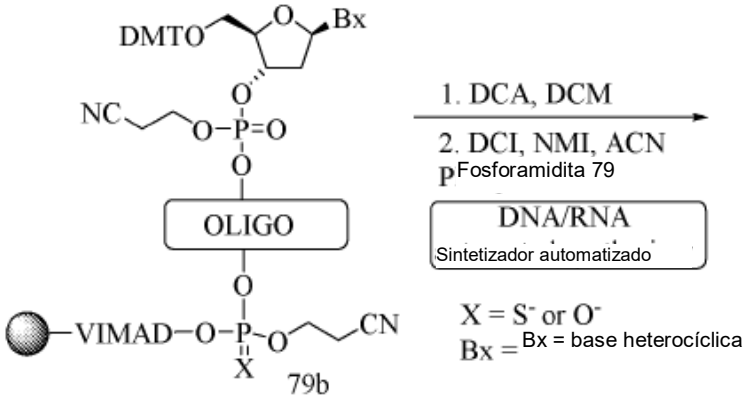
[00935] A parte do agrupamento de GalNAc$_3$ do grupo de conjugado GalNAc$_3$-2 (GalNAc$_3$-2$_a$) pode ser combinado com qualquer porção clivável para fornecer uma variedade de grupos conjugados. em que GalNAc$_3$-2$_a$ possui a fórmula:

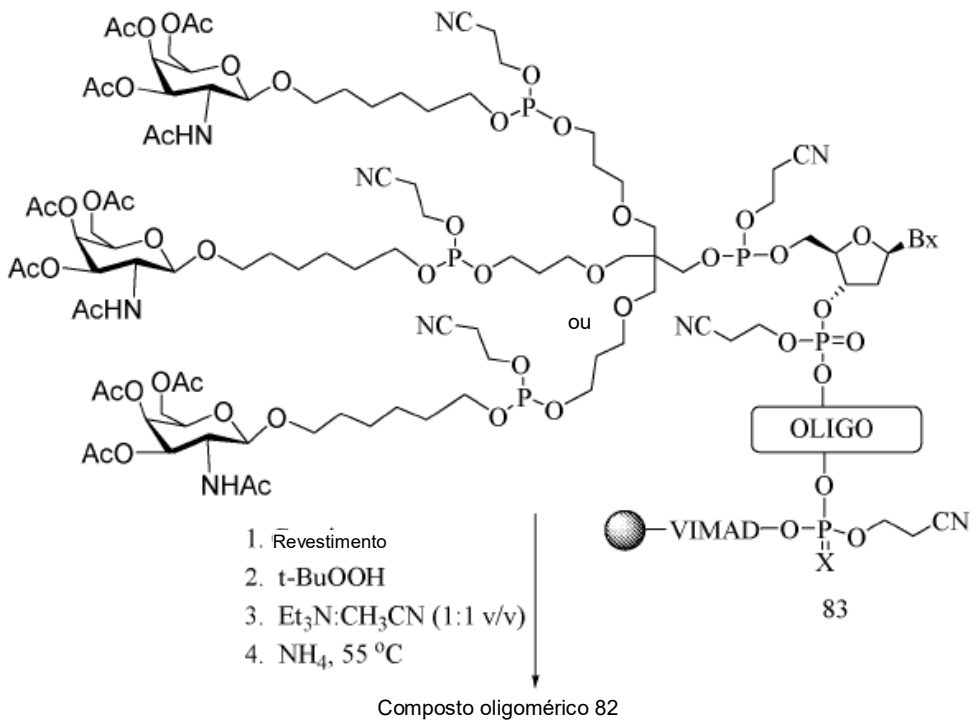


[00936] Composto oligomérico ligado ao VIMAD 79b foi preparado

utilizando procedimentos padrão para síntese de DNA/RNA automatizado (ver Dupouy *et al., Angew. Chem. Int. Ed.,* 2006, *45,* 3623-3627). Os compostos de fosforamidita 56 e 60 foram preparados de acordo com os procedimentos ilustrados nos Exemplos 27 e 28, respectivamente. As fosforamiditas ilustradas pretendem ser representativas e não pretendem ser limitantes como outros blocos de construção de fosforamiditas, incluindo, entre outros, aquelas apresentadas na especificação aqui contida podem ser usadas para preparar compostos oligoméricos com um grupo de conjugado ligado do fosfodiéster no terminal 5'. A ordem e quantidade de fosforamiditas adicionadas ao suporte sólido podem ser ajustadas para preparar compostos oligoméricos descritos aqui com qualquer sequência ou composição predeterminada.

Exemplo 38: Método alternativo para a preparação do composto oligomérico 82 compreendendo um conjugado GalNAc$_3$-2 ligado ao fosfodiéster no terminal 5' (Método II)

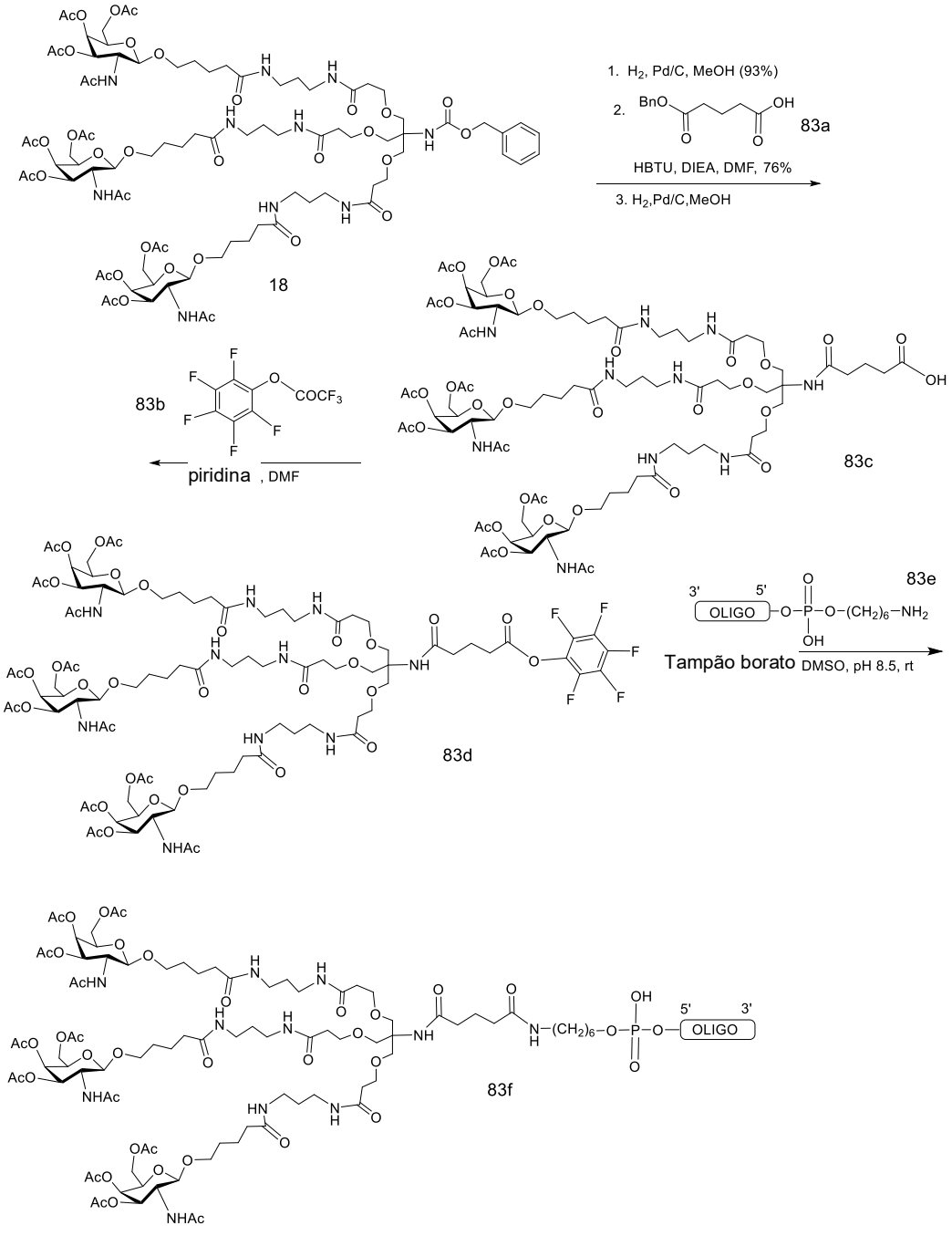


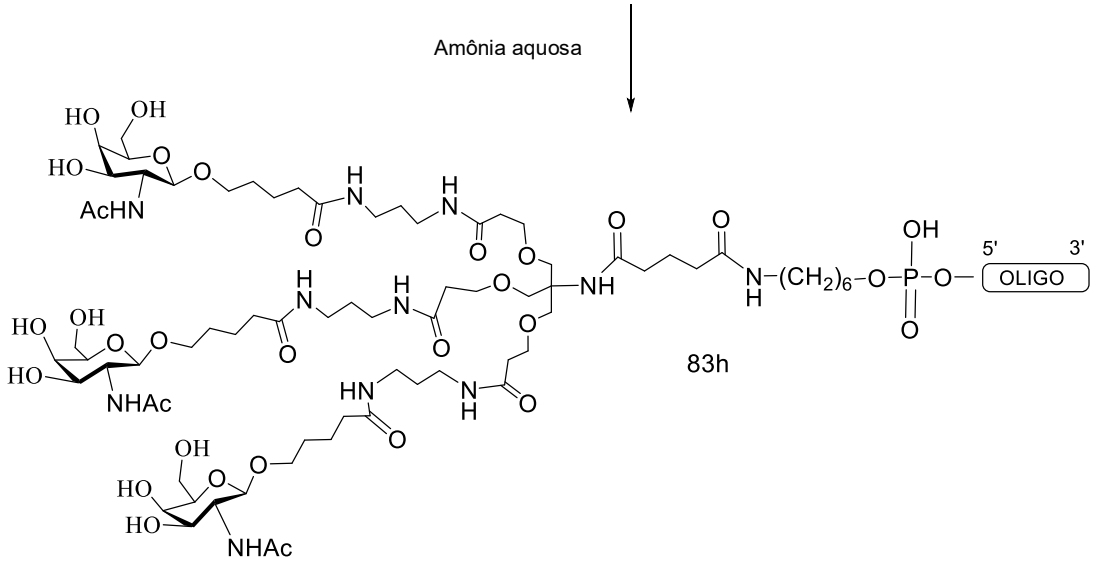


[00937] Composto oligomérico ligado ao VIMAD 79b foi preparado utilizando procedimentos padrão para síntese de DNA/RNA automatizado (ver Dupouy *et al., Angew. Chem. Int. Ed.,* 2006, *45,* 3623-3627). Fosforamidita do agrupamento $GalNAc_3$-2, Composto 79 foi preparado de acordo com os procedimentos ilustrados no Exemplo 35. Este método alternativo permite uma instalação de uma etapa do do conjugado $GalNAc_3$-2 ligado ao fosfodiéster para o composto oligomérico na etapa final da síntese. As fosforamiditas ilustradas pretendem ser representativas e não pretendem ser limitantes como outros blocos de construção de fosforamiditas, incluindo, entre outros, aquelas apresentadas na especificação aqui contida podem ser usadas para preparar compostos oligoméricos com um grupo de conjugado ligado do fosfodiéster no terminal 5'. A ordem e quantidade de fosforamiditas adicionadas ao suporte sólido podem ser ajustadas para preparar compostos oligoméricos descritos aqui com qualquer sequência ou composição predeterminada.

Exemplo 39: Método geral para a preparação de composto oligomérico de 83h compreendendo Conjugado $GalNAc_3$-3

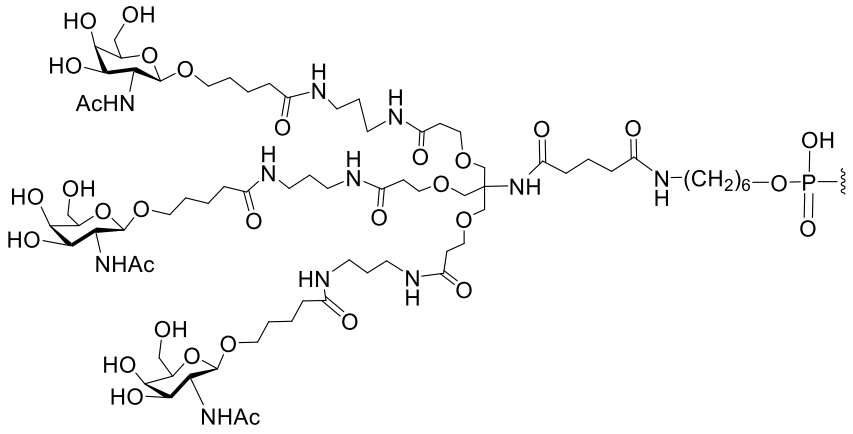
no Terminal 5' (GalNAc$_3$-1 modificado para anexação da extremidade 5') *via* Suporte Sólido





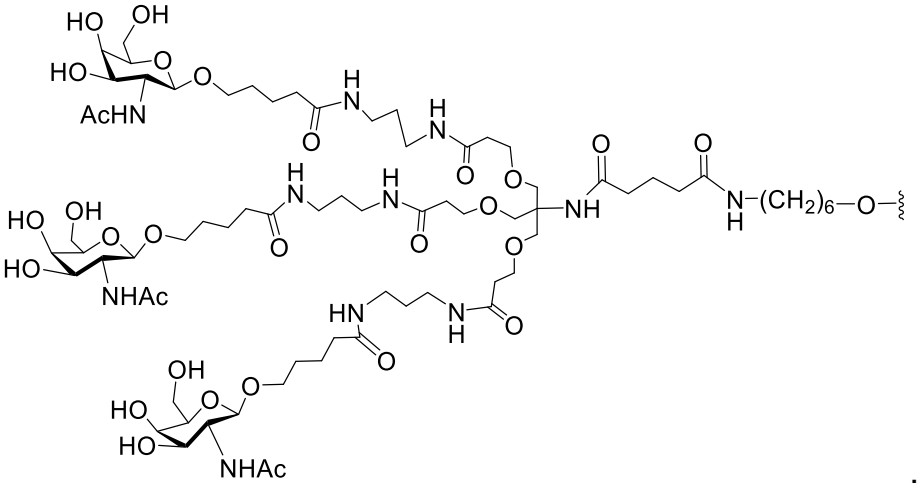
[00938] O composto 18 foi preparado de acordo com os procedimentos ilustrados no Exemplo 4. Os compostos 83a e 83b estão disponíveis comercialmente. O composto oligomérico 83e, compreendendo uma hexilamina ligada ao fosfodiéster foi preparada usando procedimentos de síntese de oligonucleotídeo padrão. O tratamento do composto oligomérico protegido com amônia aquosa forneceu composto oligomérico conjugado 5'-GalNAc$_3$(83h).

[00939] Onde GalNAc$_3$-3 tem a estrutura:

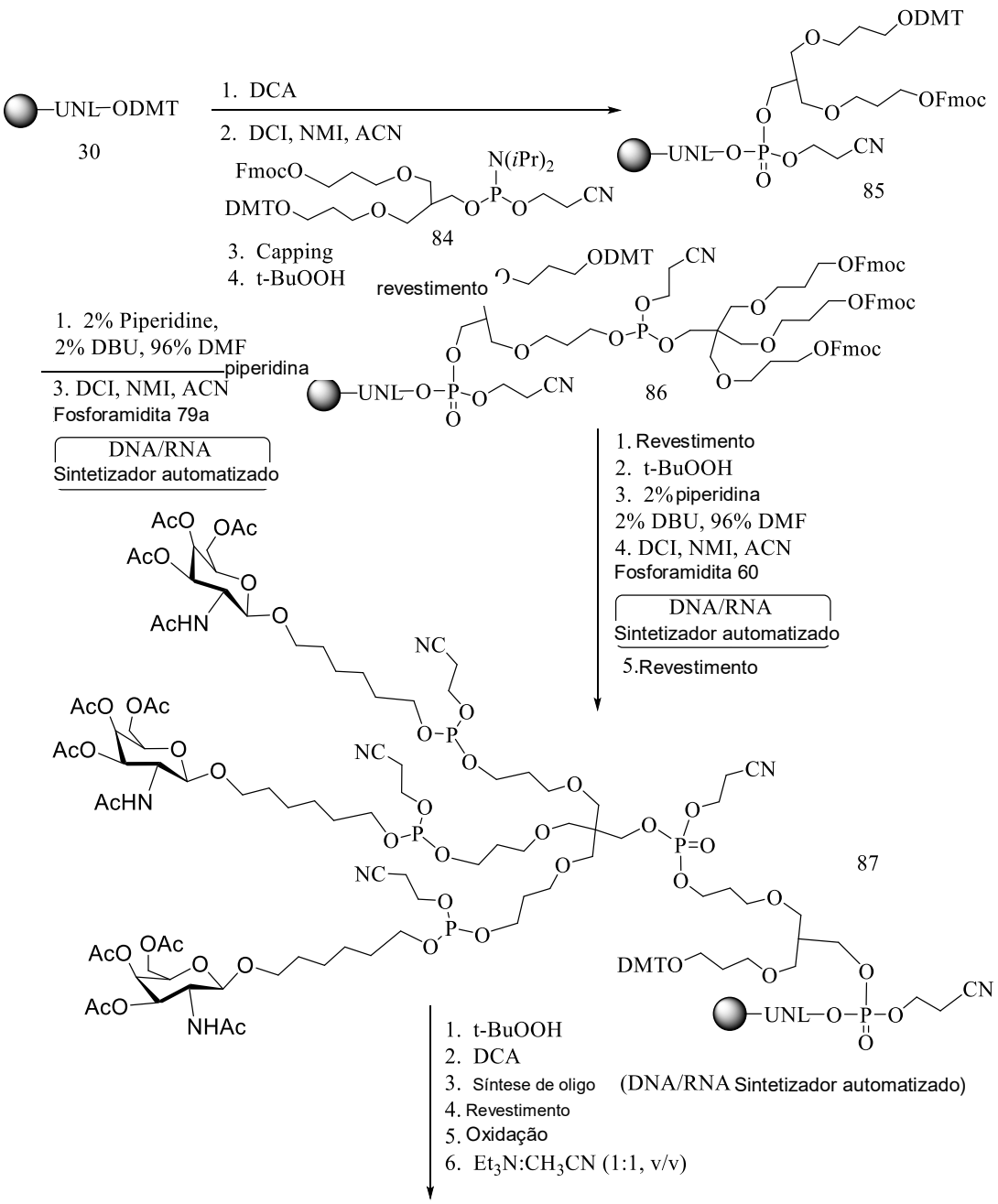


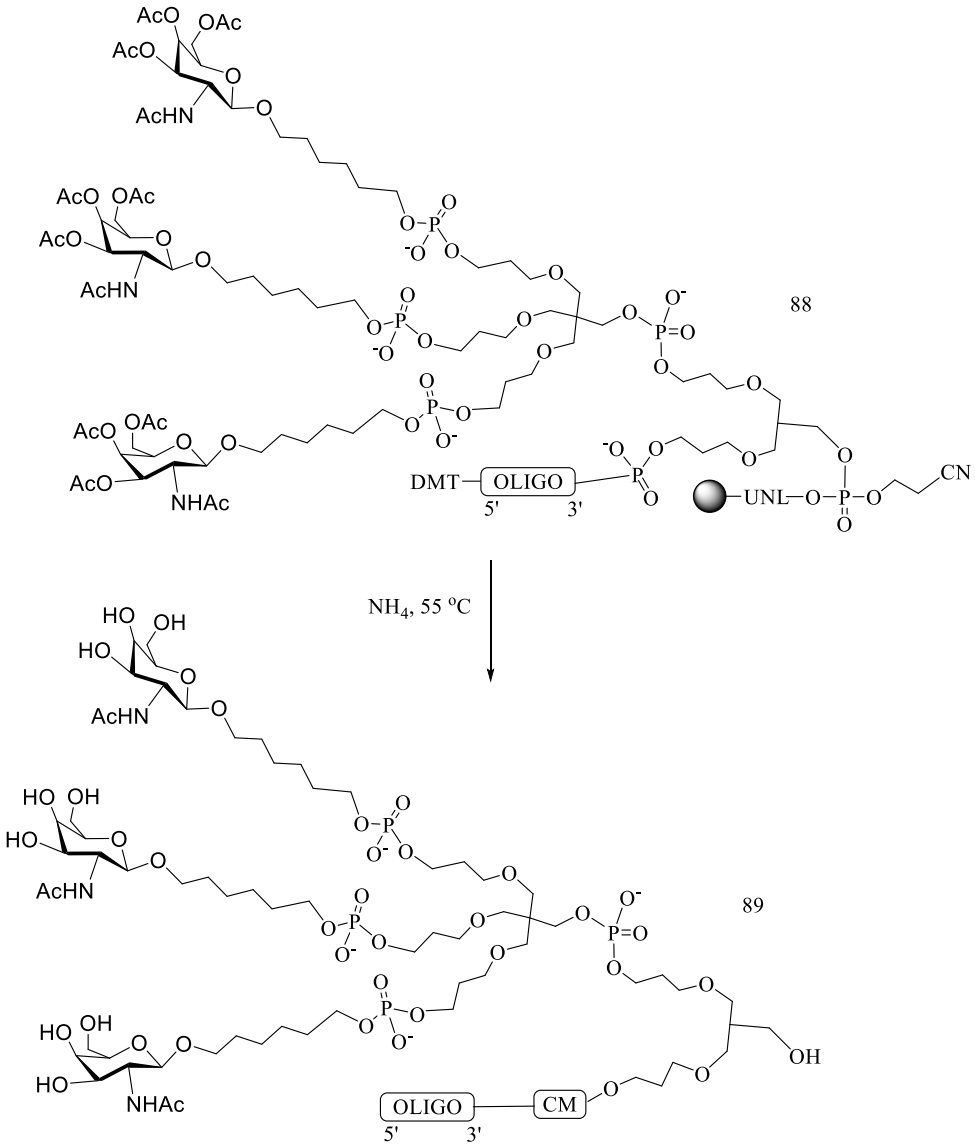
.

[00940] A parte do agrupamento de GalNAc$_3$ do grupo de conjugado GalNAc$_3$-3 (GalNAc$_3$-3$_a$) pode ser combinado com qualquer porção clivável para fornecer uma variedade de grupos conjugados. em que GalNAc$_3$-3$_a$ possui a fórmula:

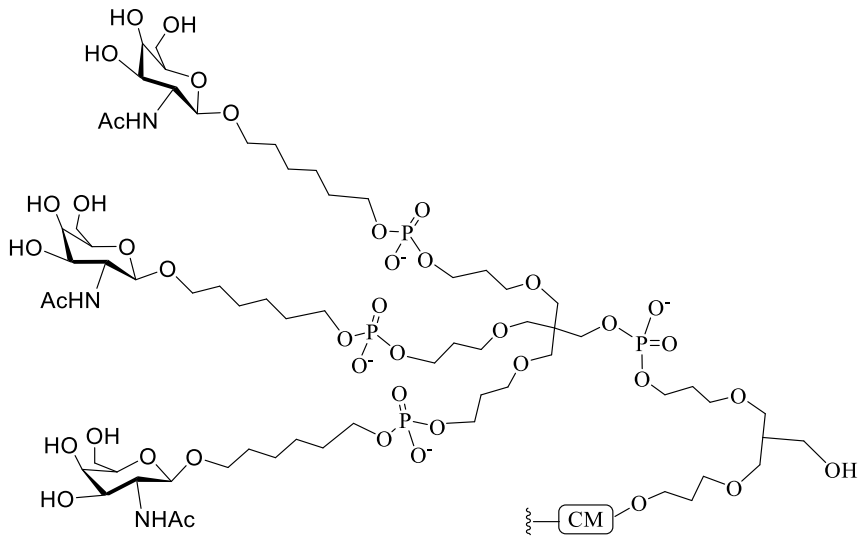


Exemplo 40: Método geral para a preparação do composto oligomérico conjugado 89 compreendendo um conjugado GalNAc$_3$-4 ligado ao fosfodiéster no terminal 3' *via* suporte sólido

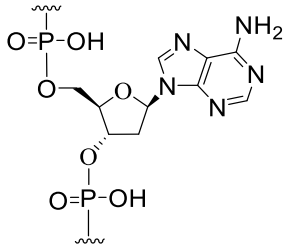

UNL–ODMT
30
1. DCA
2. DCI, NMI, ACN
FmocO
DMTO
N(iPr)2
CN
84
UNL–O–P–O–CN
85
3. Capping
4. t-BuOOH
revestimento
ODMT
OFmoc
86
1. 2% Piperidine,
2% DBU, 96% DMF
piperidina
3. DCI, NMI, ACN
Fosforamidita 79a
DNA/RNA
Sintetizador automatizado
1. Revestimento
2. t-BuOOH
3. 2% piperidina
2% DBU, 96% DMF
4. DCI, NMI, ACN
Fosforamidita 60
DNA/RNA
Sintetizador automatizado
5.Revestimento
AcO
OAc
AcHN
NHAc
NC
87
1. t-BuOOH
2. DCA
3. Síntese de oligo
4. Revestimento
5. Oxidação
6. Et3N:CH3CN (1:1, v/v)
(DNA/RNA Sintetizador automatizado)



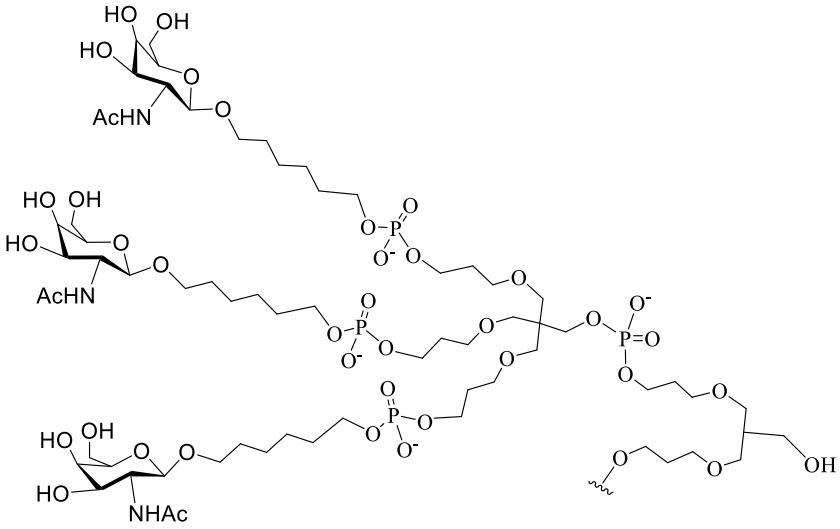
[00941] Onde GalNAc3-4 tem a estrutura:



[00942] Onde CM é uma porção clivável. Em determinadas modalidades, a porção clivável é:



[00943] A parte do agrupamento de $GalNAc_3$ do grupo de conjugado $GalNAc_3$-4 ($GalNAc_3$-4_a) pode ser combinado com qualquer porção clivável para fornecer uma variedade de grupos conjugados. em que $GalNAc_3$-4_a possui a fórmula:



[00944] O Composto 30 do suporte sólido funcionalizado do Unylinker 30 protegido está comercialmente disponível. O Composto 84 é preparado usando procedimentos semelhantes aos relatados na literatura (*ver* SShchepinov *et al., Nucleic Acids Research,* 1997, *25(22)*,4447-4454; Shchepinov *et al., Nucleic Acids Research,* 1999, *27*, 3035-3041; e Hornet *et al., Nucleic Acids Research,* 1997, *25*,4842-4849).

[00945] Os blocos de construção de fosforamidita, Compostos 60 e 79a são preparados de acordo com os procedimentos ilustrados nos Exemplos 28 e 36. As fosforamiditas ilustradas pretendem ser representativas e não pretendem ser limitantes como outros blocos de constru-

ção de fosforamiditas podem ser utilizados para preparar compostos oligoméricos com um conjugado ligado ao fosfodiéster no terminal 3' com uma sequência e composição predeterminadas. A ordem e quantidade de fosforamiditas adicionadas ao suporte sólido podem ser ajustadas para preparar compostos oligoméricos descritos aqui com qualquer sequência ou composição predeterminada.

Exemplo 41: Método geral para a preparação de ASOs compreendendo um conjugado GalNAc$_3$-2 ligado ao fosfodiéster (ver Exemplo 37, Bx é adenina) na posição 5' *via* técnicas de fase sólida (preparação de ISIS 661134)

[00946] Salvo indicação em contrário, todos os reagentes e soluções utilizadas para a síntese dos compostos oligoméricos são adquiridas de fontes comerciais. Blocos de construção de fosforamidita padrão e suporte sólido são usados para a incorporação de resíduos de nucleosídeos que incluem, por exemplo, T, A, G, e ^{m}Resíduos C. Compostos de fosforamidita 56 e 60 foram utilizados para sintetizar o conjugado GalNAc$_3$-2 ligado ao fosfodiéster no terminal 5'. Uma solução de fosforamidita a 0,1 M em anidro acetonitrila foi utilizada para β -D-2'-desoxinbonucleosídeo e 2'-MOE.

[00947] As sínteses ASO foram realizadas em sintetizador ABI 394 (escala de 1-2 µmol) ou em sintetizador oligopiloto GE Healthcare Bioscience ÄKTA (escala de 40-200 µmol) pelo método de acoplamento de fosforamidita em suporte sólido VIMAD (110 µmol/g, Guzaev *et al.*, 2003) empacotada na coluna. Para a etapa de acoplamento, as fosforamiditas foram entregues 4 vezes em excesso sobre a carga sobre a carga inicial do suporte sólido e acoplamento da fosforamidita foi realizada por 10 min. Todas as outras etapas seguiram os protocolos padrão fornecidos pelo fabricante. Uma solução de ácido dicloroacético a 6% em tolueno foi utilizada para remover o grupo de dimetoxitritila (DMT) dos grupos 5'-hidroxila do nucleotídeo. 4,5-Dicianoimidazol (0,7 M) em

anidro CH_3CN foi usado como ativador passo durante a etapa de acoplamento. As ligações de fosforotioato foram introduzidas por sulfurização com solução a 0,1 M de hidreto de xantano em piridina/CH_3CN 1:1 para um tempo de contato de 3 minutos. Uma solução de 20% *terc*-butil hidroperóxido em CH_3CN contendo 6% de água foi utilizada como um agente oxidante para prover ligações internucleosídeas de fosfodiéster com um tempo de contato de 12 minutos.

[00948] Depois da sequência desejada ter sido montada, os grupos protetores de cianoetil fosfato foram desprotegidos usando uma dietilamina a 20% em tolueno (v/v) com um tempo de contato de 45 minutos. ASOs de ligação de suporte sólido foram suspensos em amônia aquosa (28-30% em peso) e aquecidos a a 55 °C por 6 h.

[00949] Os ASOs não ligados foram então filtrados e a amônia foi fervida. O resíduo foi purificado por cromatografia líquida de alta pressão numa coluna de troca aniônica forte (GE Healthcare Bioscience, Fonte 30Q, 30 µm, com 2,54 x 8 cm, A = 100 mM acetato de amônia em 30% de CH_3CN aquoso, B = 1,5 M de NaBr, em A, 0-40% de B em 60 min, fluxo 14 mL min-1, λ = 260 nm). O resíduo foi dessalinizado por HPLC numa coluna de fase inversa para produzir ASOs desejados com um rendimento isolado de 15-30% com base na carga inicial sobre o suporte sólido. ASOs foram caracterizados pela análise MS acoplado íon-par-HPLC com sistema Agilent 1100 MSD.

Tabela 34

ASO compreendendo um conjugado $GalNAc_3$-2 ligado ao fosfodiéster na posição 5' direcionando SRB-1

ISIS No.	Sequência (5' para 3')	Massa de CalCd	Massa Observada	SEQ ID Nº
661134	**$GalNAc_3$-2_{a}-$_{o}$'A_{do}**$T_{ks}{}^{m}C_{ks}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}$ G_{ds} $A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ks}{}^{m}C_{k}$	6482,2	6481,6	250

[00950] Subscritos: "e" indicam nucleosídeo 2'-MOE modificado; "d" indica β-D-2'-desoxirribonucleosídeo; "k" indica nucleosídeo bicíclico 6'-*(S)*-CH_3 (por exemplo, cEt); "s" indica ligações internucleosídeas de fosforotioato (PS); "o" indica ligações internucleosídeas de fosfodiéster

(PO); e "o" indica -O-P(=O)(OH)-. Sobrescrito "m" indica 5-metilcitosinas. A estrutura de $GalNAc_3$-2_{um} é mostrada no Exemplo 37.

Exemplo 42: Método geral para a preparação de ASOs compreendendo conjugado GalNAc3-3 na posição 5' por meio de técnicas em fase sólida (preparação de ISIS 661166)

[00951] A síntese para ISIS 661.166 foi realizada usando procedimentos semelhantes ilustrados nos Exemplos 39 e 41.

[00952] ISIS 661166 é um gapmer 5-10-5 MOE, em que a posição 5' compreende um conjugado $GalNAc_3$-3. ASO foi caracterizado pela análise MS acoplado íon-par-HPLC com sistema Agilent 1100 MSD.

Tabela 34a

ASO compreendendo um conjugado $GalNAc_3$-3 na posição 5' via ligação de fosfodiéster hexilamino direcionando Malat-1

ISIS No.	Sequência (5' para 3')	Conjugado	Massa calculada	Massa Observada	SEQ ID Nº
661166	5'-**$GalNAc_3$-3_{a-o}**'$^{m}C_{es}G_{es}G_{es}T_{es}G_{es}{}^{m}C_{ds}A_{ds}A_{ds}G_{ds}$ $G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}G_{ds}G_{es}A_{es}A_{es}T_{es}T_{e}$	5'-$GalNAc_3$-3	8992,16	8990,51	251

[00953] Subscritos: "e" indica o nucleosídeo 2'-MOE modificado; "d" indica o β-D-2'-desoxirribonucleosídeo; "s" indica as ligações internucleosídeos de fosforotioato (PS); "o" indica as ligações internucleosídeos de fosfodiéster (PO); e "o'" indica -O-P(=O)(OH)-. O subscrito "m" indica 5-metilcitosinas. A estrutura de "5'-$GalNAc_3$-3a" é mostrada no Exemplo 39.

Exemplo 43: Estudo dependente de dose de $GalNAc_3$-2 ligado a fosfodiéster (ver os exemplos 37 e 41, Bx é adenina)no terminal 5' que direciona o SRB-1 *in vivo*.

[00954] ISIS 661134 (ver o Exemplo 41) que compreende um conjugado $GalNAc_3$-2 ligado a fosfodiéster no terminal 5' fio testado em um estudo dependente de dose para a inbição antissenso de SRB-1 em camundongos. O ISIS 440762 e 651900 não conjugados ($GalNAc_3$-1 conjugado no terminal 3', ver o Exemplo 9) foram incluídos no estudo para comparação e são descritos anteriormente na Tabela 17.

[00955] Tratamento

[00956] Camundongos Balb/c machos de seis semanas de idade (Laboratório Jackson, Bar Harbor, ME) foram injetados por via subcutânea uma vez na dosagem mostrada abaixo com ISIS 440762, 651900 ou com controle tratado com PBS. Cada grupo de tratamento consistiu em 4 animais. Os camundongos foram sacrificados 72 horas após a administração final para determinar os níveis de mRNA de SRB-1 no fígado usando PCR em tempo real e reagente de quantificação de RNA RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) de acordo com protocolos padrão. Os níveis de mRNA de SRB-1 foram determinados em relação ao RNA total (usando Ribogreen), antes da normalização para controle tratado com PBS. Os resultados abaixo são apresentados como a média percentual dos níveis de mRNA de SRB-1 para cada grupo de tratamento, normalizado para o controle tratado com PBS e é indicado como "% PBS". Os ED_{50}s foram medidos usando métodos semelhantes, conforme descrito anteriormente e são apresentados a seguir.

[00957] Conforme ilustrado na Tabela 35, o tratamento com oligonucleotídeos antissenso reduziu os níveis de mRNA de SRB-1 de uma forma dependente da dose. De fato, os oligonucleotídeos antissenso que compreendem os conjugados de GalNAc3-2 ligados ao fosfodiéster no terminal 35 (ISIS 661134) ou o conjugado de GalNAc3-1 ligado no teminal 3’ (ISIS 6519005) mostraram melhora substancial de potência em comparação ao oligonucleotídeo antissenso não conjugado (ISIS 440762). Além disso, ISIS 661134, que compreende o conjugado $GalNA_{3<}2$ ligado ao fosfodiéster no terminal 5’ foi equipotente em comparação ao ISIS 651900, que compreende o conjugado de $GalNAc_3$-1 no terminal 3’.

Tabela 35

ASOs contendo $GalNAc_3$-1 ou $GalNAc_3$-2 direcionando SRB-1

ISIS No.	Dosagem	níveis de mRNA de	ED_{50} (mg/kg)	Conjugado	SEQ ID Nº

	(mg/kg)	SRB-1 (% PBS)			
PBS	0	100	--	--	
440762	0,2	116	2,58	Nenhum conjugado	250
	0,7	91			
	2	69			
	7	22			
	20	5			
651900	0,07	95	0,26	3' $GalNAc_3$-1	247
	0,2	77			
	0,7	28			
	2	11			
	7	8			
661134	0,07	107	0,25	5' $GalNAc_3$-2	250
	0,2	86			
	0,7	28			
	2	10			
	7	6			

As estruturas para 3' $GalNAc_3$-1 e 5' $GalNAc_3$-2 foram descritas anteriormente nos Exemplos 9 e 37.

Análise Farmacocinética (PK)

[00958] A PK dos ASOs do grupo de dose alta (7 mg/kg) foi examinada e avaliada da mesma forma como ilustrado no Exemplo 20. A amostra de fígado foi cortada e extraída usando protocolos padrão. O comprimento total dos metabólitos de 661134 (5' $GalNAc_3$-2) e ISIS 651900 (3' $GalNAc_3$-1) foram identificados e suas massas foram confirmadas por análise de espectrometria de massa de alta resolução. Os resultados mostraram que o maior metabólito detectado para o ASO compreendendo um conjugado de $GalNAc_3$-2 ligado ao fosfodiéster no terminal 5' (ISIS 661134) foi ISIS 440762 (dados não mostrados). Nenhum metabólito adicional, num nível detectável, foi observado. Ao contrário de sua contraparte, os metabólitos adicionais semelhantes àqueles relatados anteriormente na Tabela 23a foram observados para o ASO endo o conjugado de $GalNAc_3$-1 no terminal 3' (ISIS 651900). Esses resultados sugerem que ter o conjugado de $GalNAc_3$-1 ou $GalNAc_3$-2 pode melhorar o perfil da PK dos ASOs sem comprometer sua potência.

Exemplo 44: Efeito de ligações de PO/PS na inibição antissenso de ASOs compreendendo o conjugado de $GalNAc_3$-1 (ver o Exemplo

9) no terminal 3’ que se direciona ao SRB-1

[00959] ISIS 655861 e 655862 compreendendo um conjugado de $GalNAc_3$-1 no terminal 3’, cada um se direcionando ao SRB-1, foram testados num estudo de administração única para sua capacidade em inibir o SRB-1 em camundongos. O composto não conjugado de origem, ISIS 353382 foi incluído no estudo para comparação.

[00960] Os ASOs são gapmeros 5-10-5 MOE, em que a região de lacuna compreende dez 2’-desoxirribonucleosídeos e cada região de asa compreende cinco nucleosídeos 2’-MOE modificados. Os ASOs foram preparados usando métodos semelhantes conforme ilustrado anteriormente no Exemplo 19 e são descritos na Tabela 36 abaixo.

Tabela 36

Os ASOs modificados compreendendo o conjugado de $GalNAc_3$-1 no terminal 3’ direcionando ao SRB-1

ISIS No.	Sequência (5' para 3')	Química	SEQ ID Nº
353382 (de origem)	$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	Nenhum conjugado de PS completo	252
655861	$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{eo}$**$A_{do'}$-GalNAc$_3-1_a$**	PS total com conjugado de **$GalNAc_3$-1**	253
655862	$G_{es}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{eo}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{eo}{}^{m}C_{eo}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{eo}$**$A_{do'}$-GalNAc$_3-1_a$**	PS/PO misto com conjugado de**$GalNAc_3$-1**	253

Subscritos: "e" indica o nucleosídeo 2’-MOE modificado; "d" indica o β-D-2’-desoxirribonucleosídeo; "s" indica as ligações internucleosídeos de fosforotioato (PS); "o" indica as ligações internucleosídeos de fosfodiéster (PO); e "o’" indica -O-P(=O)(OH)-. O subscrito "m" indica 5-metilcitosinas. A estrutura de "$GalNAc_3$-1" é mostrada no Exemplo 9.

Tratamento

[00961] Camundongos Balb/c machos de seis semanas de idade (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) foram injetados por via subcutânea uma vez na dosagem mostrada abaixo com ISIS 353382, 655861, 655862 ou com controle tratado com PBS. Cada grupo de tratamento consistiu em 4 animais. Antes do tratamento, bem como após a última dose, o sangue foi retirado de cada camundongo e as amostras de plasma foram analisadas. Os camundongos foram sacrificados 72 horas

após a administração final para determinar os níveis de mRNA de SRB-1 no fígado usando PCR em tempo real e reagente de quantificação de RNA RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) de acordo com protocolos padrão. Os níveis de mRNA de SRB-1 foram determinados em relação ao RNA total (usando Ribogreen), antes da normalização para controle tratado com PBS. Os resultados abaixo são apresentados como a média percentual dos níveis de mRNA de SRB-1 para cada grupo de tratamento, normalizado para o controle tratado com PBS e é indicado como "% PBS". Os ED_{50}s foram medidos usando métodos semelhantes, conforme descrito anteriormente e são apresentados a seguir.

[00962] Conforme ilustrado na Tabela 37, o tratamento com oligonucleotídeos antissenso reduziu os níveis de mRNA de SRB-1 de uma forma dependente de dose em comparação ao controle tratado com PBS. De fato, os oligonucleotídeos antissenso que compreendem o conjugado de $GalNAc_3$-1 no terminal 3' (ISIS 655861 e 655862) mostraram melhora substancial de potência em comparação ao oligonucleotídeo antissenso não conjugado (ISIS 353382). Além disso, o ISIS 655862 com ligações de PS/PO mistas mostrou uma melhora na potência em relação ao PS completo (ISIS 655861).

Tabela 37

Efeito de ligações de PO/PS na inibição antissenso de ASOs compreendendo o conjugado $GalNAc_3$-1 no terminal 3' direcionando ao SRB-1

ISIS No.	Dosagem (mg/kg)	níveis de mRNA de SRB-1 (% PBS)	ED_{50} (mg/kg)	Química	SEQ ID Nº
PBS	0	100	--	--	
353382 (de origem)	3	76,65	10,4	PS completo sem conjugado	252
	10	52,40			
	30	24,95			
655861	0,5	81,22	2,2	PS total com conjugado de $GalNAc_3$-1	253
	1,5	63,51			
	5	24,61			
	15	14,80			
655862	0,5	69,57	1,3	PS/PO misto com conjugado de $GalNAc_3$-1	253
	1,5	45,78			

	5	19,70			
	15	12,90			

[00963] Os níveis de transaminase, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) hepáticas no soro foram medidos em relação aos camundongos injetados com salina usando protocolos padrão. Os pesos dos órgãos também foram avaliados. Os resultados demonstraram que não foi observada nenhuma elevação nos níveis de transaminase (Tabela 38) ou pesos dos órgãos (dados não mostrados) em camundongos tratados com ASOs em comparação ao controle com PBS. Além disso, o ASO com ligações de PS/PO mistas (ISIS 655862) mostraram níveis de transaminase semelhantes em comparação ao P completo (ISIS 655861).

Tabela 38

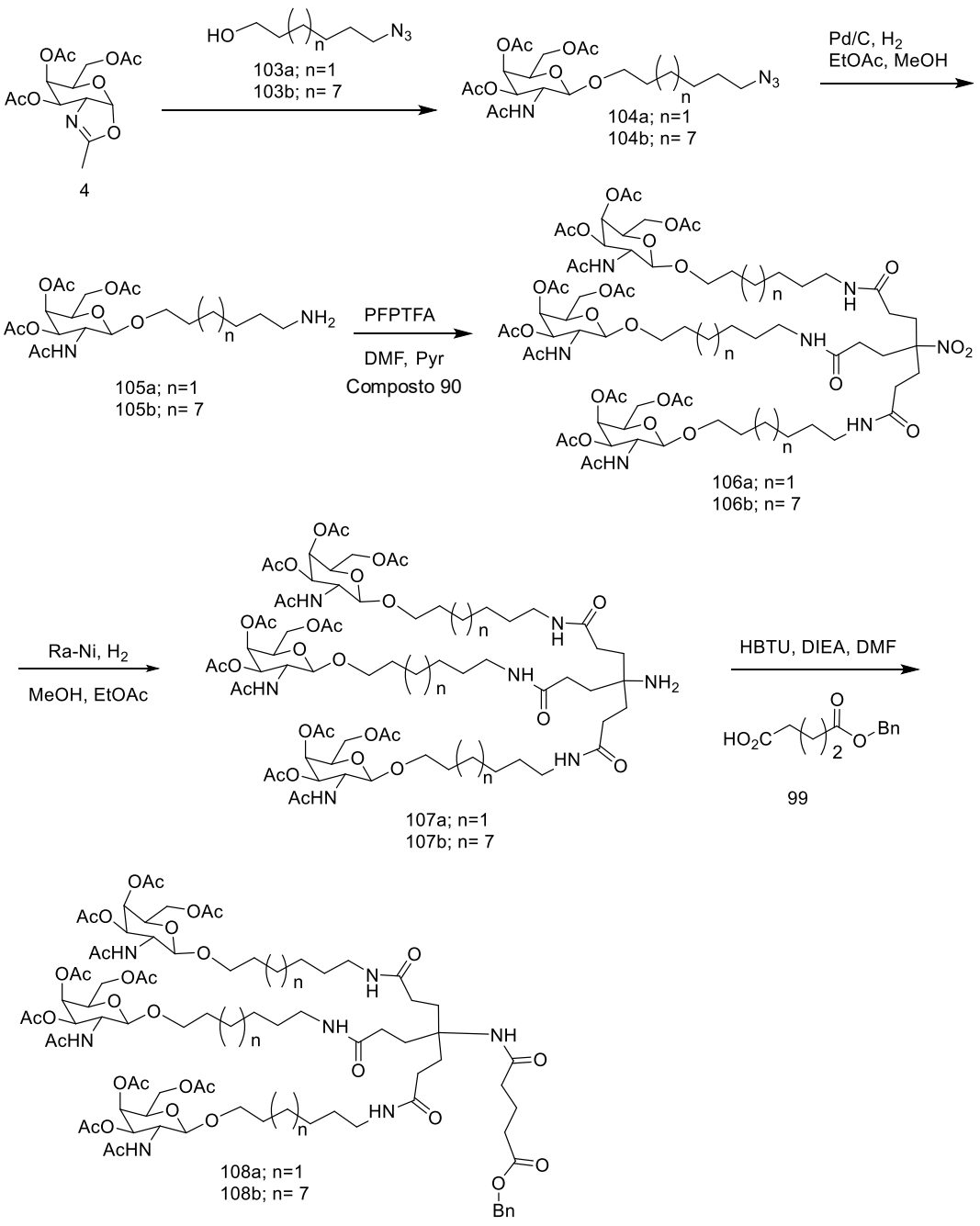
Efeito de ligações de PO/PS sobre os níveis de transaminase de ASOs compreendendo o conjugado $GalNAc_3$-1 no terminal 3' direcionando ao SRB-1

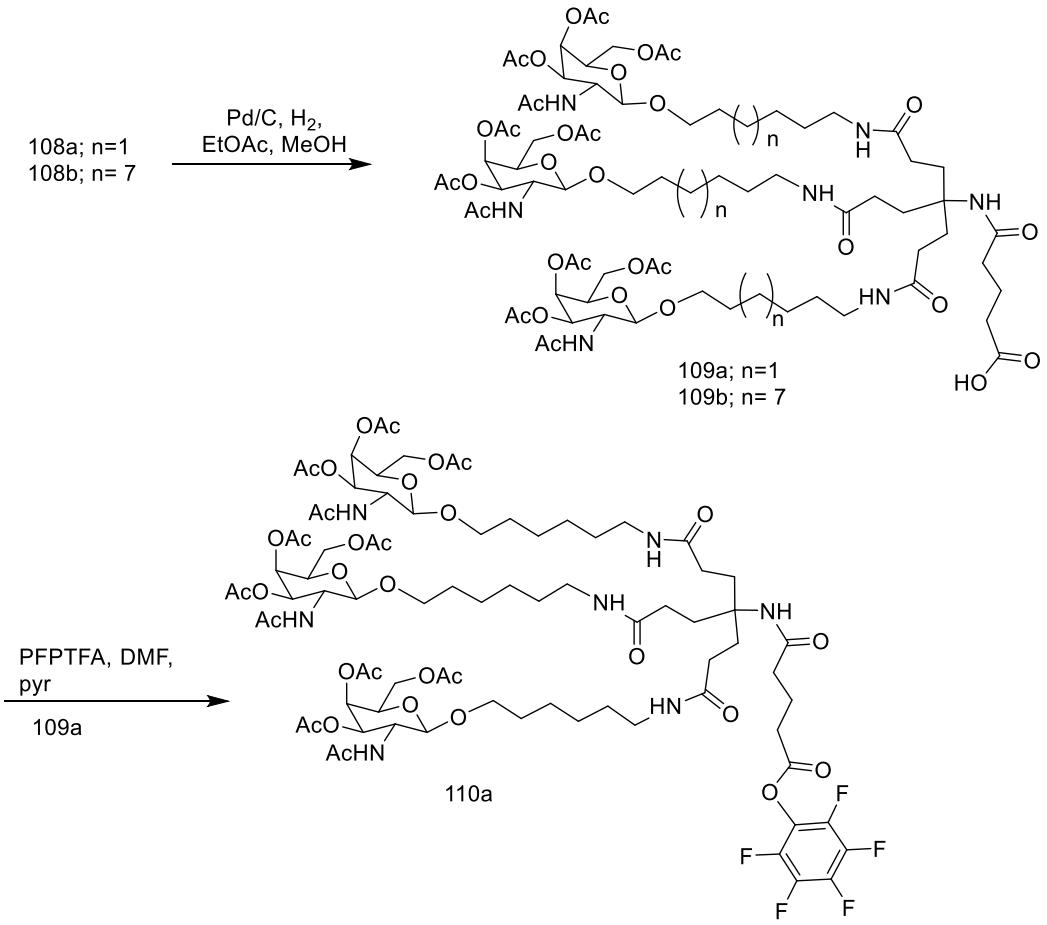
ISIS No.	Dosagem (mg/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)	Química	SEQ ID Nº.
PBS	0	28,5	65	--	
353382 (de origem)	3	50,25	89	PS completo sem conjugado	252
	10	27,5	79,3		
	30	27,3	97		

Continuação

655861	0,5	28	55,7	PS completo com **$GalNAc_3$-1**	253
	1,5	30	78		
	5	29	63,5		
	15	28,8	67,8		
655862	0,5	50	75,5	PS/PO misto com **$GalNAc_3$-1**	253
	1,5	21,7	58,5		
	5	29,3	69		
	15	22	61		

Exemplo 45: Preparação de Éster de PFP, Composto 110a


4
103a; n=1
103b; n= 7
104a; n=1
104b; n= 7
Pd/C, H2
EtOAc, MeOH
105a; n=1
105b; n= 7
PFPTFA
DMF, Pyr
Composto 90
106a; n=1
106b; n= 7
Ra-Ni, H2
MeOH, EtOAc
107a; n=1
107b; n= 7
HBTU, DIEA, DMF
99
108a; n=1
108b; n= 7



[00964] O composto 4 (9,5g, 28,8 mmoles) foi tratado com composto 103a ou 103b (38 mmoles), individualmente, e TMSOTf (0,5 eq.) e peneires moleculares em diclorometano (200 mL), a agitadas por 16 horas em temperatura ambiente. Nesse tempo, a camada orgânicas foi filtrada através de celite, em seguida lavada com bicarbonato de sódio, água e salmoura. A camada orgânica foi então separada e seca com sulfato de sódio, filtrada e reduzida sob pressão reduzida. O óleo resultante foi purificado por cromatografia em sílica-gel(2%-->10% metanol/diclorometano) para gerar os compostos 104a e 104b em >80% de rendimento. LCMS e RMN de prótons foram consistentes com a estrutura.

[00965] Os compostos 104a e 104b foram tratados nas mesmas condições como para os compostos 100a-d (Exemplo 47), para gerar os compostos 105a e 105b em >90% de rendimento. LCMS e RMN de prótons foram consistentes com a estrutura.

[00966] Os compostos 105a e 105b fora tratados, individualmente,

com o composto 90 sob as mesmas condições que os compostos 901a-d, para gerar os compostos 106a (80%) e 106b (20%). LCMS e RMN de prótons foram consistentes com a estrutura.

[00967] Os compostos 106a e 106b foram tratados nas mesmas condições que os compostos 96a-d (Exemplo 47), para gerar o 107a (60%) e 107b (20%). LCMS e RMN de prótons foram consistentes com a estrutura.

[00968] Os compostos 107a e 107b foram tratados nas mesmas condições que os compostos 97a-d (Exemplo 47), para gerar os compostos 108a e 108b em 40-60% de rendimento. LCMS e RMN de prótons foram consistentes com a estrutura.

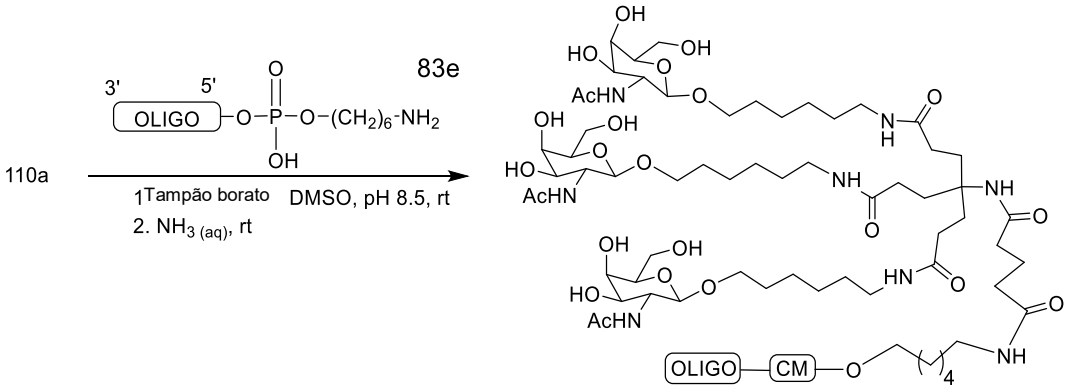
[00969] Os compostos 108a (60%) e 108b (40%) foram tratados nas mesmas condições para os compostos 100a-d (Exemplo 47), para gerar os compostos 109a e 109b em >80% de rendimento. LCMS e RMN de prótons foram consistentes com a estrutura.

[00970] O composto 109a foi tratado nas mesmas condições que os compostos 101a-d (Exemplo 47), para gerar o Composto 110a em 30-60% de rendimento. LCMS e RMN de prótons foram consistentes com a estrutura. Alternativamente, o Composto 110b pode ser preparado de forma semelhante, começando com o Composto 109b.

Exemplo 46: Procedimento Geral para Conjugação com Ésteres de PFP (Oligonucleotídeo 111); Preparação de ISIS 666881 ($GalNAc_3$-10)

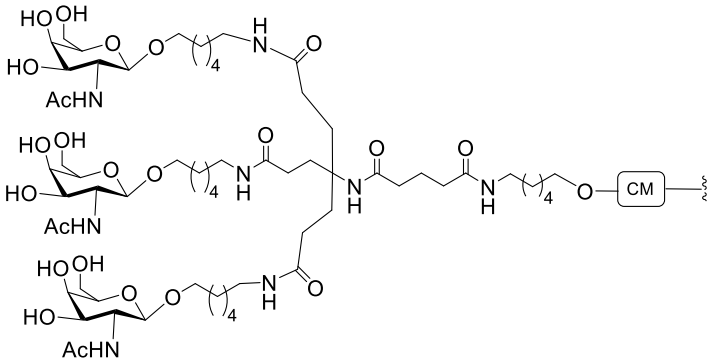
[00971] Um oligonucleotídeo modificado 5’-hexilamina foi sintetizado e purificado usando procedimentos de oligonucleotídeo de fase sólida padrão. O oligonucleotídeo modificado 5’-hexilamino foi dissolvido em tetraborato de sódio 0,1 M, pH 8,5 (200 µL) e 3 equivalentes de um cluster de $GalNAc_3$ esterificado com PFP selecionado dissolvido em DMSO (50 µL) foi adicionado. Se o éster de PFP precipitou após a adição na solução de ASO, DMSO foi adicionado até que todo o éster de PFP

estivesse na solução. A reação foi concluída após cerca de 16 h de mistura à temperatura ambiente. A solução resultante foi diluída com água a 12 mL e, em seguida, rotacionada em 3000 rpm em um filtro de rotação com um limite de massa de 3000 Da. Este processo foi repetido duas vezes para remover as impurezas de pequenas moléculas. A solução foi então liofilizada à secura e redissolvida em amônia aquosa concentrada e misturada à temperatura ambiente por 2,5 h seguido por concentração *in vacuo* para remover a maior parte da amônia. O oligonucleotídeo conjugado foi purificado e dessalinizado por RP-HPLC e liofilizado para fornecer o oligonucleotídeo conjugado a $GalNAc_3$.



111

[00972] O oligonucleotídeo 111 é conjugado com GalNAc3-10. A parte do agrupamento de $GalNAc_3$ do grupo de conjugado $GalNAc_3$-10 ($GalNAc_3$-10_a) pode ser combinado com qualquer porção clivável para fornecer uma variedade de grupos conjugados. Em determinadas modalidades, a porção clivável é -P(=O)(OH)-A_d-P(=O)(OH)- conforme mostrada no oligonucleotídeo (ISIS 666881) sintetizado com $GalNAc_3$-10 abaixo. A estrutura de $GalNAc_3$-10 ($GalNAc_3$-10_a-CM-) é mostrada abaixo:



[00973] Após este procedimento geral, o ISIS 666881 foi preparado. O oligonucleotídeo modificado 5'-hexilamino, ISIS 660254, foi sintetizado e purificado usando procedimentos de oligonucleotídeo de fase sólida padrão. O ISIS 660254 (40 mg, 5,2 μmol) foi dissolvido em tetraborato de sódio 0,1 M, pH 8,5 (200 μL) e 3 equivalentes, foi adicionado éster de PFP (Composto 110a) dissolvido em DMSO (50 μL). O éster de PFP precipitou após a adição na solução de ASO, exigindo DMSO adicional (600 μL) para dissolver completamente o éster de PFP. A reação foi concluída após cerca de 16 h de mistura à temperatura ambiente. A solução resultante foi diluída com água a 12 mL de volume total e rotacionada em 3000 rpm em um filtro de rotação com um limite de massa de 3000 Da. Este processo foi repetido duas vezes para remover as impurezas de pequenas moléculas. A solução foi liofilizada à secura e redissolvido em amônina aquosa concentrada com mistura à temperatura ambiente por 2,5 h seguido por concentração *ub vacuo* para remover a maior parte da amônia. O oligonucleotídeo conjugado foi purificado e dessalinizado por RP-HPLC e liofilizado para gerar o ISIS 666881 em 90% de rendimento em peso (42 mg, 4,7 μmol).

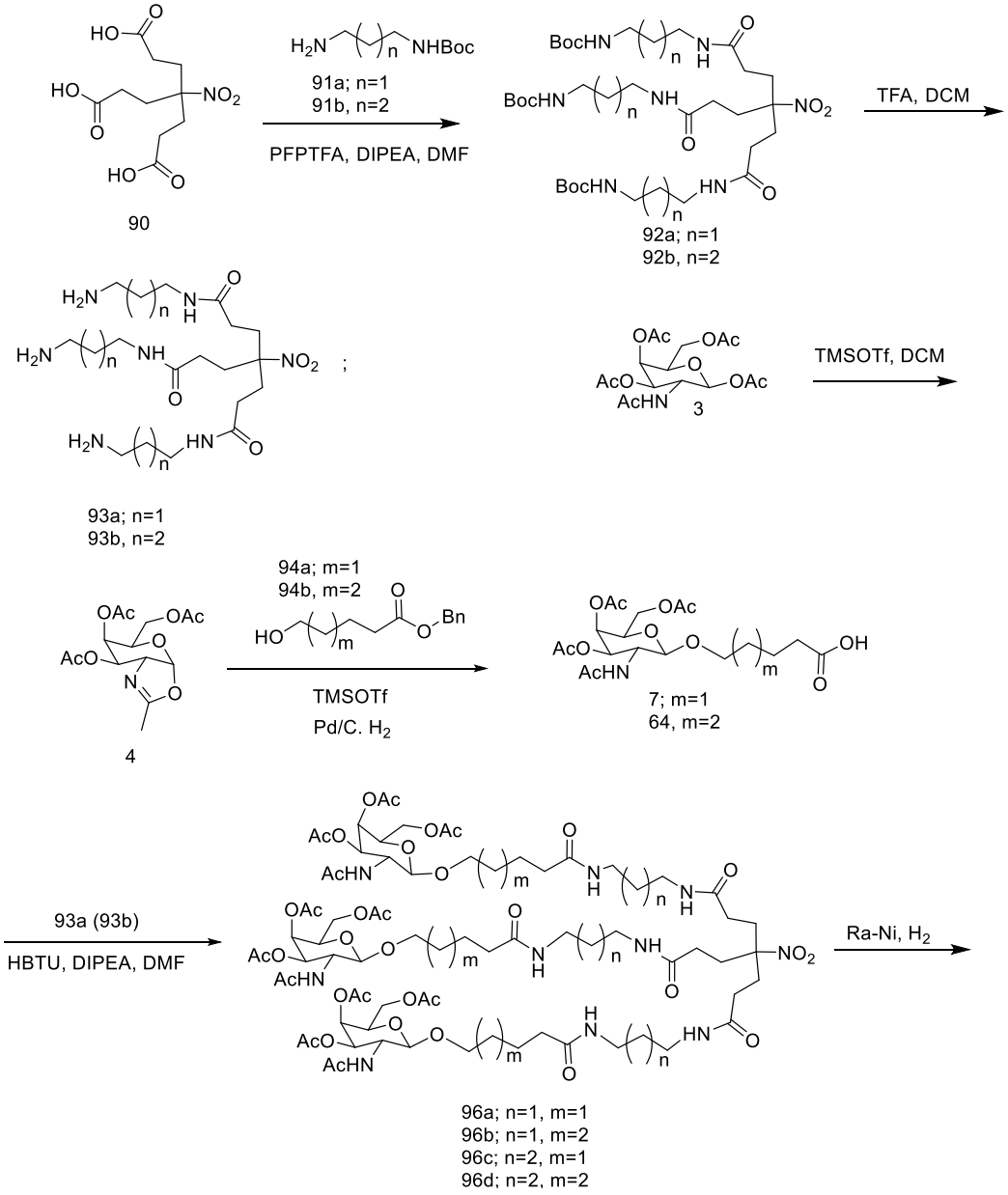
Oligonucleotídeo conjugado GalNAc$_3$-10

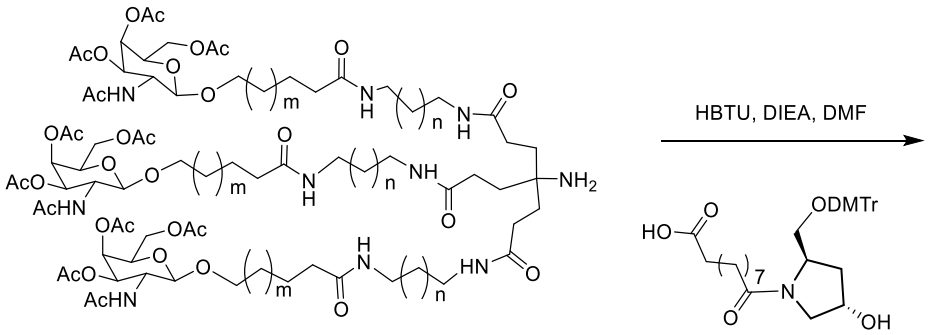
ASO	Sequência (5' para 3')	grupo 5'	SSEQ ID Nº
ISIS 660254	$NH_2(CH_2)_{6\text{-}o}A_{do}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}$ $^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	Hexilamina	254
ISIS 666881	**GalNAc$_3$-10$_{a\text{-}o'}$A$_{do}$**$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}$ $^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	GalNAc$_3$-10	254

[00974] Letras maiúsculas indicam a nucleobase para cada nucleo-

sídeo e ^{m}C indica uma 5-metilcitosina. Subscritos: "e" indica um nucleosídeo 2'-MOE modificado; "d" indica um β-D-2'-desoxirribonucleosídeo; "s" indica uma ligação internucleosídica fosforotioato (PS); "o" indica uma ligação internucleosídica fosfodiéster (PO); e "o'" indica -O-P(=O)(OH)-. Os grupos conjugados estão em negrito.

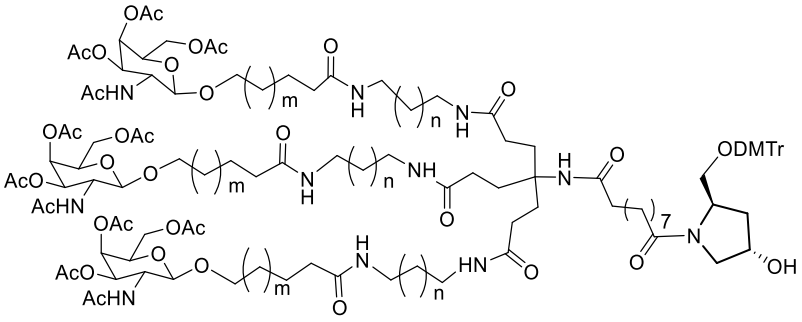
Exemplo 47: Preparação do Oligonucleotídeo 102 Compreendendo GalNAc$_3$-8



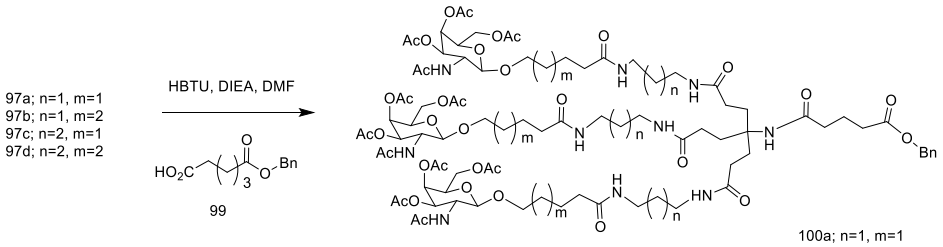


97a; n=1, m=1
97b; n=1, m=2
97c; n=2, m=1
97d; n=2, m=2

23

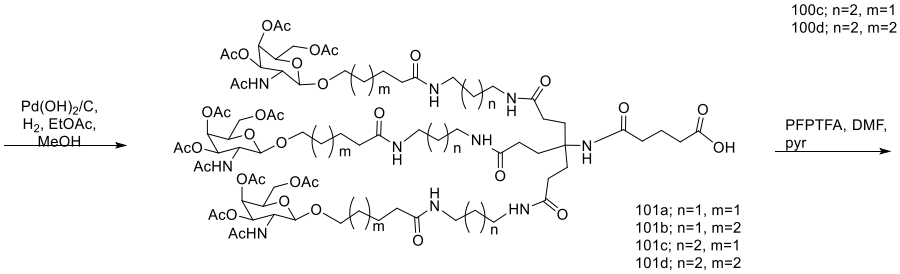


98a; n=1, m=1
98b; n=1, m=2
98c; n=2, m=1
98d; n=2, m=2

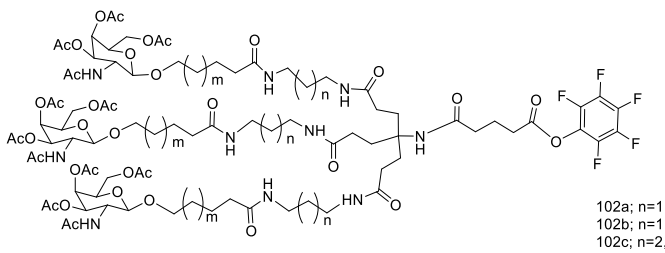


99

100a; n=1, m=1
100b; n=1, m=2
100c; n=2, m=1
100d; n=2, m=2



101a; n=1, m=1
101b; n=1, m=2
101c; n=2, m=1
101d; n=2, m=2



102a; n=1, m=1
102b; n=1, m=2
102c; n=2, m=1
102d; n=2, m=2

[00975] O triácido 90 (4 g, 14,43 mmol) foi dissolvido em DMF (120 mL) e *N*,*N*-Di-isopropiletilamina (12,35 mL, 72 mmoles). Trifluoroacetato de pentafluorofenila (8,9 mL, 52 mmoles) foi adicionado em gotas, sob argônio, e a reação foi deixada agitar à temperatura ambiente por 30 minutos. Boc-diamina 91a ou 91b (68,87 mmoles) foi adicionada, juntamente com *N*,*N*--Di-isopropiletilamina (12,35 mL, 72 mmoles), e a reação foi deixada agitar à temperatura ambiente por 16 horas. Nesse tempo, o DMF foi reduzido em >75% sob pressão reduzida e, em seguida, a mistura foi dissolvida em diclorometano. A camada orgânica foi lavada com bicarbonato de sódio, água e salmoura. A camada orgânica foi então separada e seca com sulfato de sódio, filtrada e reduzida a um óleo sob pressão reduzida. O óleo resultante foi purificado por cromatografia em sílica-gel(2%-->10% metanol/diclorometano) para gerar os compostos 92a e 92b em um rendimento de aproximadamente 80%. LCMS e RMN de prótons foram consistentes com a estrutura.

[00976] O composto 92a ou 92b (6,7 mmoles) foi tratado com 20 mL de diclorometano e 20 mL de ácido trifluoroacético à temperatura ambiente por 16 horas. A solução resultante foi evaporada e, em seguida, dissolvida em metanol e tratada com resina DOWEX-OH por 30 minutos. A solução resultante foi filtrada e reduzida a um óleo sob pressão reduzida para gerar 85-90% de rendimento dos compostos 93a e 93b.

[00977] O composto 7 ou 64 (9,6 mmoles) foram tratados com HBTU (3,7 g, 9,6 mmoles) e *N*,*N*-Di-isopropiletilamina (5 mL) em DMF (20 mL) por 15 minutos. A isto foi adicionado qualquer um do composto 93a ou 93b (3 mmoles), e deixado agitar à temperatura ambiente por 16 horas. Nesse tempo, o DMF foi reduzido em >75% sob pressão reduzida e, em seguida, a mistura foi dissolvida em diclorometano. A camada orgânica foi lavada com bicarbonato de sódio, água e salmoura. A camada orgânica foi então separada e seca com sulfato de sódio, filtrada e reduzida

a um óleo sob pressão reduzida. O óleo resultante foi purificado por cromatografia em sílica-gel(5%-->20% metanol/diclorometano) para gerar os compostos 96a-d em 20-40% de rendimento. LCMS e RMN de prótons foram consistentes com a estrutura.

[00978] Os compostos 96a-d (0,75 mmoles), individualmente, foram hidrogenados com Níquel de Raney por 3 horas em Etanol (75 mL). Nesse tempo, o catalisador foi removido por filtração através de celite, e o etanol removido sob pressão reduzida para gerar os compostos 97a-d em 80-90% de rendimento. LCMS e RMN de prótons foram consistentes com a estrutura.

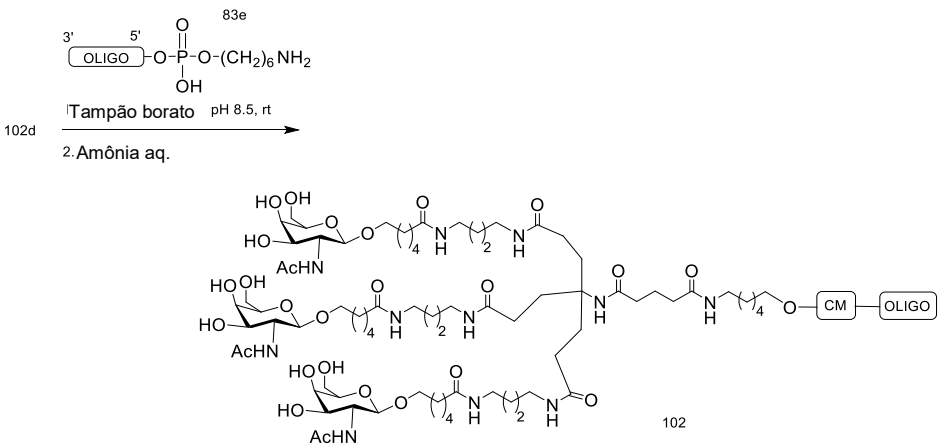
[00979] O composto 23 (0,32 g, 0,53 mmoles) foi tratado com HBTU (0,2 g, 0,53 mmoles) e *N*,*N*-Di-isopropiletilamina (0,19 mL, 1,14 mmoles) em DMF (30mL) por 15 minutos. A isto foram adicionados os compostos 97a-d (0,38 mmoles), individualmente, e deixados agitar à temperatura ambiente por 16 horas. Nesse tempo, o DMF foi reduzido em >75% sob pressão reduzida e, em seguida, a mistura foi dissolvida em diclorometano. A camada orgânica foi lavada com bicarbonato de sódio, água e salmoura. A camada orgânica foi então separada e seca com sulfato de sódio, filtrada e reduzida a um óleo sob pressão reduzida. O óleo resultante foi purificado por cromatografia em sílica-gel(2%-->20% metanol/diclorometano) para gerar os compostos 98a-d em 30-40% de rendimento. LCMS e RMN de prótons foram consistentes com a estrutura.

[00980] O composto 99 (0,17 g, 0,76 mmoles) foi tratado com HBTU (0,29 g, 0,76 mmoles) e *N*,*N*-Di-isopropiletilamina (0,35 mL, 2,0 mmoles) em DMF (50mL) por 15 minutos. A isto foram adicionados os compostos 97a-d (0,51 mmoles), individualmente, e deixados agitar à temperatura ambiente por 16 horas. Nesse tempo, o DMF foi reduzido em >75% sob pressão reduzida e, em seguida, a mistura foi dissolvida em diclorometano. A camada orgânica foi lavada com bicarbonato de sódio, água e salmoura. A camada orgânica foi então separada e seca com sulfato de

sódio, filtrada e reduzida a um óleo sob pressão reduzida. O óleo resultante foi purificado por cromatografia em sílica-gel(5%-->20% metanol/diclorometano) para gerar os compostos 100a-d em 40-60% de rendimento. LCMS e RMN de prótons foram consistentes com a estrutura.

[00981] Os compostos 100a-d (0,16 mmoles), individualmente, foram hidrogenados com 10% $Pd(OH)_2/C$ por 3 horas em metanol/acetato de etil (1:1, 50 mL). Nesse tempo, o catalisador foi removido por filtração através de celite, e os compostos orgânicos removidos sob pressão reduzida para gerar os compostos 101a-d em 80-90% de rendimento. LCMS e RMN de prótons foram consistentes com a estrutura.

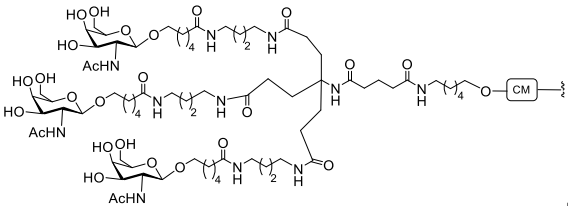
[00982] Os compostos 101a-d (0,15 mmoles), individualmente, foram dissolvidos em DMF (15 mL) e piridina (0,016 mL, 0,2 mmoles). Trifluoroacetato de pentafluorofenila (0,034 mL, 0,2 mmoles) foi adicionado em gotas, sob argônio, e a reação foi deixada agitar à temperatura ambiente por 30 minutos. Nesse tempo, o DMF foi reduzido em >75% sob pressão reduzida e, em seguida, a mistura foi dissolvida em diclorometano. A camada orgânica foi lavada com bicarbonato de sódio, água e salmoura. A camada orgânica foi então separada e seca com sulfato de sódio, filtrada e reduzida a um óleo sob pressão reduzida. O óleo resultante foi purificado por cromatografia em sílica-gel(2%-->5% metanol/diclorometano) para gerar os compostos 102a-d num rendimento aproximado de 80%. LCMS e RMN de prótons foram consistentes com a estrutura.



[00983] O Composto Oligomérico 102, compreendendo um grupo de

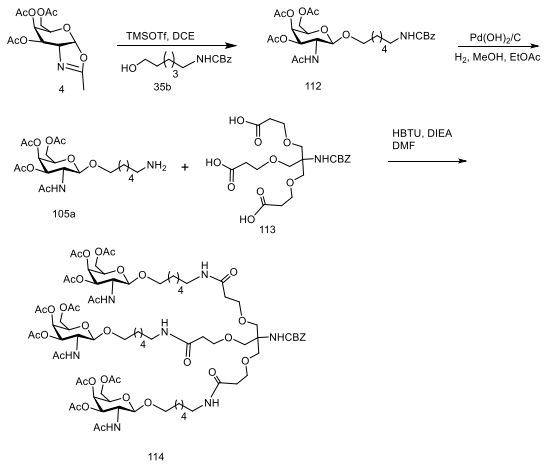
conjugado de GalNAc3-8, foi preparado usando os procedimentos gerais ilustrados no Exemplo 46. A parte do agrupamento de $GalNAc_3$ do grupo de conjugado $GalNAc_3$-8 ($GalNAc_3$-8_a) pode ser combinado com qualquer porção clivável para fornecer uma variedade de grupos conjugados. Em uma modalidade preferencial, a porção clivável é -P(=O)(OH)-a_d- P(=O)(OH)-.

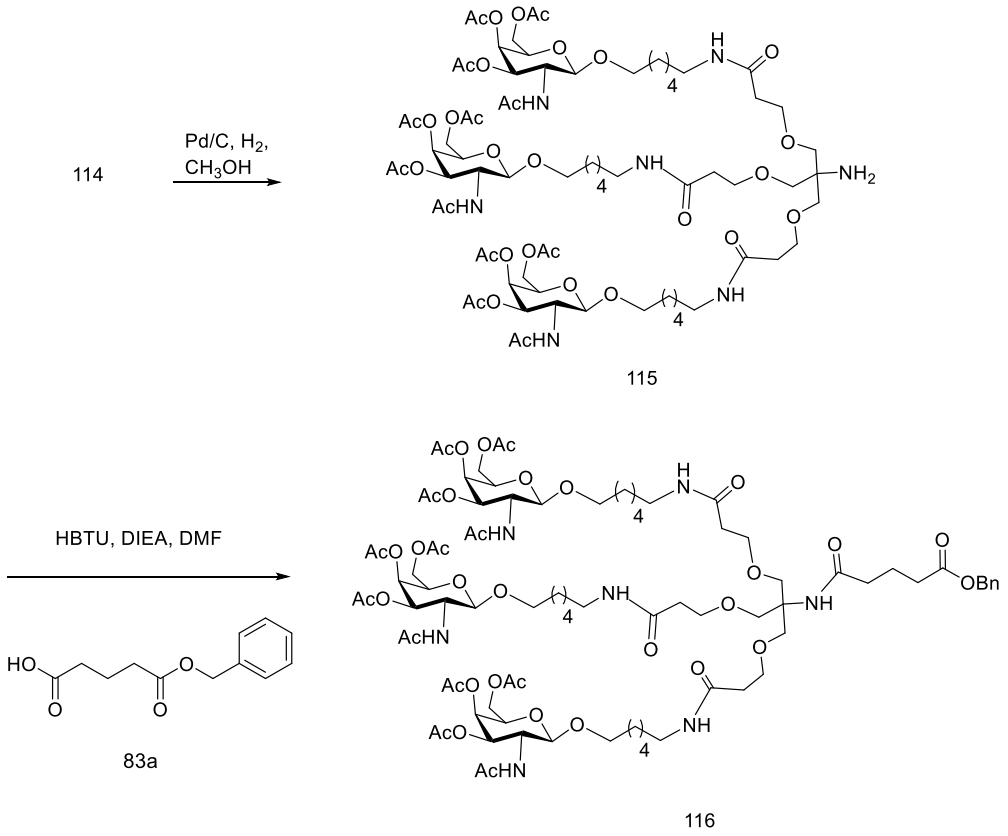
[00984] A estrutura de $GalNAc_3$-8 ($GalNAc_3$-8_a-CM-) é mostrada abaixo:



.

Exemplo 48: Preparação do Oligonucleotídeo 119 Compreendendo $GalNAc_3$-7





[00985] O composto 112 foi sintetizado após o procedimento descrito na literatura (*J. Med. Chem.* 2004, *47*, 5798-5808).

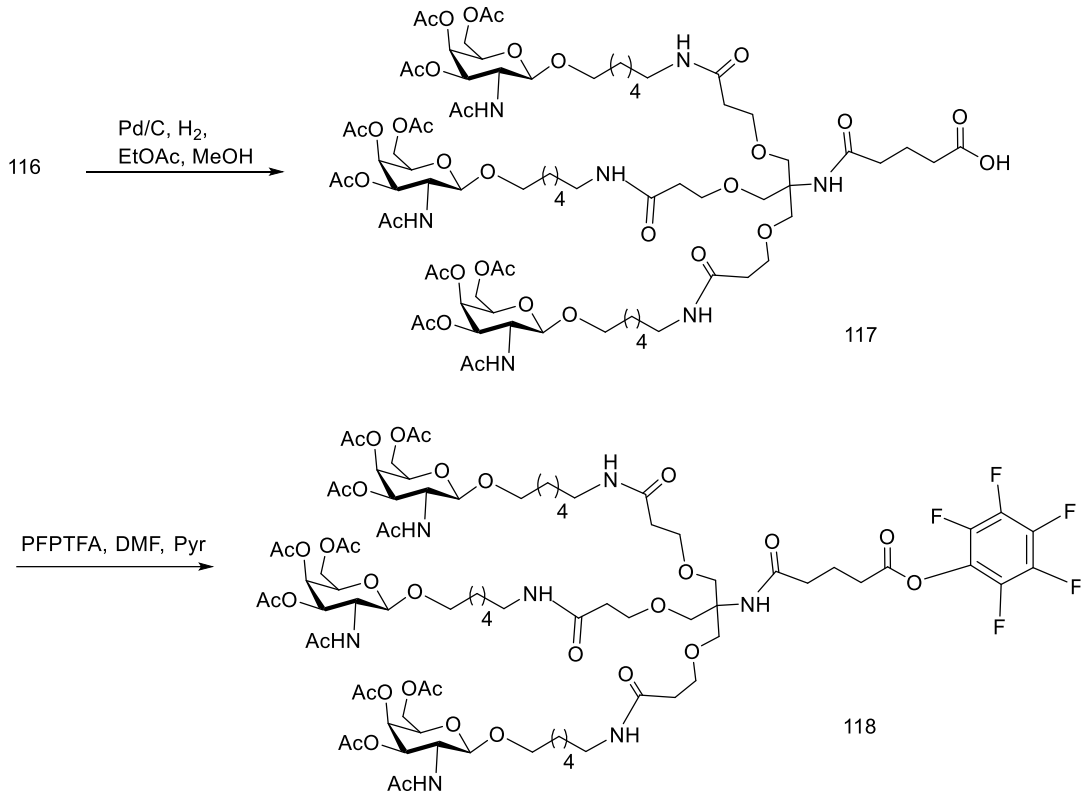
[00986] O composto 112 (5 g, 8,6 mmol) foi dissolvido em 1:1 de metanol/acetato de etil (22 mL/22 mL). Foi adicionado hidróxido de paládio em carbono (0,5 g). A mistura da reação foi agitada em temperatura ambiente sob hidrogênio por 12 h. A mistura da reação foi filtrada através de uma almofada de celite e lavada a almofada com 1:1 metanol/acetato de etila. O filtrado e as lavagens foram combinadas e concentradas à secura para produzir o Compostos 105a (quantitativo). A estrutura foi confirmada por LCMS.

[00987] O composto 113 (1,25 g, 2,7 mmol), HBTU (3,2 g, 8,4 mmol) e DIEA (2,8 mL, 16,2 mmol) foram dissolvidos em DMF (17 mL) e a mistura de reação foi agitada à temperatura ambiente por 5 min. A isto, uma solução do Composto 105a (3,77 g, 8,4 mmol) em DMF anidro (20 mL) foi adicionada. A reação foi agitada em temperatura ambiente por 6 h. O solvente foi removido sob pressão reduzida para obter um óleo. O

resíduo foi dissolvido em CH_2Cl_2 (100 mL) e lavado com solução de $NaHCO_3$ saturada aquosa (100 mL) e salmoura (100 mL). A fase orgânica foi separada, seca (Na_2SO_4), filtrada e evaporada. O resíduo foi purificado por cromatografia de coluna em sílica-gel e eluído com MeOH 10 a 20 % em diclorometano para produzir o Composto 114 (1,45 g, 30%). A estrutura foi confirmada por LCMS e análise ^{1}H RMN.

[00988] O composto 114 (1,43 g, 0,8 mmol) foi dissolvido em 1:1 de metanol/acetato de etila (4 mL/4 mL). Foi adicionado paládio em carbono (úmido, 0,14 g). A mistura da reação foi lavada com hidrogênio e agitada em temperatura ambiente sob hidrogênio por 12 h. A mistura da reação foi filtrada através de uma almofada de celite. A camada de celite foi lavada com metanol/acetato de etil (1:1). O filtrado e as lavagens foram combinadas e evaporadas sob pressão reduzida para produzir o Composto 115 (quantitativo). A estrutura foi confirmada por LCMS e análise ^{1}H RMN.

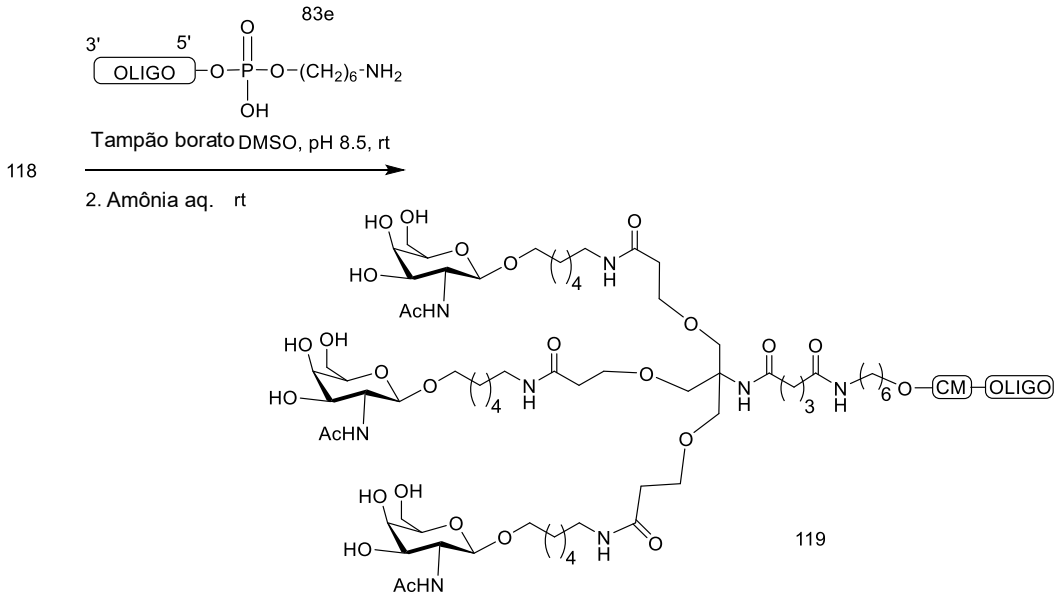
[00989] O composto 83a (0,17 g, 0,75 mmol), HBTU (0,31 g, 0,83 mmol) e DIEA (0,26 mL, 1,5 mmol) foram dissolvidos em DMF anidro (5 mL) e a mistura de reação foi agitada à temperatura ambiente por 5 min. A isto, foi adicionada uma solução do Composto 115 (1,22 g, 0,75 mmol) em DMF e a reação foi agitada à temperatura ambiente por 6 h. O solvente foi removido sob pressão reduzida e o resíduo foi dissolvido em CH_2Cl_2. A camada orgânica foi lavada com solução de $NaHCO_3$ aquosa saturada e salmoura e foi seca com $Na_2SO_{4\ anidro}$ e filtrada. A camada orgânica foi concentrada à secura e o resíduo obtido foi purificado por cromatografia de coluna em sílica-gel e eluído com MeOH 3 a 15% em diclorometano para produzir o Composto 116 (0,84 g, 61%). A estrutura foi confirmada por LCMS e análise ^{1}H RMN.



[00990] O composto 116 (0,74 g, 0,4 mmol) foi dissolvido em 1:1 de metanol/acetato de etila (5 mL/5 mL). Foi adicionado paládio em carbono (úmido, 0,074 g). A mistura da reação foi lavada com hidrogênio e agitada em temperatura ambiente sob hidrogênio por 12 h. A mistura da reação foi filtrada através de uma almofada de celite. A camada de celite foi lavada com metanol/acetato de etila (1:1). O filtrado e as lavagens foram combinadas e evaporadas sob pressão reduzida para produzir o composto 117 (0,73 g, 98%). A estrutura foi confirmada por LCMS e análise ^{1}H RMN.

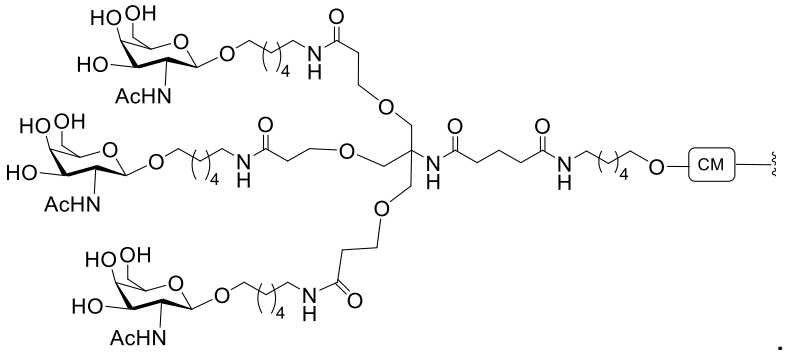
[00991] O composto 117 (0,63 g, 0,36 mmol) foi dissolvido em DMF anidro (3 mL). A esta solução, *N*,*N*-Di-isopropiletilamina (70 µL, 0,4 mmol) e trifuloroacetato de pentafluorofenila (72 µL, 0,42 mmol) foram adicionados. A mistura de reação foi agitada à temperatura ambiente por 12 h e vertida numa solução de $NaHCO_3$ aquosa saturada. A mistura foi extraída com diclorometano, lavada com salmoura e seca sobre Na_2SO_4 anídrico. A solução de diclorometano foi concentrada à secura e purificada com cromatografia de coluna em sílica-gel e eluída com

MeOH 5 a 10% em diclorometano para produzir o composto 118 (0,51 g, 79%). A estrutura foi confirmada por LCMS e ^{1}H e ^{1}H e ^{19}F RMN.



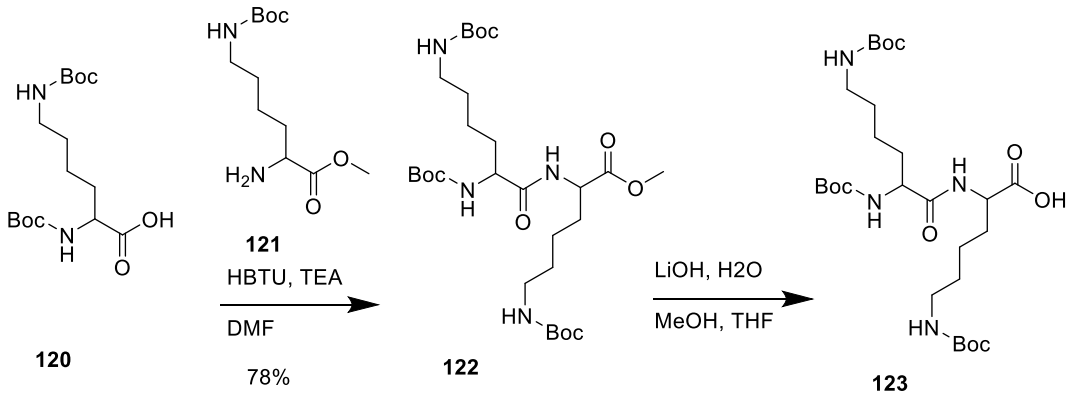
[00992] O Composto Oligomérico 119, compreendendo um grupo de conjugado de GalNAc3-7 foi preparado usando os procedimentos gerais ilustrados no Exemplo 46. A parte do agrupamento de $GalNAc_3$ do grupo de conjugado $GalNAc_3$-7 ($GalNAc_3$-7_a) pode ser combinado com qualquer porção clivável para fornecer uma variedade de grupos conjugados. Em uma certas modalidades, a porção clivável é -P(=O) (OH)-a_d-P(=O)(OH)-.

[00993] A estrutura de $GalNAc_3$-7 ($GalNAc_3$-7_a-CM-) é mostrada abaixo:



.

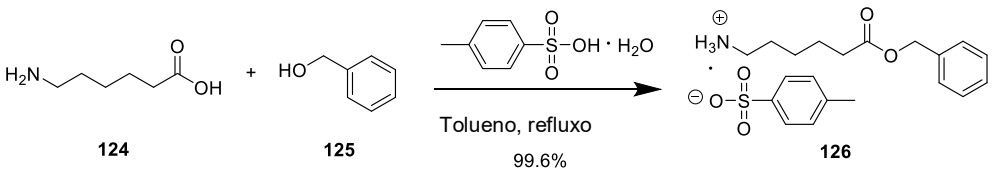
Exemplo 49: Preparação do Oligonucleotídeo 132 Compreendendo $GalNAc_3$-5



[00994] O composto 120 (14,01 g, 40 mmol) e HBTU (14,06 g, 37 mmol) foram dissolvidos em DMF anidro (80 mL). Trietilamina (11,2 mL, 80,35 mmol) foi adicionada e agitada por 5 min. A mistura de reação foi resfriada em banho gelado e uma solução do composto 121 (10 g, mmol) em DMF anidro (20 mL) foi adicionada. Trietilamina adicional (4,5 mL, 32,28 mmol) foi adicionada e a mistura de reação foi agitada por 18 h sob atmosfera de argônio. A reação foi monitorada por TLC (acetato de etil:hexano; 1:1; Rf = 0,47). O solvente foi removido sob pressão reduzida. O resíduo foi absorvido em EtOAc (300 mL) e lavado com 1M $NaHSO_4$ (3 x 150 mL), solução de $NaHCO_3$ aquosa saturada (3 x 150 mL) e salmoura (2 x 100 mL). A camada orgânica foi seca com Na_2SO_4. O agente de secagem foi removido por filtração e a camada orgânica foi concentrada por evaporação giratória. A mistura crua foi purificada por cromatografia de coluna em sílica-gel e eluída, usando-se EtOAc 35 - 50% em hexano para produzir um composto 122 (15,50 g, 78,13%). A estrutura foi confirmada por LCMS e análise ^{1}H RMN. Massa *m/z* 589,3 $[M + H]^+$.

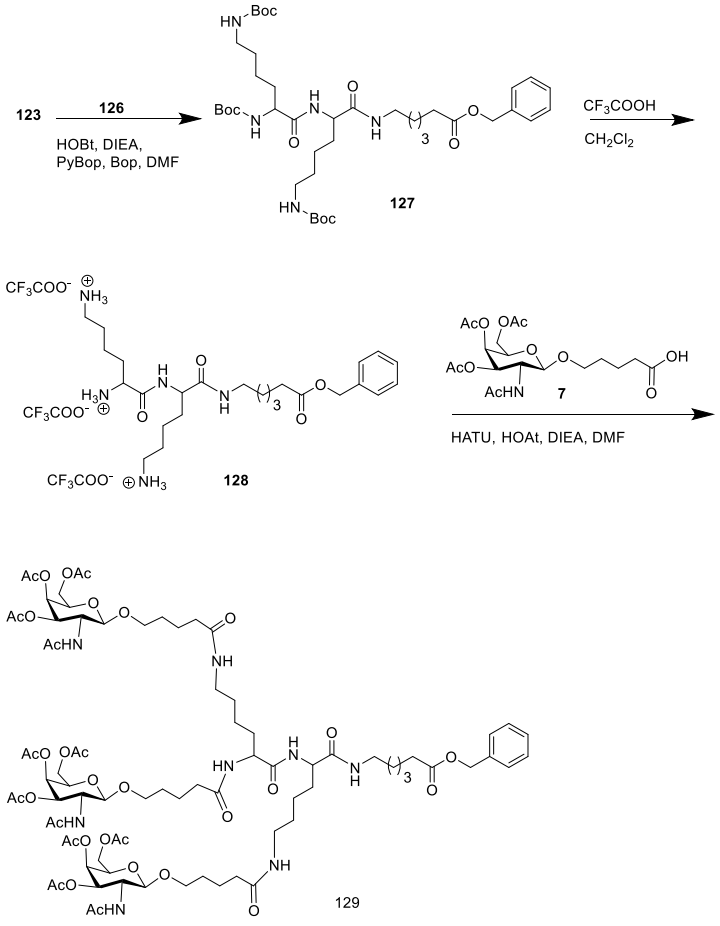
[00995] Uma solução de LiOH (92,15 mmol) em água (20 mL) e THF (10 mL) foi adicionada a uma solução resfriada do Composto 122 (7,75 g, 13,16 mmol) dissolvido em metanol (15 mL). A mistura de reação foi agitada à temperatura ambiente por 45 min e monitorada por TLC (EtOAc:hexano; 1:1). A mistura de reação foi concentrada à metade do volume sob pressão reduzida. A solução restante foi resfriada em banho

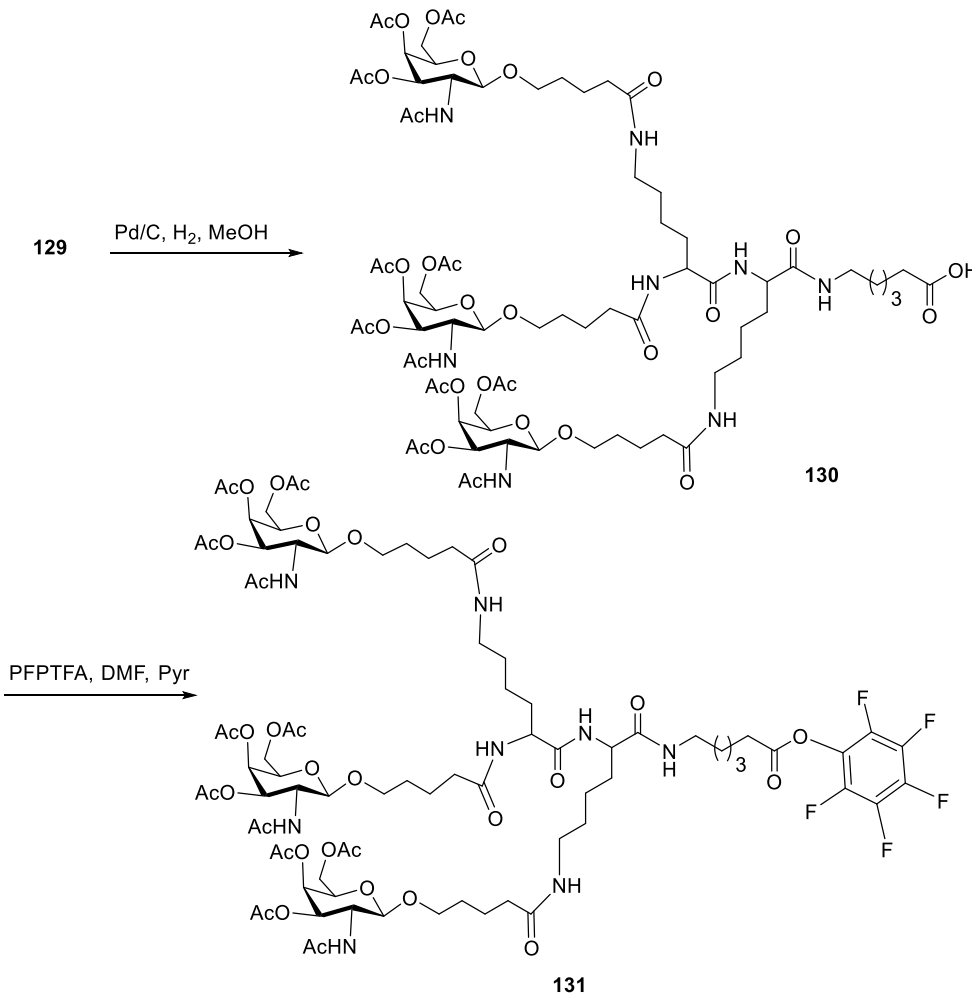
gelado e neutralizado, adicionando-se HCl concentrado. A mistura de reação foi diluída, extraída com EtOAc (120 mL) e lavada com salmoura (100 mL). Uma emulsão foi formada e limpa durante a noite. A camada orgânica foi separada, seca (Na_2SO_4), filtrada e evaporada para produzir o Composto 123 (8,42 g). O sal residual é a causa provável de excesso de massa. LCMS é consistente com a estrutura. O produto foi usado sem nenhuma purificação adicional. M.W.cal:574.36; M.W.fd:575,3 $[M + H]^+$.



124 125 126

[00996] O composto 126 foi sintetizado após o procedimento descrito na literatura (*J. Am. Chem. Soc.* 2011, *133*, 958-963).





[00997] O composto 123 (7,419 g, 12,91 mmol), HOBt (3,49 g, 25,82 mmol) e o composto 126 (6,33 g, 16,14 mmol) foram dissolvidos em DMF (40 mL) e a mistura de reação resultante foi resfriada em banho gelado. A isto, *N*,*N*-Di-isopropiletilamina (4,42 mL, 25,82 mmol), PyBop (8,7 g, 16,7 mmol) seguido por agente de acoplamento Bop (1,17 g, 2,66 mmol) foram adicionados sob uma atomosfera de argônio. O banho gelado foi removido e a solução foi deixada aquecer à temperatura ambiente. A reação foi concluída depois de 1 h, como determinado por TLC (DCM:MeOH:AA; 89:10:1). A mistura de reação foi concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi dissolvido em EtOAc (200 mL) e lavado com 1 M $NaHSO_4$ (3x100 mL), $NaHCO_3$ saturada aquosa (3x100 mL) e salmoura (2x100 mL). A fase orgânica foi separada, seca (Na_2SO_4), filtrada e concentrada. O resídui foi purificado por cromatografia de coluna

em sílica-gel com um gradiente de 50% hexanos/EtOAC a 100% EtOAc para produzir o Composto 127 (9,4 g) como uma espuma branca. LCMS e ^{1}H RMN foram consistentes com a estrutura. Massa *m/z* 778,4 $[M + H]^+$.

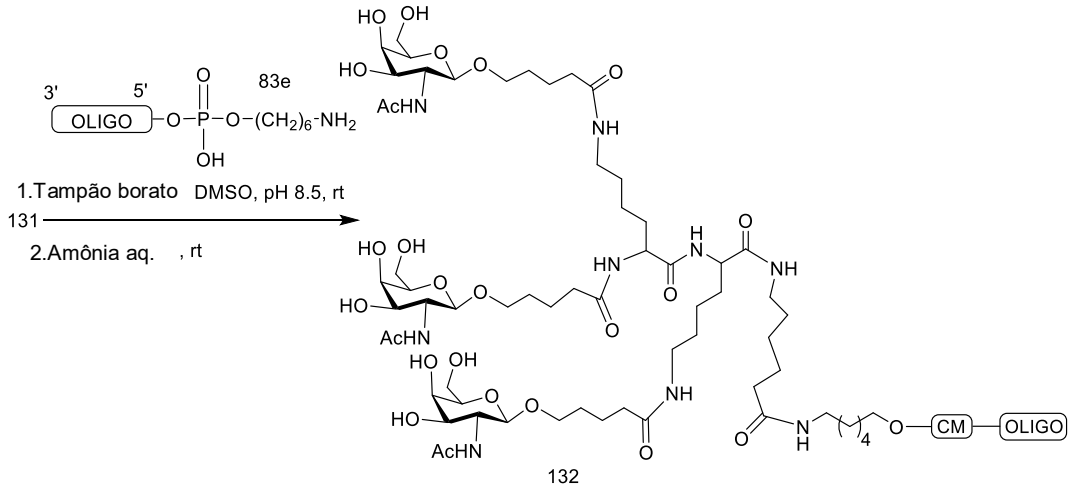
[00998] Ácido trifluoroacético (12 mL) foi adicionado a uma solução do composto 127 (1,57 g, 2,02 mmol) em diclorometano (12 mL) e agitado à temperatura ambiente por 1 h. A mistura da reação foi co-evaporada com tolueno (30 mL) sob pressão reduzida à secura. O resíduo obtido foi coevaporado duas vezes com acetonitrila (30 mL) e tolueno (40 mL) para produzir o Composto 128 (1,67 g) como sal de trifluoro acetato para a etapa seguinte sem purificação adicional. LCMS e ^{1}HRMN foram consistentes com a estrutura. Massa *m/z* 478,2 $[M + H]^+$.

[00999] O composto 7 (0,43 g, 0,963 mmol), HATU (0,35 g, 0,91 mmol), e HOAt (0,035 g, 0,26 mmol) foram combinados e secos por 4 h com P_2O_5 sob pressão reduzida em um frasco de fundo redondo e, em seguida, dissolvidos em DMF anidro (1 mL) e agitados por 5 min. A isto, uma solução do composto 128 (0,20 g, 0,26 mmol) em DMF anidro (0,2 mL) e *N*,*N*-Di-isopropiletilamina (0,2 mL) foi adicionada. A mistura de reação foi agitada à temperatura ambiente sob uma atmosfera de argônio. A reação foi concluída após 30 min como determinado por LCMS e TLC (7% MeOH/DCM). A mistura de reação foi concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi dissolvido em DCM (30 mL) e lavado com 1 M $NaHSO_4$ (3x20 mL), $NaHCO_3$ saturada aquosa (3x20 mL) e salmoura (3x20 mL). A fase orgânica foi separada, seca sobre Na_2SO_4, filtrada e concentrada. O resíduo foi purificado por cromatografia de coluna em sílica-gel usando 5-15% de MeOH em diclorometano para produzir o Composto 129 (96,6 mg). LCMS e^{1}H RMN são consistentes com a estrutura. Massa *m/z* 883,4 $[M + 2H]^+$.

[001000] O composto 129 (0,09 g, 0,051 mmol) foi dissolvido em metanol (5 mL) em 20 mL de frasco de cintilação. A isto, foi adicionada uma

pequena quantidade de 10% Pd/C (0,015 mg) e o recipiente de reação foi carregado com gás H_2. A mistura da reação foi agitada em temperatura ambiente sob atmosfera de H_2 por 18 h. A mistura da reação foi filtrada através de uma almofada de celite e lavada a almofada com metanol. As lavagens do filtrado foram agrupadas e concentradas sob pressão reduzida para produzir o Composto 130 (0,08 g). LCMS e ^{1}H RMN foram consistentes com a estrutura. O produto foi usado sem nenhuma purificação adicional. Massa *m/z* 838,3 $[M + 2H]^+$.

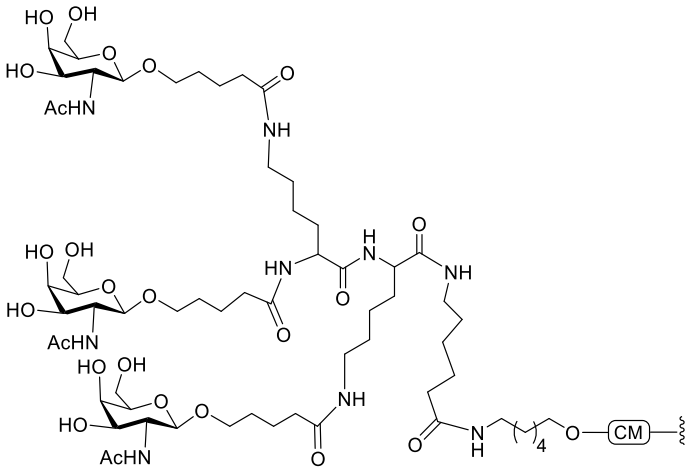
[001001] A um frasco de fundo redondo pontudo de 10 mL foram adicionados o composto 130 (75,8 mg, 0,046 mmol), 0,37 M de piridina/DMF (200 µL) e uma barra de agitação. A esta solução, foi adicionada 0,7 M de trifluoroacetato de pentafluorofenil/DMF (100 µL) em gotas com agitação. A reação foi concluída após 1h conforme determinado pela LC MS. O solvente foi removido sob pressão reduzida e o resíduo foi dissolvido em $CHCl_3$ (~ 10 mL). A camada orgânica foi particionada contra $NaHSO_4$ (1 M, 10 mL), $NaHCO_3$ aquosa saturada (10 mL) e salmoura (10 mL) três vezes cada. A fase orgânica foi separada e seca com Na_2SO_4, filtrada e concentrada para produzir o Composto 131 (77,7 mg). LCMS é consistente com a estrutura. Usado sem purificação adicional. Massa *m/z* 921,3 $[M + 2H]^+$.



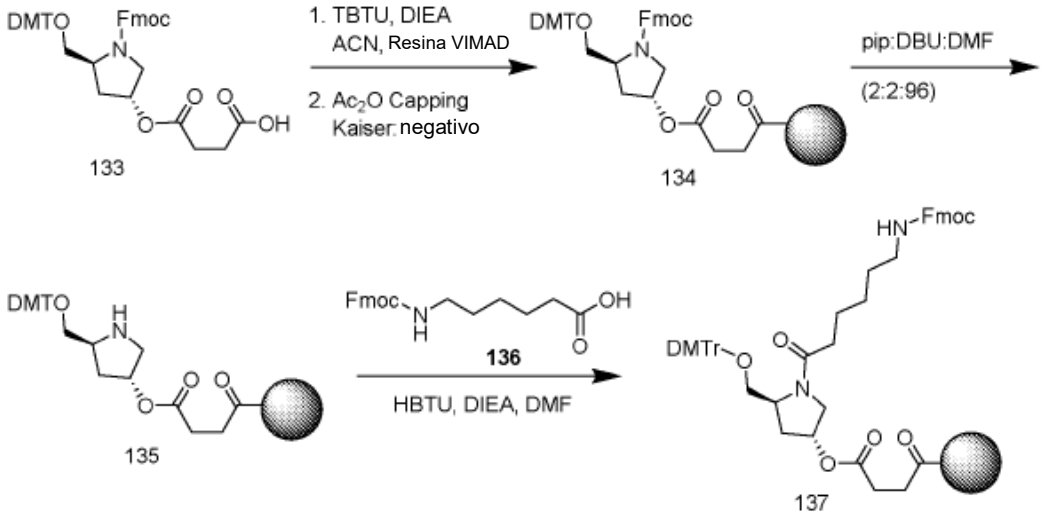
[001002] O Composto Oligomérico 132, compreendendo um grupo de

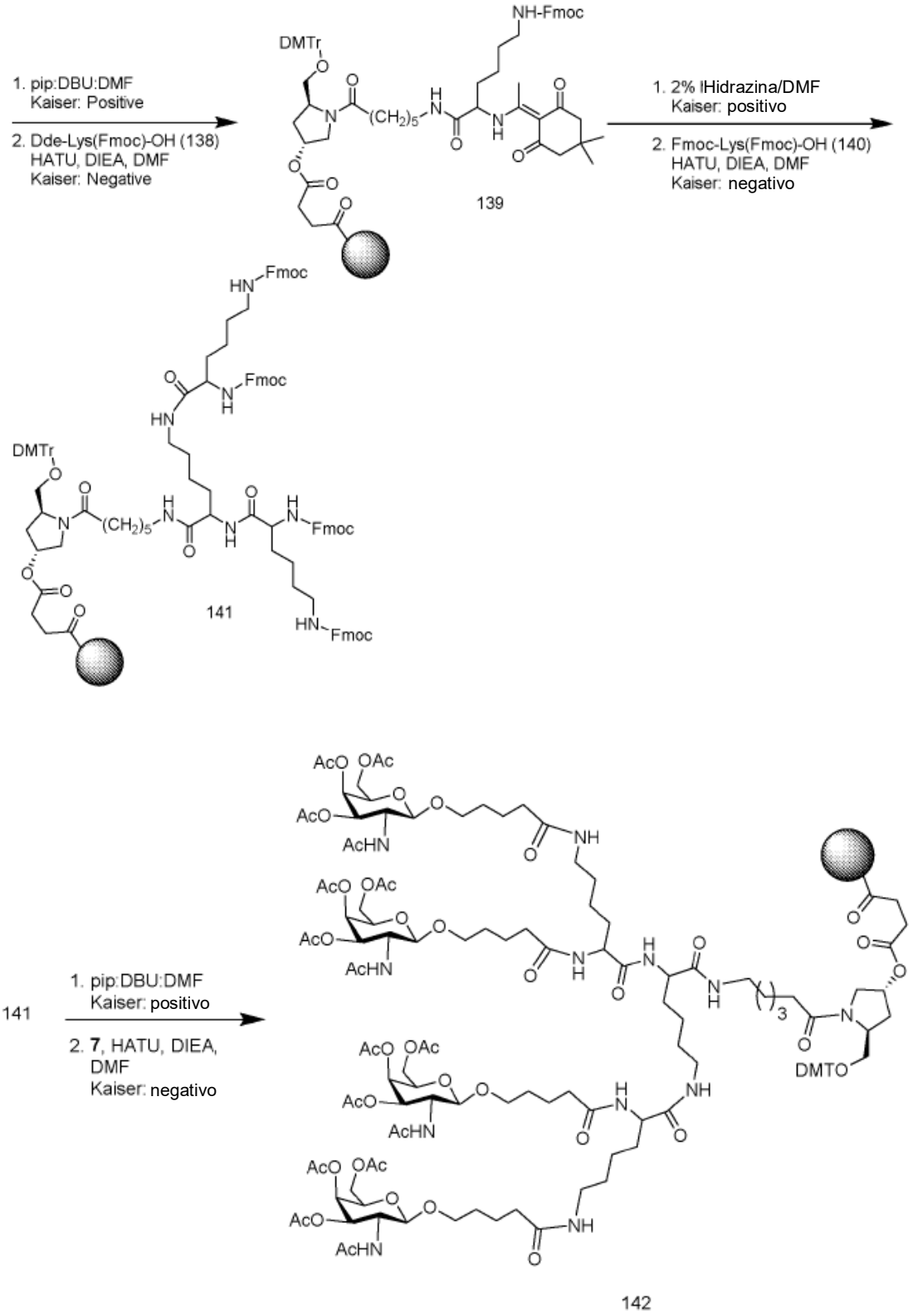
conjugado de GalNAc3-5, foi preparado usando os procedimentos gerais ilustrados no Exemplo 46. A parte do agrupamento de $GalNAc_3$ do grupo de conjugado $GalNAc_3$-5 ($GalNAc_3$-5_a) pode ser combinado com qualquer porção clivável para fornecer uma variedade de grupos conjugados. Em uma certas modalidades, a porção clivável é -P(=O) (OH)-a_d- P(=O)(OH)-.

[001003] A estrutura de $GalNAc_3$<-5 ($GalNAc_3$-5_a-CM-) é mostrada abaixo:



Exemplo 50: Preparação do Oligonucleotídeo 144 Compreendendo $GalNAc_4$-11



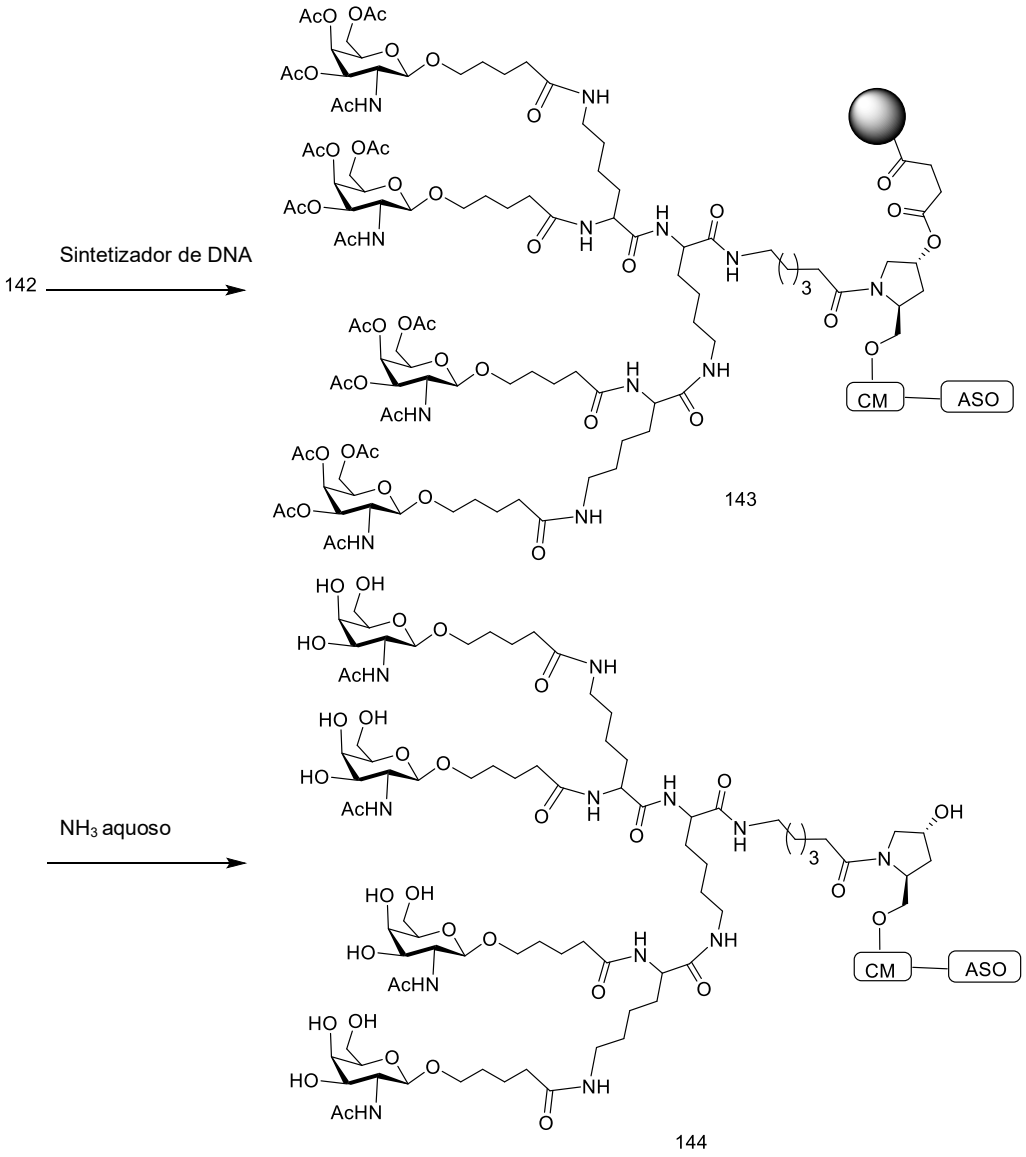


[001004] Síntese do Composto 134. A um frasco de Merrifield foi adicionada resina de aminometil VIMAD (2,5 g, 450 μmol/g) que foi lavada

com acetonitrila, dimetilformamida, diclorometano e acetonitrila. A resina foi inchada em acetonitrila (4 mL). O composto 133 foi pré-ativado em um frasco de fundo redondo de 100 mL, adicionando-se 20 (1,0 mmol, 0,747 g), TBTU (1,0 mmol, 0,321 g), acetonitrila (5 mL) e DIEA (3,0 mmol, 0,5 mL). Esta solução foi deixada agitar por 5 min e foi então adicionada ao frasco de Merrifield com agitação. A suspensão foi agitada por 3h. A mistura da reação foi drenada e a resina foi lavada com acetonitrila, DMF e DCM. Um novo carregamento de resina foi quantificado, medindo-se a absorbância do cátion de DMT em 500 nm (coeficiente de extinção = 76000) em DCM e determinado para ser 238 μmol/g. A resina foi revestida, suspendendo-se em uma solução de anidrido acético por dez minutos três vezes.

[001005] O composto ligado ao suporte sólido 141 foi sintetizado usando métodos iterativos de síntese de peptídeo de fase sólida à base de Fmoc. Uma quantidade pequena de suporte sólido foi extraída e suspendida em amônia aquosa (28-30% em peso) por 6h. O composto clivado foi analisado por LC-MS e a massa observada estava consistente com a estrutura. Massa *m/z* 1063,8 $[M + 2H]^+$.

[001006] O composto ligado ao suporte sólido 142 foi sintetizado usando os métodos de síntese de peptídeo de fase sólida.



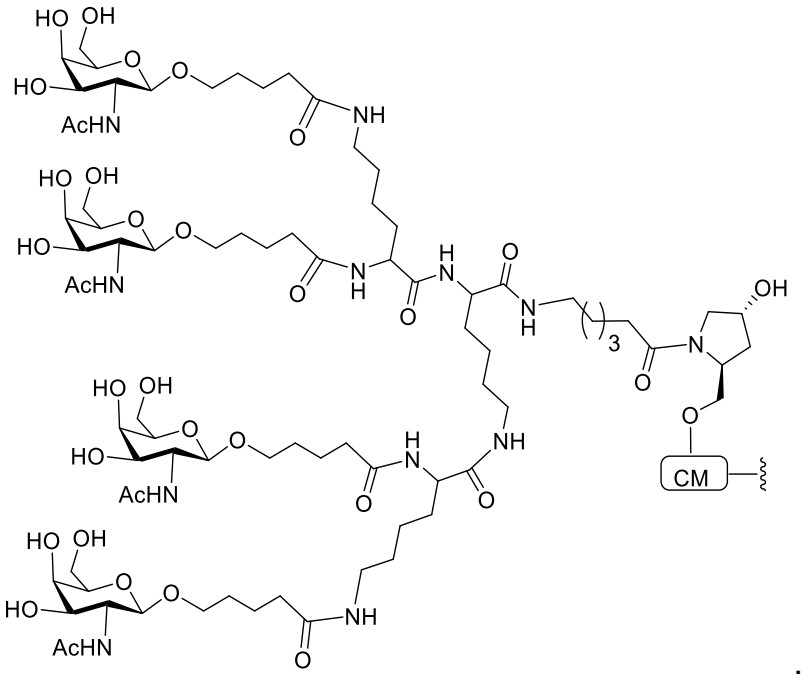
[001007] O composto ligado ao suporte sólido 143 foi sintetizado usando síntese de fase sólida padrão em um sintetizador de DNA.

[001008] O composto ligado ao suporte sólido 143 foi suspenso em amônia aquosa (28-30% em peso) e aquecido a 55°C por 16 h. A solução foi resfriada e o suporte sólido foi filtrado. O filtrado foi concentrado e o resíduo dissolvido em água e purificado por HPLC numa coluna de troca de ânion forte. As frações contendo o composto de comprimento total 144 foram agrupadas e dessalinizadas. O composto oligomérico conjugado a GalNAc4-11 foi analisado por LC-MS e a massa observada foi consistente com a estrutura.

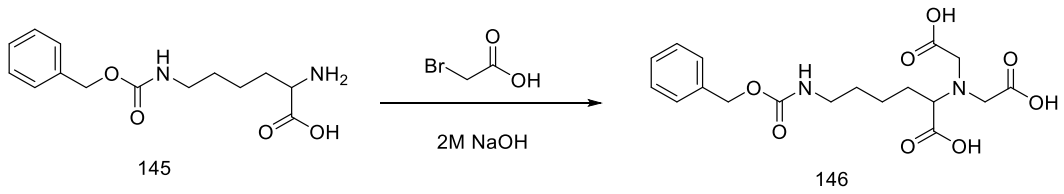
[001009] A parte do agrupamento de $GalNAc_4$ do grupo de conjugado

$GalNAc_4$-11 ($GalNAc_4$-11_a) pode ser combinado com qualquer porção clivável para fornecer uma variedade de grupos conjugados. Em uma certas modalidades, a porção clivável é -P(=O) (OH)-a_d- P(=O)(OH)-.

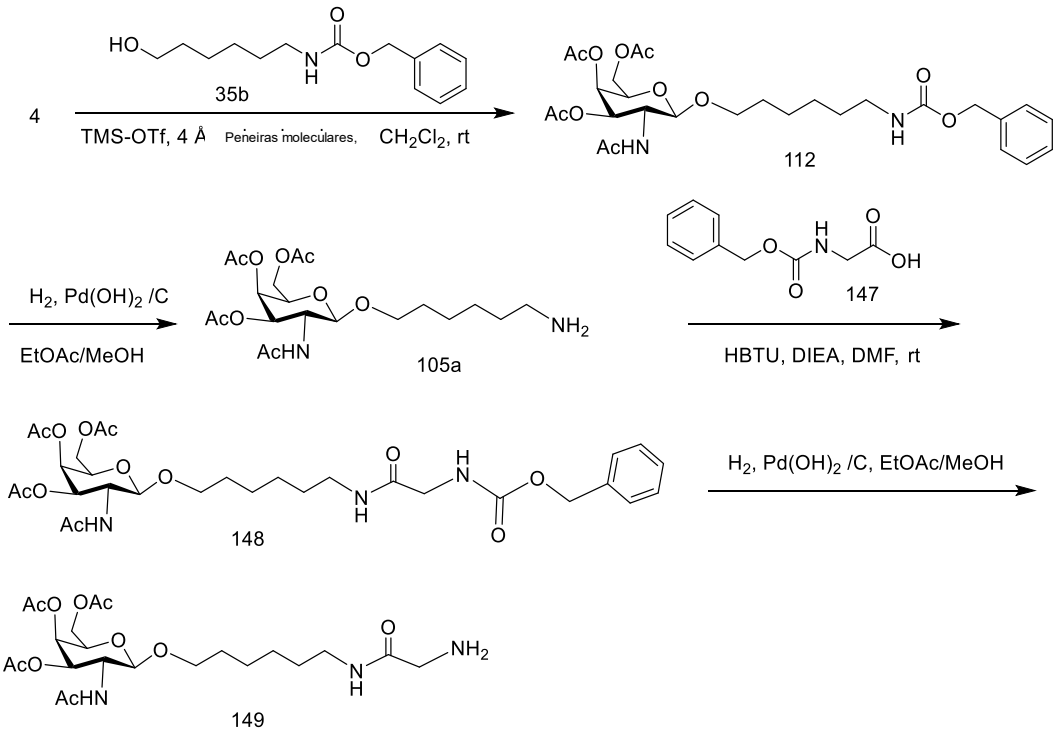
[001010] A estrutura de $GalNAc_4$-11 ($GalNAc_4$-11_a-CM) é mostrada abaixo:



Exemplo 51: Preparação do Oligonucleotídeo 155 Compreendendo $GalNAc_3$-6



[001011] O composto 146 foi sintetizado conforme descrito na literatura (*Analytical Biochemistry* 1995, *229*, 54-60).



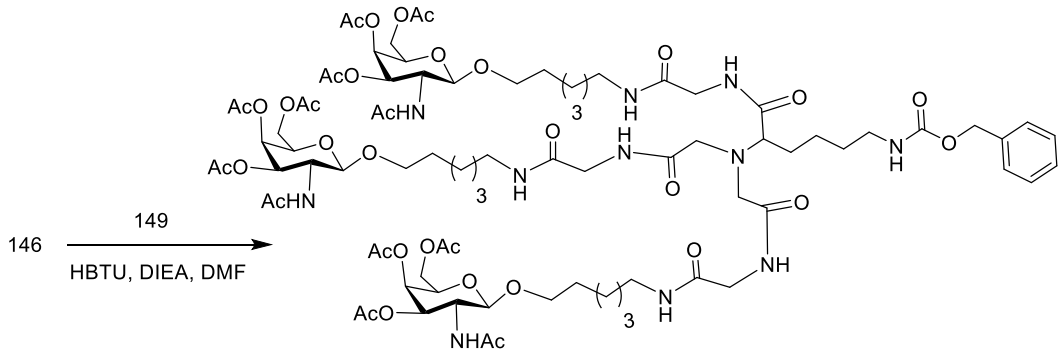
[001012] O composto 4 (15 g, 45,55 mmol) e o composto 35b (14,3 gramas, 57 mmol) foram dissolvidos em CH_2Cl_2 (200 ml). Peneiras moleculares ativadas (4 Å. 2 g, em pó) foram adicionadas, e a reação foi deixada agitar por 30 minutos sob atmosfera de nitrogênio. TMS-OTf fio adicionado (4,1 ml, 22,77 mmol) e a reação foi deixada agitar à temperatura ambiente durante a noite. Após conclusão, a reação foi extinta vertendo-se numa solução de $NaHCO_3$ aquosa saturada (500 ml) e gelo esmagado (~150 g). A camada orgânica foi separada, lavada com salmoura, seca com $MgSO_4$, filtrada, e foi concentrada em um óleo laranja sob pressão reduzida. O material bruto foi purificado por cromatografia de coluna em sílica-gel e eluído com 2-10 % MeOH em CH_2Cl_2 para produzir o Composto 112 (16,53 g, 63%). LCMS e ^{1}H RMN foram consistentes com o composto esperado.

[001013] O composto 112 (4,27 g, 7,35 mmol) foi dissolvido em 1:1 MeOH/EtOAc (40 ml). A mistura de reação foi purgada, ebulindo-se um fluxo de argônio através da solução por 15 minutos. Um catalisador de Pearlman (hidróxido de paládio em carbono, 400 mg) foi adicionado, e o gás hidrogênio foi ebulido através da solução por 30 minutos. Após a

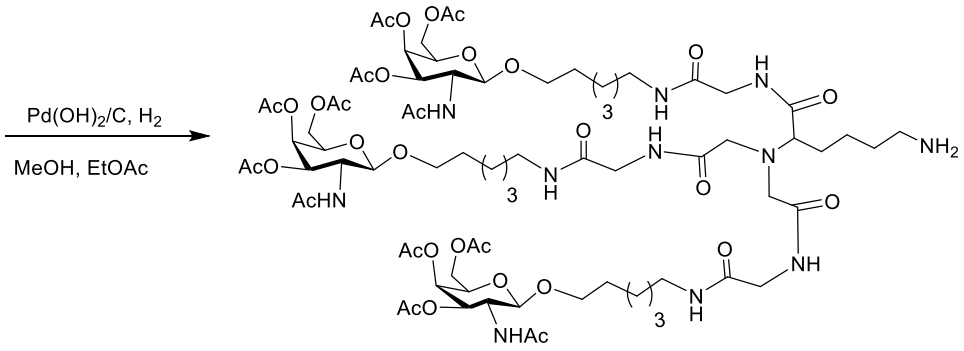
conclusão (TLC 10% de MeOH em CH_2Cl_2, e LCMS), o catalisador foi removido por filtração através de uma camada de celite. O filtrado foi concentrado por evaporação giratória, e foi seco brevemente sob alto vácuo para produzir o Composto 105a (3,28 g). LCMS e RMN 1H foram consistentes com o produto desejado.

[001014] O composto 147 (2,31 g, 11 mmol) foi dissolvido em DMF anidro (100 mL). *N*,*N*-Di-isopropiletilamina (DIEA, 3,9 mL, 22 mmol) foi adicionada, seguido por HBTU (4 g, 10,5 mmol). A mistura de reação foi deixada agitar por ~15 minutos sob nitrogênio. A isto, uma solução do composto 105a (3,3 g, 7,4 mmol) em DMF seco foi adicionada e agitada por 2 h sob atmosfera de nitrogênio. A ração foi diluída com EtOAc e lavada com $NaHCO_3$ aquoso saturado e salmoura. A fase orgânica foi separada, seca ($MgSO_{4<}$), filtrada e concentrada em um xarope laranja. O material bruto foi purificado por cromatografia de coluna em sílica-gel e eluído com 2-5% MeOH em CH_2Cl_2 para produzir o Composto 148(3,44 g, 73%). LCMS e ^{1}H RMN foram consistentes com o produto esperado.

[001015] O composto 148 (3,3 g, 5,2 mmol) foi dissolvido em 1:1 MeOH/EtOAc (75 ml). A mistura de reação foi purgada, ebulindo-se um fluxo de argônio através da solução por 15 minutos. Um catalisador de Pearlman (hidróxido de paládio em carbono) foi adicionado (350 mg). O gás hidrogênio foi ebulido através da solução por 30 minutos. Após a conclusão (TLC 10% de MeOH em DCM, e LCMS), o catalisador foi removido por filtração através de uma camada de celite. O filtrado foi concentrado por evaporação giratória, e foi seco brevemente sob alto vácuo para produzir o Composto 149 **(**2,6 g). A LCMS foi consistente com o produto desejado. O resíduo foi dissolvido em DMF seco (10 ml) e foi usado imediatamente na etapa seguinte.



150

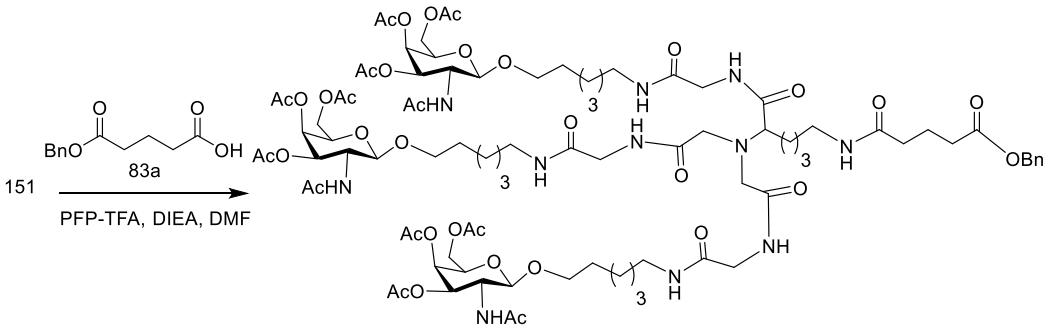


151

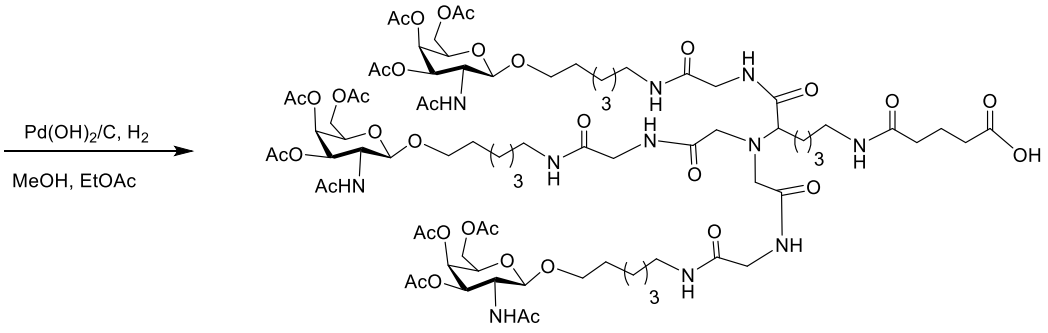
[001016] O composto 146 (0,68 g, 1,73 mmol) foi dissolvido em DMF seco (20 ml). Para este DIEA (450 µL, 2,6 mmol, 1,5 eq.) e HBTU (1,96 g, 0,5,2 mmol) foram adicionados. A mistura de reação foi deixada agitar por 15 minutos à temperatura ambiente sob nitrogênio. Uma solução do composto 149 (2,6 g) em DMF anidro (10 mL) foi adicionada. O pH da reação foi ajustado para pH = 9-10 pela adição de DIEA (se necessário). A reação foi deixada agitar à temperatura ambiente sob nitrogênio por 2h. Após conclusão, a reação foi diluída com EtOAc (100 mL) e lavada com $NaHCO_3$ saturado aquoso, seguido por salmoura. A fase orgânica foi separada, seca sobre $MgSO_4$, filtrada e concentrada. O resíduo foi purificado por cromatografia de coluna em sílica-gel e eluído com 2-10 % MeOH em CH2Cl2 para produzir o Composto 150 (0,62 g, 20%). LCMS e RMN ^1H foram consistentes com o produto desejado.

[001017] O composto 150 (0,62 g) foi dissolvido em 1:1 MeOH/EtOAc (5 L). A mistura de reação foi purgada, ebulindo-se um fluxo de argônio

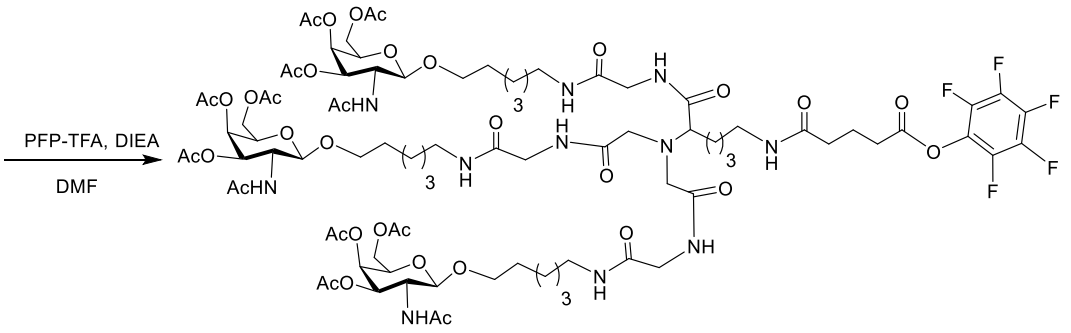
através da solução por 15 minutos. Um catalisador de Pearlman (hidróxido de paládio em carbono) foi adicionado (60 mg). O gás hidrogênio foi ebulido através da solução por 30 minutos. Após a conclusão (TLC 10% de MeOH em DCM, e LCMS), o catalisador foi removido por filtração (filtro de Teflon da ponta na seringa, 0,45 µm). O filtrado foi concentrado por evaporação giratória, e foi seco brevemente sob alto vácuo para produzir o Composto 151 (0,57 g). A LCMS foi consistente com o produto desejado. O produto foi dissolvido em 4 mL de DMF seco e foi usado imediatamente na etapa seguinte.



152



153



154

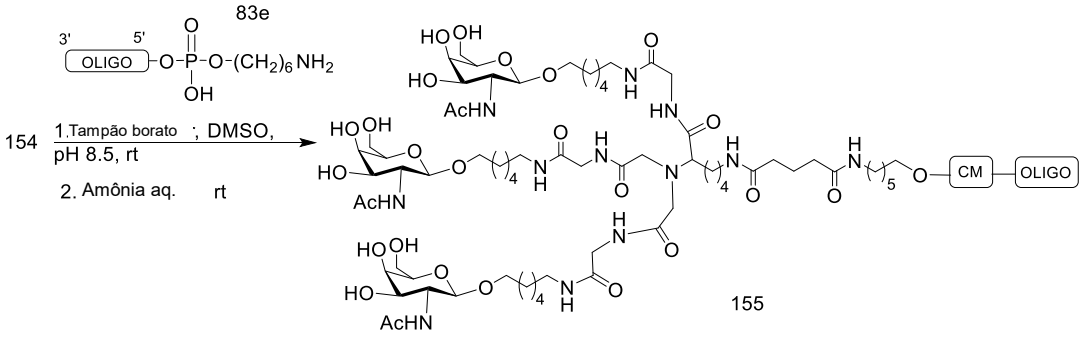
[001018] O composto 83a (0,11 g, 0,33 mmol) foi dissolvido em DMF

anidro (5 mL) e *N*,*N*-Di-isopropiletilamina (75 µL, 1 mmol) e PFP-TFA (90 µL, 0,76 mmol) foram adicionados. A mistura de reação se tornou magenta após o contato, e se torou gradualmente laranja durante os próximos 30 minutos. O progresso da reação foi monitorado por TLC e LCMS. Após a conclusão (formação de éster de PFP), uma solução do composto 151 (0,57 g, 0,33 mmol) em DMF foi adicionada. O pH da reação foi ajustado para pH = 9-10 pela adição de *N*,*N*-Di-isopropiletilamina (se necessário). A mistura de reação foi agitada sob nitrogênio por ~30 min. Após a conclusão, a maior parte do solvente foi removida sob pressão reduzida. O resíduo foi diluído com CH_2Cl_2 e lavado com $NaHCO_3$ saturado aquoso, seguido por salmoura. A fase orgânica foi separada, seca sobre $MgSO_4$, filtrada e concentrada em um xarope laranja. O resíduo foi purificado por cromatografia de coluna em sílica-gel(2-10 % MeOH em CH_2Cl_2) para produzir o Composto 152 (0,35 g, 55%). LCMS e RMN ^1H foram consistentes com o produto desejado.

[001019] O composto 152 (0,35 g, 0,182 mmol) foi dissolvido em 1:1 MeOH/EtOAc (10 mL). A mistura de reação foi purgada, ebulindo-se um fluxo de argônio através da solução por 15 minutos. Um catalisador de Pearlman (hidróxido de paládio em carbono) foi adicionado (35 mg). O gás hidrogênio foi ebulido através da solução por 30 minutos. Após a conclusão (TLC 10% de MeOH em DCM, e LCMS), o catalisador foi removido por filtração (filtro de Teflon da ponta na seringa, 0,45 µm). O filtrado foi concentrado por evaporação giratória, e foi seco brevemente sob alto vácuo para produzir o Composto 153 (0,33 g, quantitativo). A LCMS foi consistente com o produto desejado.

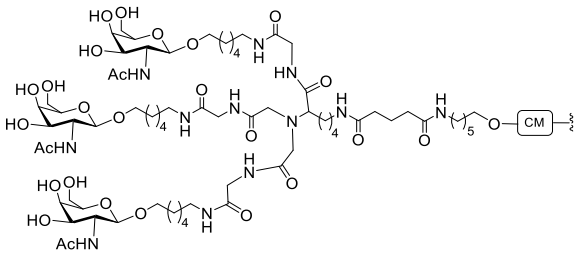
[001020] O composto 153 (0,33 g, 0,18 mmol) foi dissolvido em DMF anidro (5 mL) com agitação sob nitogênio. A isto, *N*,*N*-Di-isopropiletilamina (65 µL, 0,37 mmol) e PFP-TFA (35 µL, 0,28 mmol) foram adicionados. A mistura de reação foi agitada sob nitrogênio por ~30 min. A mistura de reação se tornou magenta após o contato, e gradualmente

se tornou laranja. O pH da mistura de reação foi mantida em pH = 9-10, adicionando-se mais *N*,N-Di-isopropiletilamina. O progresso da reação foi monitorado por TLC e LCMS. Após a conclusão, a maior parte do solvente foi removido sob pressão reduzida. O resíduo foi diluído com CH_2Cl_2 (50 mL) e lavado com $NaHCO_3$ saturado aquoso, seguido por salmoura. A camada orgânica foi seca com $MgSO_4$, filtrada e concentrada num xarope laranja. O resíduo foi purificado por cromatografia de coluna e eluído com 2-10 % MeOH em CH2Cl2 para produzir o Composto 154 (0,29 g, 79%). LCMS e RMN ^1H foram consistentes com o produto desejado.



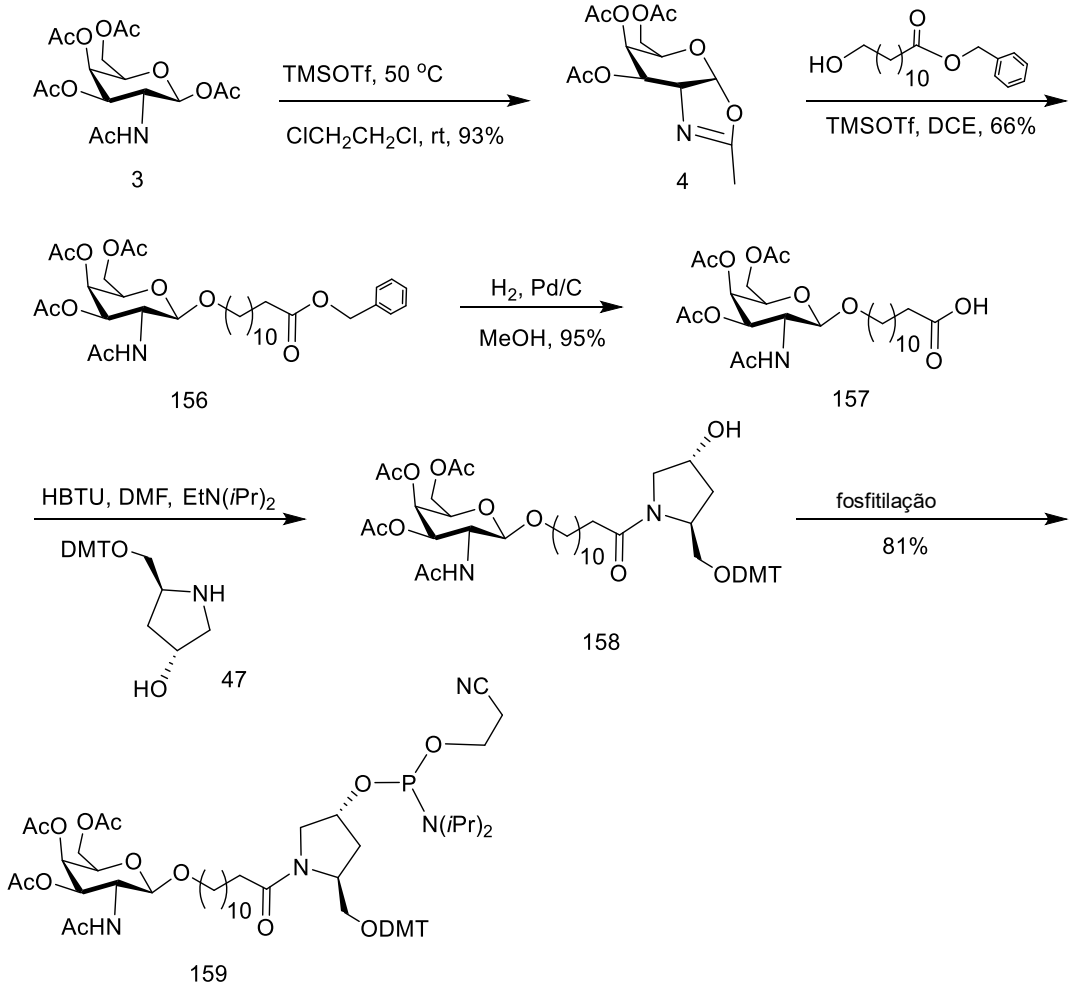
[001021] O Composto Oligomérico 155, compreendendo um grupo de conjugado de GalNAc3-6, foi preparado usando os procedimentos gerais ilustrados no Exemplo 46. A parte do agrupamento de $GalNAc_3$ do grupo de conjugado $GalNAc_3$-6 ($GalNAc_3$-6_a) pode ser combinado com qualquer porção clivável para fornecer uma variedade de grupos conjugados. Em uma certas modalidades, a porção clivável é -P(=O) (OH)-a_d- P(=O)(OH)-.

[001022] A estrutura de $GalNAc_3$-6 ($GalNAc_3$-6_{-a}-CM-) é mostrada abaixo:



.

Exemplo 52: Preparação do Oligonucleotídeo 160 Compreendendo GalNAc$_3$-9



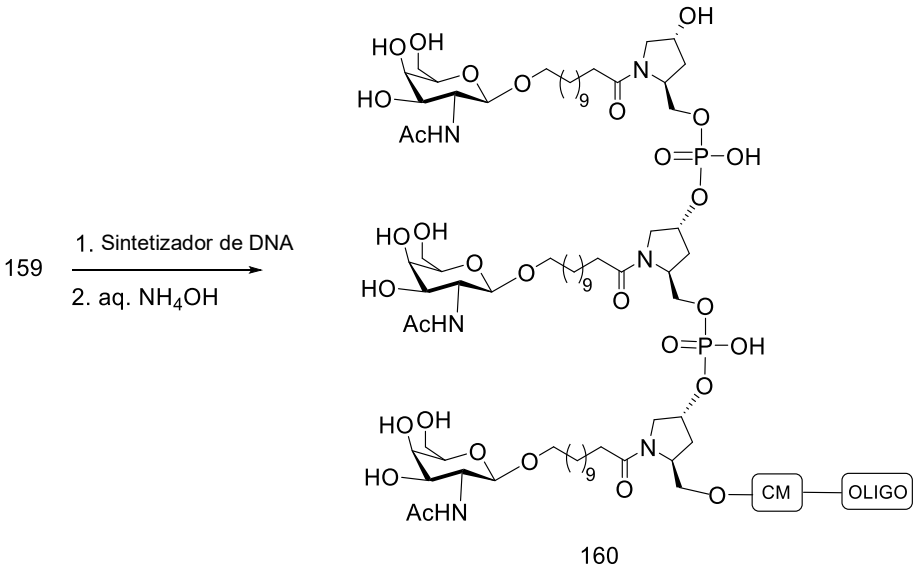
[001023] O composto 156 foi sintetizado após o procedimento descrito na literatura (*J. Med. Chem.* 2004, *47*, 5798-5808).

[001024] O composto 156, (18,60 g, 29,28 mmol) foi dissolvido em metanol (200 mL). Paládio em carbono (6,15 g, 10% em peso, carregamento (base seca), pó de carbono de matriz, úmido) foi adicionado. A mistura da reação foi agitada em temperatura ambiente sob hidrogênio por 18 h. A mistura da reação foi filtrada através de uma almofada de celite e lavada a almofada plenamente com metanol. O filtrado combinado foi lavado e concentrado à secura. O resíduo foi purificado por cromatografia de coluna em sílica-gel e eluído com 5-10% de metanol em diclorometano para produzir o Composto 157 (14,26 g, 89%). Massa

m/z 544.1 $[M + H]^+$.

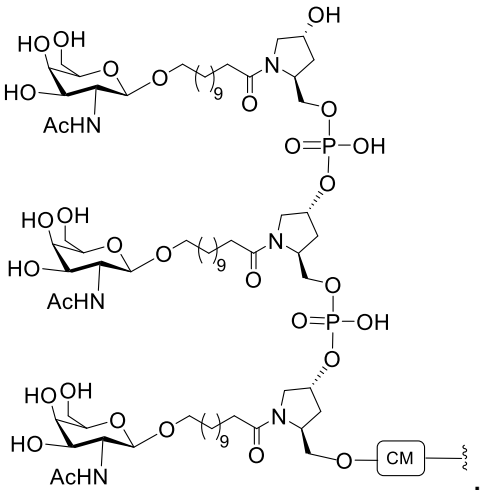
[001025] O composto 157 (5 g, 9,17 mmol) foi dissolvido em DMF anidro (30 mL). HBTU (3,65 g, 9,61 mmol) e *N*,*N*-Di-isopropiletilamina (13,73 mL, 78,81 mmol) foram adicionados e a mistura d ereação foi agitada à temperatura ambiente por 5 minutos. A isto, foi adicionada uma solução do composto 47 (2,96 g, 7,04 mmol). A reação foi agitada em temperatura ambiente por 8 h. A mistura da reação foi derramada em uma solução aquosa de $NaHCO_3$. A mistura foi extraída com acetato de etil e a camada orgânica foi lavada com salmoura e seca (Na_2SO_4), filtrada e evaporada. O resíduo foi purificado por cromatografia de coluna em sílica-gel e eluído com 50% de acetato de etil em hexano para produzir o Composto 158 (8,25g, 73,3%). A estrutura foi confirmada por MS e análise ^1H RMN.

[001026] O composto 158 (7,2 g, 7,61 mmol) foi seco com P_2O_5 sob pressão reduzida. O composto seco foi dissolvido em DMF anidro (50 mL). Para este 1H-tetrazol (0,43 g, 6,09 mmol) e *N*-metilimidazol (0,3 mL, 3,81 mmol) e 2-cianoetil-*N*,*N*,*N*',*N*'-tetraisopropil fosforodiamidita (3,65 mL, 11,50 mmol) foram adicionados. A mistura da reação foi agitada t sob uma atmosfera de argônio por 4h. A mistura da reação foi diluída com acetato de etila (200 mL). A mistura de reação foi lavada com $NaHCO_3$saturado e salmoura. A fase orgânica foi separada, seca (Na_2SO_4), filtrada e evaporada. O resíduo obtido foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel e eluído com 50-90% de acetato de etilo em hexano para produzir Composto 159 (7,82 g, 80,5%). A estrutura foi confirmada por LCMS e análise ^{31}P RMN.



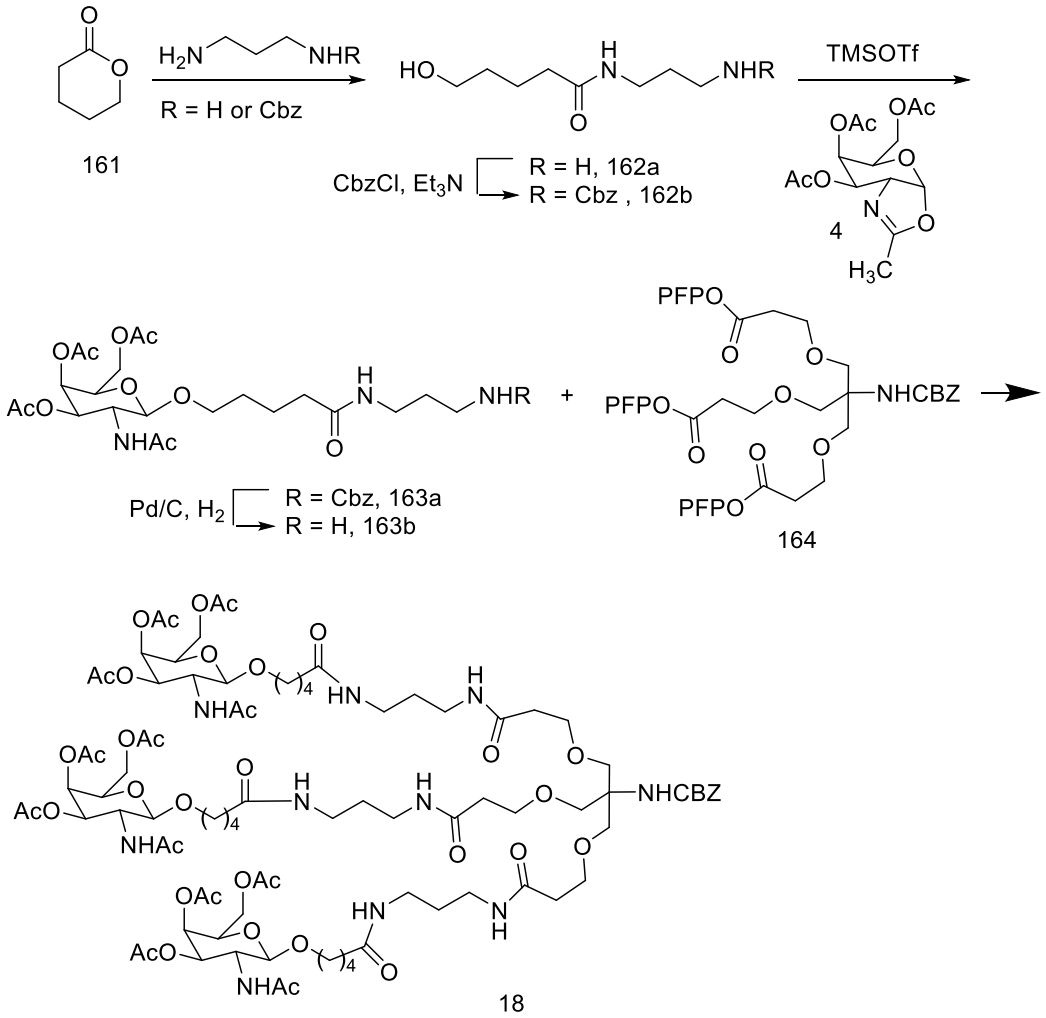
160

[001027] Composto Oligomérico 160, compreendendo um grupo de conjugado de $GalNAc_3$-9, foi preparado usando procedimentos padrão de síntese de oligonucleotídeo. Três unidades do composto 159 foram acopladas ao suporte sólido, seguido por fosforamiditas nucleotídicas. O tratamento do composto oligomérico protegido com amônia aquosa produziu o composto 160. A parte do agrupamento de $GalNAc_3$ do grupo de conjugado $GalNAc_3$-9 ($GalNAc_3$-9_a) pode ser combinado com qualquer porção clivável para fornecer uma variedade de grupos conjugados. Em uma certas modalidades, a porção clivável é -P(=O) (OH)-a_d-P(=O)(OH)-. A estrutura de $GalNAc_3$-9 ($GalNAc_3$-9_a-CM) é mostrada abaixo:



Exemplo 53: Alternam o procedimento para a preparação

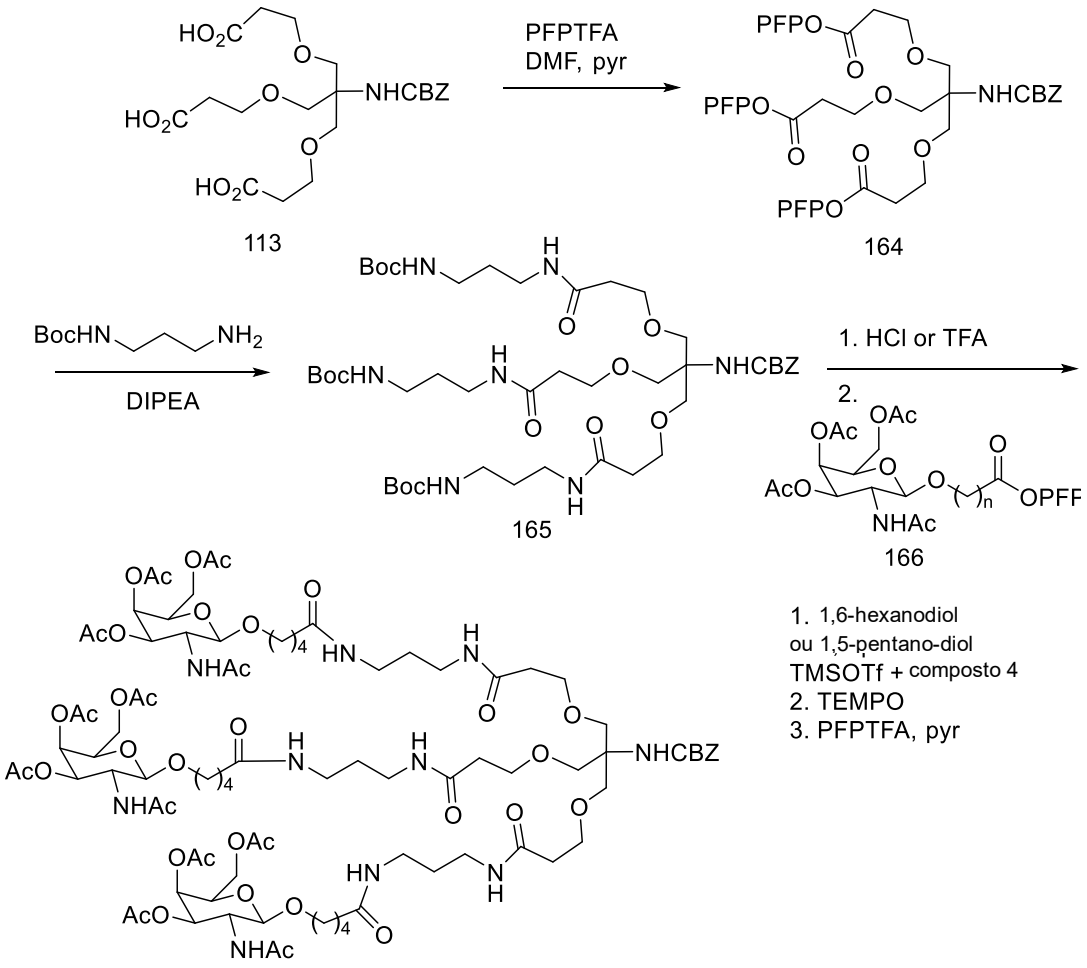
dos compostos 18 (GalNAc$_3$-1a e GalNAc$_3$-3a)



[001028] Lactona 161 foi reagida com diamino propano (3-5 eq) ou diamino propano protegido por Mono-Boc (1 eq) para fornecer álcool 162a ou 162b. Quado a propanodiamina não protegida foi usada para a reação acima, o excesso de diamina foi removido por evaporação sob alto vácuo e o grupo amino livre em 162a foi protegido usando CbzCl para fornecer o 162b como um sólido branco após a purificação por cromatografia de coluna. O álcool 162b foi também reagido com o composto 4 na presença de TMSOTf para fornecer o 163a que foi convertido em 163b pela remoção do grupo Cbz usando hidrogenação catalítica. O éster de pentafluorofenil (PFP) 164 foi preparado reagindo-se o triácido 113 (ver o Exemplo 48) com PFPTFA (3,5 eq) e piridina (3,5 eq) em DMF (0,1 a 0,5 M). O triéster 164 foi diretamente reagido com a amina

163b (3-4 eq) e DIPEA (3-4 eq) para fornecer o Composto 18. O método acima facilita grandemente a purificação dos intermediários e minimiza a formação de subprodutos que são formados usando o procedimento descrito no Exemplo 4.

Exemplo 54: Alternam o procedimento para a preparação dos compostos 18 (GalNAc$_3$-1a e GalNAc$_3$-3a)



18

[001029] O éster triPFP 164 foi preparado a partir do ácido 113 usando o procedimento delineado no exemplo 53 acima e reagido com diamina protegida por mono-Boc para fornecer o 165 num rendimento essencialmente quantitativo. Os grupos Boc foram removidos com ácido clorídrico ou ácido trifluoroacético para fornecer a triamina que foi reagida com o ácido ativado por PFP 166 na presença de uma base adequada,

tal como DIPEA para fornecer o Composto 18.

[001030] O ácido 166 Gal-NAc protegido por PFP foi preparado a partir do ácido correspondente pelo tratamento com PFPTFA (1-1,2 eq) e piridina (1-1,2 eq) em DMF. O ácido precursor, por sua vez, foi preparado a partir do álcool correspondente por oxidação usando TEMPO (0,2 eq) e BAIB em acetonitrila e água. O álcool precursor foi preparado a partir do intermediário de açúcar 4 pela reação com 1,6-hexanodiol (ou 1,5-pentanodiol ou outro diol para outros n valores) (2-4 eq) e TMSOTf usando as condições descritas anteriormente no exemplo 47.

Exemplo 55: Estudo dependente de dose de oligonucleotídeos compreendendo grupos conjugados em 3' ou 5' (comparação de GalNAc$_3$-1, 3, 8 and 9) mirando SRB-1 *in vivo*

[001031] Os oligonucleotídeos listados abaixo foram testados em um estudo dependente de dose para a inibição antissenso de SRB-1 em camundongos. ISIS 353382 não conjugado foi incluído como um padrão. Cada um dos diversos grupos conjugados de GalNAc$_3$ foi ligado tanto ao terminal 3' quanto ao 5' do oligonucleotídeos respectivo por um nucleosídeo de 2'-desoxiadenosina ligado a fosfodiéster (porção clivável).

Tabela 39

ASO modificado que se direciona ao SRB-1

ASO	Sequência (5' e 3')	Motivo	Conjugado	SEQ ID Nº
ISIS 353382 (de origem)	$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}$ T_{es}-$^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	5/10/5	nenhum	252
ISIS 655861	$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}$ $^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}$ $^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{eo}$**$A_{do'}$-GalNAc$_3$-1a**	5/10/5	GalNAc$_3$-1	253
ISIS 664078	$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}$ $^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}$ $^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{eo}$**$A_{do'}$-GalNAc$_3$-9a**	5/10/5	GalNAc$_3$-9	253
ISIS 661161	**GalNAc$_3$-3$_{a\text{-}o'}$A$_{do}$** $G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}$ $G_{ds}A_{ds}$ $^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	5/10/5	GalNAc$_3$-3	254
ISIS 665001	**GalNAc$_3$-8$_{a\text{-}o'}$A$_{do}$** $G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}$ $G_{ds}A_{ds}$ $^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	5/10/5	GalNAc$_3$-8	254

Letras maiúsculas indicam a nucleobase para cada nucleosídeo e ^{m}C indica uma 5-metilcitosina. Subscritos: "e" indica um nucleosídeo 2'-MOE modificado; "d" indica um β-D-2'-desoxirribonucleosídeo; "s" indica uma ligação internucleosídica fosforotioato (PS); "o" indica

uma ligação internucleosídica fosfodiéster (PO); e "o'" indica -O-P(=O)(OH)-. Os grupos conjugados estão em negrito.

[001032] A estrutura de $GalNAc_3$-1_a foi mostrada anteriormente no Exemplo 9. A estrutura de $GalNAc_3$-9 foi mostrada anteriormente no Exemplo 52. A estrutura de $GalNAc_3$-3 foi mostrada anteriormente no Exemplo 39. A estrutura de $GalNAc_3$-8 foi mostrada anteriormente no Exemplo 47.

Tratamento

[001033] Camundongos Balb/c machos de seis semanas de idade (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) foram injetados por via subcutânea uma vez na dosagem mostrada abaixo com ISIS 353382, 655861, 664078, 661161, 665001 ou com solução salina. Cada grupo de tratamento consistiu em 4 animais. Os camundongos foram sacrificados 72 horas após a administração final para determinar os níveis de mRNA de SRB-1 no fígado usando PCR em tempo real e reagente de quantificação de RNA RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) de acordo com protocolos padrão. Os resultados abaixo são apresentados como a porcentagem média dos níveis de mRNA de SRB-1 para cada grupo de tratamento, normalizados para o controle com salina.

[001034] Conforme ilustrado na Tabela 40, tratamento com oligonucleotídeos antissenso diminuiu os níveis de mRNA de SRB-1 de uma forma dependente da dose. De fato, os oligonucleotídeos antissenso que compreendem os conjugados de $GalNAc_3$-1 e $GalNAc_3$-9 ligados ao fosfodiéster no terminal 3' (ISIS 655861 e ISIS 664078) ou os conjugados de $GalNAc_3$-3 e $GalNAc_3$-8 ligados no teminal 5' (ISIS 661161 e ISIS 665001) mostraram melhora substancial de potência em comparação ao oligonucleotídeo antissenso não conjugado (ISIS 353382). Além disso, ISIS 664078, compreende um $GalNAc_3$-9 conjugado no terminal 3' foi essencialmente equipotentes comparado a ISIS 655861, que compreende um $GalNAc_3$-1 conjugado no terminal 3'. Os oligonucleotídeos

antissenso conjugados em 5', ISIS 661161 e ISIS 665001, que compreendem um $GalNAc_3$-3 ou $GalNAc_3$-9, respectivamente, tiveram maior potência em comparação aos oligonucleotídeos antissenso conjugados em 3' (ISIS 655861 e ISIS 664078).

Tabela 40

ASOs contendo $GalNAc_3$-1, 3, 8 ou 9 que se direciona ao SRB-1

ISIS No.	Dosagem (mg/kg)	mRNA de SRB-1 (% de Salina)	Conjugado
Salina	n/a	100	
353382	3	88	nenhum
	10	68	
	30	36	
655861	0,5	98	$GalNac_3$ -1 (3')
	1,5	76	
	5	31	
	15	20	
664078	0,5	88	$GalNac_3$-9 (3')
	1,5	85	
	5	46	
	15	20	
661161	0,5	92	$GalNac_3$-3 (5')
	1,5	59	
	5	19	
	15	11	
665001	0,5	100	$GalNac_3$-8 (5')
	1,5	73	
	5	29	
	15	13	

[001035] Os níveis de transaminase, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) hepáticas no soro foram medidos em relação aos camundongos injetados com salina usando protocolos padrão. Também foram avaliadas a bilirrubina total e BUN. A alteração nos pesos corporais foi avaliada sem nenhuma alteração significativa do grupo com salina. Os valores de ALTs, ASTs, bilirrubina total e BUN são mostrados na tabela abaixo.

Tabela 41

ISIS No.	Dosagem (mg/kg)	ALT	AST	Bilirrubina total	BUN	Conjugado
Salina		24	59	0,1	37,52	
353382	3	21	66	0,2	34,65	nenhum
	10	22	54	0,2	34,2	

	30	22	49	0,2	33,72	
655861	0,5	25	62	0,2	30,65	$GalNac_3$ -1 (3')
	1,5	23	48	0,2	30,97	
	5	28	49	0,1	32,92	
	15	40	97	0,1	31,62	
664078	0,5	40	74	0,1	35,3	$GalNac_3$-9 (3')
	1,5	47	104	0,1	32,75	
	5	20	43	0,1	30,62	
	15	38	92	0,1	26,2	
661161	0,5	101	162	0,1	34,17	$GalNac_3$-3 (5')
	1,5 g	42	100	0,1	33,37	
	5 g	23	99	0,1	34,97	
	15	53	83	0,1	34,8	
665001	0,5	28	54	0,1	31,32	$GalNac_3$-8 (5')
	1,5	42	75	0,1	32,32	
	5	24	42	0,1	31,85	
	15	32	67	0,1	31,	

Exemplo 56: Estudo dependente de dose de oligonucleotídeos compreendendo grupos de conjugados em 3' e em 5' (comparação de $GalNAc_3$-1, 2, 3, 5, 6, 7 e 10) direcionando ao SRB-1 *in vivo*

[001036] Os oligonucleotídeos listados abaixo foram testados em um estudo dependente de dose para a inibição antissenso de SRB-1 em camundongos. ISIS 353382 não conjugado foi incluído como um padrão. Cada um dos diversos grupos de conjugado de $GalNAc_3$ foi ligado ao terminal 5' do respectivo oligonucleotídeo por um nucleosídeo de 2'-desoxiadenosina ligado a fosfodiéster (porção clivável), exceto pelo ISIS 655861 que teve o grupo de conjugado de $GalNAc_3$ ligado no terminal 3'.

Tabela 42

ASO modificado que se direciona ao SRB-1

ASO	Sequência (5' e 3')	Motivo	**Conjugado**	SEQ ID Nº
ISIS 353382 (de origem)	$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}$ $^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}$ $^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	5/10/5	nenhum conjugado	252
ISIS 655861	$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}$ $^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}$ $^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{eo}$**$A_{do'}$-GalNAc$_{3-1a}$**	5/10/5	**$GalNAc_3$-1**	253
ISIS 664507	**$GalNAc_3$-2$_{a-o'}$$A_{do}$**$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}$ $^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}$ $A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}Te$	5/10/5	**$GalNAc_3$-2**	254
ISIS 661161	**$GalNAc_3$-3$_{a-o'}$$A_{do}$** $G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}$ $G_{ds}A_{ds}$ $^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}Te$	5/10/5	**$GalNAc_3$-3**	254
ISIS 666224	**$GalNAc_3$-5$_{a-o'}$$A_{do}$**$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}$ $^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}$ $G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}Te$	5/10/5	**$GalNAc_3$-5**	254
ISIS 666961	**$GalNAc_3$-6$_{a-o'}$$A_{do}$**$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}$ $^{m}C_{ds}A_{ds}$ $T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}Te$	5/10/5	**$GalNAc_3$-6**	254
ISIS 666981	**$GalNAc_3$-7$_{a-o'}$$A_{do}$**$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}$ $^{m}C_{ds}A_{ds}$ $T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}Te$	5/10/5	**$GalNAc_3$-7**	254
ISIS 666881	**$GalNAc_3$-10$_{a-o'}$$A_{do}$**$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}$ $^{m}C_{ds}A_{ds}$ $T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}Te$	5/10/5	**$GalNAc_3$-10**	254

Letras maiúsculas indicam a nucleobase para cada nucleosídeo e ^{m}C indica uma 5-metilcitosina. Subscritos: "e" indica um nucleosídeo 2'-MOE modificado; "d" indica um β-D-2'-desoxirribonucleosídeo; "s" indica uma ligação internucleosídica fosforotioato (PS); "o" indica uma ligação internucleosídica fosfodiéster (PO); e "o'" indica -O-P(=O)(OH)-. Os grupos conjugados estão em negrito.

[001037] A estrutura de $GalNAc_3$-1_a foi mostrada anteriormente no Exemplo 9. A estrutura de $GalNAc_3$-2_a foi mostrada anteriormente no Exemplo 37. A estrutura de $GalNAc_3$-3_a foi mostrada anteriormente no Exemplo 39. A estrutura de $GalNAc_3$-5_a foi mostrada anteriormente no Exemplo 49. A estrutura de $GalNAc_3$-6_a foi mostrada anteriormente no Exemplo 51. A estrutura de $GalNAc_3$-7_a foi mostrada anteriormente no Exemplo 48. A estrutura de $GalNAc_3$-10_a foi mostrada anteriormente no Exemplo 46

Tratamento

[001038] Camundongos Balb/c machos de seis semanas de idade (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) foram injetados uma vez na dosagem mostrada abaixo com ISIS 353382, 655861, 664507, 661161, 666224, 666961, 666981, 666881 ou com solução salina. Cada grupo de tratamento consistiu em 4 animais. Os camundongos foram sacrificados 72 horas após a administração final para determinar os níveis de mRNA de SRB-1 no fígado usando PCR em tempo real e reagente de quantificação de RNA RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) de acordo com protocolos padrão. Os resultados abaixo são apresentados como a porcentagem média dos níveis de mRNA de SRB-1 para cada grupo de tratamento, normalizados para o controle com salina.

[001039] Conforme ilustrado na Tabela 43, o tratamento com oligonucleotídeos antissenso diminuiu os níveis de mRNA de SRB-1 de uma forma dependente da dose. De fato, os oligonucleotídeos antissenso

mostraram melhora substancial na potência em comparação ao oligonucleotídeo antissenso não conjugado (ISIS 353382). Os oligonucleotídeos antissenso conjugados em 5' mostraram um ligeiro aumento na potência em comparação ao oligonucleotídeo antissenso conjugado em 3'.

Tabela 43

ISIS No.	Dosagem (mg/kg)	mRNA de SRB-1 (% de Salina)	Conjugado
Salina	n/a	100,0	
353382	3	96,0	nenhum
	10	73,1	
	30	36,1	
655861	0,5	99,4	**GalNac$_3$ -1 (3')**
	1,5	81,2	
	5	33,9	
	15	15,2	
664507	0,5	102,0	**GalNac$_3$-2 (5')**
	1,5	73,2	
	5	31,3	
	15	10,8	
661161	0,5	90,7	**GalNac$_3$-3 (5')**
	1,5	67,6	
	5	24,3	
	15	11,5	
666224	0,5	96,1	**GalNac$_3$-5 (5')**
	1,5	61,6	
	5	25,6	
	15	11,7	
666961	0,5	85,5	**GalNAc$_3$-6 (5')**
	1,5	56,3	
	5	34,2	
	15	13,1	
666981	0,5	84,7	**GalNAc$_3$-7 (5')**
	1,5	59,9	
	5	24,9	
	15	8,5	
666881	0,5	100,0	**GalNAc$_3$-10 (5')**
	1,5	65,8	
	5	26,0	
	15	13,0	

[001040] Os níveis de transaminase, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) hepáticas no soro foram medidos em relação aos camundongos injetados com salina usando protocolos padrão. Também foram avaliadas a bilirrubina total e BUN. A alteração nos pesos corporais foi avaliada sem nenhuma alteração significativa do grupo com salina. Os valores de ALTs, ASTs, bilirrubina total e BUN são mostrados na Tabela 44 abaixo.

Tabela 44

ISIS No.	Dosagem (mg/kg)	ALT	AST	Bilirrubina total	BUN	Conjugado
Salina		26	57	0,2	27	
353382	3	25	92	0,2	27	nenhum
	10	23	40	0,2	25	
	30	29	54	0,1	28	
655861	0,5	25	71	0,2	34	**$GalNac_3$ -1 (3')**
	1,5	28	60	0,2	26	
	5	26	63	0,2	28	
	15	25	61	0,2	28	
664507	0,5	25	62	0,2	25	**$GalNac_3$-2 (5')**
	1,5	24	49	0,2	26	
	5	21	50	0,2	26	
	15	59	84	0,1	22	
661161	0,5	20	42	0,2	29	**$GalNac_3$-3 (5')**
	1,5 g	37	74	0,2	25	
	5 g	28	61	0,2	29	
	15	21	41	0,2	25	
666224	0,5	34	48	0,2	21	**$GalNac_3$-5 (5')**
	1,5	23	46	0,2	26	
	5	24	47	0,2	23	
	15	32	49	0,1	26	
666961	0,5	17	63	0,2	26	**$GalNAc_3$-6 (5')**
	1,5	23	68	0,2	26	
	5	25	66	0,2	26	
	15	29	107	0,2	28	
666981	0,5	24	48	0,2	26	**$GalNAc_3$-7 (5')**
	1,5	30	55	0,2	24	
	5	46	74	0,1	24	
	15	29	58	0,1	26	
666881	0,5	20	65	0,2	27	**$GalNAc_3$-10 (5')**
	1,5	23	59	0,2	24	
	5	45	70	0,2	26	
	15	21	57	0,2	24	

Exemplo 57: Duração do estudo de ação de oligonucleotídeos compreendendo um grupo de conjugado em 3' que se direciona a ApoC III *in vivo*

[001041] Camundongos foram injetados uma vez que as doses indicadas abaixo e monitorados durante o curso de 42 dias para os níveis de ApoC-III e de triglicerídeos plasmáticos (TG plasmático). O estudo foi realizado usando 3 camundongos transgênicos que expressam a APOC-III humana em cada grupo.

Tabela 45

ASO modificado que se direciona à ApoC III

ASO	Sequência (5' e 3')	Ligações	SEQ ID Nº
ISIS 304801	$A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}$ $^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{es}T_{es}T_{es}A_{es}T_{e}$	PS	244
ISIS 647535	$A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}$ $A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{es}T_{es}T_{es}A_{es}$-$T_{eo}\mathbf{A_{do'}}$-**$GalNAc_3$-$1_a$**	PS	245
ISIS 647536	$A_{es}G_{eo}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}$ $A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{eo}T_{eo}T_{es}A_{es}T_{eo}\mathbf{A_{do'}}$-**$GalNAc_3$-$1_a$**	PO/PS	245

Letras maiúsculas indicam a nucleobase para cada nucleosídeo e ^{m}C indica uma 5-metilcitosina. Subscritos: "e" indica um nucleosídeo 2'-MOE modificado; "d" indica um β-D-2'-desoxirribonucleosídeo; "s" indica uma ligação internucleosídica fosforotioato (PS); "o" indica uma ligação internucleosídica fosfodiéster (PO); e "o'" indica -O-P(=O)(OH)-. Os grupos conjugados estão em negrito.

[001042] A estrutura de GalNAc$_3$-1$_a$ foi mostrada anteriormente no Exemplo 9.

Tabela 46

Níveis de mRNA de ApoC III (% de Salina no Dia 1) e TG Plasmático (% de Salina no Dia 1)

ASO	Dose	Alvo	Dia 3	Dia 7	Dia 14	Dia 35	Dia 42
Salina	0 mg/kg	ApoC-III	98	100	100	95	116
ISIS 304801	30 mg/kg	ApoC-III	28	30	41	65	74
ISIS 647535	10 mg/kg	ApoC-III	16	19	25	74	94
ISIS 647536	10 mg/kg	ApoC-III	18	16	17	35	51
Salina	0 mg/kg	TG Plasmático	121	130	123	105	109
ISIS 304801	30 mg/kg	TG Plasmático	34	37	50	69	69
ISIS 647535	10 mg/kg	TG Plasmático	18	14	24	18	71
ISIS 647536	10 mg/kg	TG Plasmático	21	19	15	32	35

[001043] Como pode ser visto na tabela acima, a duração da ação aumentou com a adição do grupo de conjugado em 3' em comparação ao oligonucleotídeo não conjugado. Houver um aumento adicional na duração da ação para o oligonucleotídeo de PO/PS misto conjugado 647536 em comparação ao oligonucleotídeo PS completo conjugado 647535.

Exemplo 58: Estudo dependente de dose de oligonucleotídeos compreendendo grupos de conjugados em 3' (comparação de GalNAc$_3$-1 e GalNAc$_4$-11) direcionando ao SRB-1 *in vivo*

[001044] Os oligonucleotídeos listados abaixo foram testados em um estudo dependente de dose para a inibição antissenso de SRB-1 em camundongos. ISIS 440762 não conjugado foi incluído como um padrão não conjugado. Cada um dos grupos de conjugado foi ligado no terminal 3' do respectivo oligonucleotídeo por uma porção clivável do nucleosídeo de 2'-desoxiadenosina ligado a fosfodiéster

[001045] A estrutura de $GalNAc_3$-1_a foi mostrada anteriormente no Exemplo 9. A estrutura de $GalNAc_3$-11_a foi mostrada anteriormente no Exemplo 50.

Tratamento

[001046] Camundongos Balb/c machos de seis semanas de idade (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) foram injetados por via subcutânea uma vez na dosagem mostrada abaixo com ISIS 440762, 651900, 663748 ou com solução salina. Cada grupo de tratamento consistiu em 4 animais. Os camundongos foram sacrificados 72 horas após a administração final para determinar os níveis de mRNA de SRB-1 no fígado usando PCR em tempo real e reagente de quantificação de RNA RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) de acordo com protocolos padrão. Os resultados abaixo são apresentados como a porcentagem média dos níveis de mRNA de SRB-1 para cada grupo de tratamento, normalizados para o controle com salina.

[001047] Conforme ilustrado na Tabela 47, o tratamento com oligonucleotídeos antissenso diminuiu os níveis de mRNA de SRB-1 de uma forma dependente da dose. Os oligonucleotídeos antisensos, compreendendo o fosfodiéster ligado $GalNAc_3$-1 e $GalNAc_4$-11 conjugados no terminal 3' (ISIS 651900 e ISIS 663748) mostraram melhoria substancial na potência em comparação com o antisenso não conjugado do oligonucleotídeo (ISIS 440762). Os dois oligonucleotídeos conjugados, $GalNAc_3$-1 e $GalNAc_4$-11, foram equipotentes.

Tabela 47

ASO modificado que se direciona ao SRB-1

ASO	Sequência (5' e 3')	Dose mg/kg	% Controle com salina	SEQ ID Nº
Salina			100	
ISIS 440762	$T_{ks}{}^{m}C_{ks}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ks}{}^{m}C_{k}$	0,6	73,45	246
		2	59,66	
		6	23,50	
ISIS 651900	$T_{ks}{}^{m}C_{ks}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ks}{}^{m}C_{ko}A_{do}$-$GalNAc_3$-$1_a$	0,2	62,75	247
		0,6	29,14	
		2	8,61	
		6	5,62	
ISIS 663748	$T_{ks}{}^{m}C_{ks}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ks}{}^{m}C_{ko}A_{do}$-$GalNAc_4$-$11_a$	0,2	63,99	247
		0,6	33,53	

		2	7,58	
		6	5,52	

Letras maiúsculas indicam a nucleobase para cada nucleosídeo e ^{m}C indica uma 5-metilcitosina. Subscritos: "e" indica um nucleosídeo 2'-MOE modificado; "k" indica um nucleosídeo bicíclico 6'-*(S)*-CH_3; "d" indica um β-D-2'-desoxirribonucleosídeo; "s" indica uma ligação internucleosídica fosforotioato (PS); "o" indica uma ligação internucleosídica fosfodiéster (PO); e "o'" indica -O-P(=O)(OH)-. Os grupos conjugados estão em negrito.

[001048] Os níveis de transaminase, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) hepáticas no soro foram medidos em relação aos camundongos injetados com salina usando protocolos padrão. Também foram avaliadas a bilirrubina total e BUN. A alteração nos pesos corporais foi avaliada sem nenhuma alteração significativa do grupo com salina. Os valores de ALTs, ASTs, bilirrubina total e BUN são mostrados na Tabela 48 abaixo.

Tabela 48

ISIS No.	Dosagem (mg/kg)	ALT	AST	Bilirrubina total	BUN	Conjugado
Salina		30	76	0,2	40	
440762	0,60	32	70	0,1	35	nenhum
	2	26	57	0,1	35	
	6	31	48	0,1	39	
651900	0,2	32	115	0,2	39	**$GalNac_3$ -1 (3')**
	0,6	33	61	0,1	35	
	2	30	50	0,1	37	
	6	34	52	0,1	36	
663748	0,2	28	56	0,2	36	**$GalNac_4$-11 (3')**
	0,6	34	60	0,1	35	
	2	44	62	0,1	36	
	6	38	71	0,1	33	

Exemplo 59: Efeitos do conjugado $GalNAc_3$-1 direcionando FXI *in vivo*

[001049] Os oligonucleotídeos listados abaixo foram testados em um estudo de doses múltiplas para a inibição antissenso de FXI em camundongos. ISIS 404071 foi incluído como um padrão não conjugado. Cada um dos grupos de conjugado foi ligado no terminal 3' do respectivo oligonucleotídeo por uma porção clivável de nucleosídeo de 2'-desoxiadenosina ligado a fosfodiéster.

Tabela 49

ASOs modificados direcionados ao FXI

ASO	Sequência (5' e 3')	Ligações	SEQ ID Nº
ISIS 404071	$T_{es}G_{es}G_{es}T_{es}A_{es}A_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}$ $T_{ds}T_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{es}G_{es}A_{es}G_{es}G_{e}$	PS	255
ISIS 656172	$T_{es}G_{es}G_{es}T_{es}A_{es}A_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}$ $T_{ds}T_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{es}G_{es}A_{es}G_{es}G_{eo}\mathbf{A_{do'}\text{-}GalNAc_3\text{-}1_a}$	PS	256
ISIS 656173	$T_{es}G_{eo}G_{eo}T_{eo}A_{eo}A_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{e}$-$_{o}G_{eo}A_{es}G_{es}G_{eo}\mathbf{A_{do'}\text{-}GalNAc_3\text{-}1_a}$	PO/PS	256

Letras maiúsculas indicam a nucleobase para cada nucleosídeo e ^{m}C indica uma 5-metilcitosina. Subscritos: "e" indica um nucleosídeo 2'-MOE modificado; "d" indica um β-D-2'-desoxirribonucleosídeo; "s" indica uma ligação internucleosídica fosforotioato (PS); "o" indica uma ligação internucleosídica fosfodiéster (PO); e "o'" indica -O-P(=O)(OH)-. Os grupos conjugados estão em negrito.

[001050] A estrutura de $GalNAc_3\text{-}1_a$ foi mostrada anteriormente no Exemplo 9.

Tratamento

[001051] Camundongos Balb/c machos de seis semanas de idade (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) foram injetados por via subcutânea duas vezes por semana por 3 semanas na dosagem mostrada abaixo com ISIS 404071, 656172, 656173 ou controle tratado com PBS. Cada grupo de tratamento consistiu em 4 animais. Os camundongos foram sacrificados 72 horas após a administração final para determinar os níveis de mRNA de FXI no fígado usando PCR em tempo real e reagente de quantificação de RNA RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) de acordo com protocolos padrão. Os níveis da proteína FXI plasmáticos também foram medidos usando ELISA. Os níveis de mRNA de FXI foram determinados em relação ao RNA total (usando RIBOGREEN®), antes da normalização para controles tratados com PBS. Os resultados são apresentados a seguir como a porcentagem média dos níveis de mRNA de FXI para cada grupo de tratamento. Os dados foram normalizados para os controles tratados com PBS e é denotado como "% de PBS". Os ED_{50}s foram medidos usando métodos semelhantes, conforme descrito anteriormente e são apresentados a

seguir.

Tabela 50

mRNA do Fator XI (% de Salina)

ASO	Dose mg/kg	% de Controle	Conjugado	Ligações
Salina		100	nenhum	
ISIS 404071	3	92	nenhum	PS
	10	40		
	30	15		
ISIS 656172	0,7	74	**GalNAc$_3$-1**	PS
	2	33		
	6	9		
ISIS 656173	0,7	49	**GalNAc$_3$-1**	PO/PS
	2	22		
	6	1		

[001052] Conforme ilustrado na Tabela 50, o tratamento com oligonucleotídeos antissenso diminuiu os níveis de mRNA de FXI de uma forma dependente da dose. Os oligonucleotídeos que compreendem um grupo de conjugado de 3'-GalNAc$_3$-1 mostraram melhoria substancial na potência em comparação com o antissenso não conjugado do oligonucleotídeo (ISIS 404071). Entre os dois oligonucleotídeos conjugados, uma melhora na potência foi ainda fornecida, substituindo-se algumas das ligações PS por PO (ISIS 656173).

[001053] Conforme ilustrado na Tabela 50a, o tratamento com oligonucleotídeos antissenso diminuiu os níveis de da proteína FXI de uma forma dependente da dose. Os oligonucleotídeos que compreendem um grupo de conjugado de 3'-GalNAc$_3$-1 mostraram melhoria substancial na potência em comparação com o antissenso não conjugado do oligonucleotídeo (ISIS 404071). Entre os dois oligonucleotídeos conjugados, uma melhora na potência foi ainda fornecida, substituindo-se algumas das ligações PS por PO (ISIS 656173).

Tabela 50a

Proteína Fator XI (% de Salina)

ASO	Dose mg/kg	Proteína (% de controle)	Conjugado	Ligações
Salina		100	nenhum	
ISIS 404071	3	127	nenhum	PS
	10	32		
	30	3		
ISIS 656172	0,7	70	**GalNAc$_3$-1**	PS

	2	23		
	6	1		
ISIS 656173	0,7	45	**GalNAc$_3$-1**	PO/PS
	2	6		
	6	0		

[001054] Os níveis de transaminase, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) hepáticas no soro foram medidos em relação aos camundongos injetados com salina usando protocolos padrão. Bilirrubina total, albumina total, CRE e BUN também foram avaliados. A alteração nos pesos corporais foi avaliada sem nenhuma alteração significativa do grupo com salina. Os valores de ALTs, ASTs, bilirrubina total e BUN são mostrados na tabela abaixo.

Tabela 51

ISIS No.	Dosagem (mg/kg)	ALT	AST	Albumina total	Bilirrubina total	CRE	BUN	Conjugado
Salina		71,8	84,0	3,1	0,2	0,2	22,9	
404071	3	152,8	176,0	3,1	0,3	0,2	23,0	nenhum
	10	73,3	121,5	3,0	0,2	0,2	21,4	
	30	82,5	92,3	3,0	0,2	0,2	23,0	
656172	0,7	62,5	111,5	3,1	0,2	0,2	23,8	**GalNac$_3$ -1 (3')**
	2	33,0	51,8	2,9	0,2	0,2	22,0	
	6	65,0	71,5	3,2	0,2	0,2	23,9	
656173	0,7	54,8	90,5	3,0	0,2	0,2	24,9	**GalNac$_3$ -1 (3')**
	2	85,8	71,5	3,2	0,2	0,2	21,0	
	6	114,0	101,8	3,3	0,2	0,2	22,7	

Exemplo 60: Efeitos de ASOs conjugados que se direcionam ao SRB-1 *in vitro*

[001055] Os oligonucleotídeos listados abaixo foram testados em um estudo de doses múltiplas para inibição antissenso de SRB-1 em hepatócitos de camundongo primários. ISIS 353382 foi incluído como um padrão não conjugado. Cada um dos grupos de conjugado foi ligado no terminal 3' ou 5' do respectivo oligonucleotídeo por uma porção clivável de nucleosídeo de 2'-desoxiadenosina ligado a fosfodiéster.

Tabela 52

ASO modificado que se direciona ao SRB-1

ASO	Sequência (5' e 3')	Motivo	Conjugado	SEQ ID Nº
ISIS 353382	$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}$ $^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}$-$^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	5/10/5	nenhum	252
ISIS 655861	$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}$ $^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}$-$^{m}C_{es}T_{es}T_{eo}$**$A_{do'}$-GalNAc$_3$-1a**	5/10/5	**GalNAc$_3$-1**	253
ISIS 655862	$G_{es}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{eo}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}$ $^{m}C_{ds}T_{ds}T_{eo}{}^{m}C_{eo}$ $^{m}C_{es}T_{es}T_{eo}$**$A_{do'}$-GalNAc$_3$-1$_a$**	5/10/5	**GalNAc$_3$-1**	253

ISIS 661161	**GalNAc$_3$-3$_{a\text{-}o'}$A$_{do}$**G$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$A$_{ds}$G$_{ds}$ T$_{ds}$^{m}C$_{ds}$A$_{ds}$T$_{ds}$G$_{d}$ $_{s}$A$_{ds}$^{m}C$_{ds}$T$_{ds}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{e}$	5/10/5	**GalNAc$_3$-3**	254
ISIS 665001	**GalNAc$_3$-8$_{a\text{-}o'}$A$_{do}$**G$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$A$_{ds}$G$_{ds}$ T$_{ds}$^{m}C$_{ds}$A$_{ds}$T$_{ds}$ G$_{ds}$A$_{ds}$^{m}C$_{ds}$T$_{ds}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{e}$	5/10/5	**GalNAc$_3$-8**	254
ISIS 664078	G$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$A$_{ds}$G$_{ds}$T$_{ds}$^{m}C$_{ds}$A$_{ds}$T$_{ds}$G$_{ds}$A$_{ds}$ ^{m}C$_{ds}$T$_{ds}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$- ^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{eo}$**A$_{do'}$-GalNAc$_3$-9a**	5/10/5	**GalNAc$_3$-9**	253
ISIS 666961	**GalNAc$_3$-6$_{a\text{-}o'}$A$_{do}$**G$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$A$_{ds}$G$_{ds}$T$_{ds}$^{m}C$_{ds}$A$_{ds}$T$_{ds}$G$_{ds}$ A$_{ds}$^{m}C$_{ds}$T$_{ds}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$Te	5/10/5	**GalNAc$_3$-6**	254
ISIS 664507	**GalNAc$_3$-2$_{a\text{-}o'}$A$_{do}$**G$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$A$_{ds}$G$_{ds}$T$_{ds}$ ^{m}C$_{ds}$A$_{ds}$T$_{ds}$G$_{ds}$ A$_{ds}$^{m}C$_{ds}$T$_{ds}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$Te	5/10/5	**GalNAc$_3$-2**	254
ISIS 666881	**GalNAc$_3$-10$_{a\text{-}o'}$A$_{do}$**G$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$A$_{ds}$G$_{ds}$T$_{ds}$ ^{m}C$_{ds}$A$_{ds}$T$_{ds}$G$_{ds}$ A$_{ds}$^{m}C$_{ds}$T$_{ds}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$Te	5/10/5	**GalNAc$_3$-10**	254
ISIS 666224	GalNAc3-5a-o'AdoGesmCesTesTesmCesAds Gds Tdsm CdsAdsTdsGdsAdsmCdsTdsTesmCesmCesTesTe	5/10/5	**GalNAc$_3$-5**	254
ISIS 666981	**GalNAc$_3$-7$_{a\text{-}o'}$A$_{do}$**G$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$A$_{ds}$G$_{ds}$T$_{ds}$ ^{m}C$_{ds}$A$_{ds}$T$_{ds}$ G$_{ds}$A$_{ds}$^{m}C$_{ds}$T$_{ds}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$Te	5/10/5	**GalNAc$_3$-7**	254

Letras maiúsculas indicam a nucleobase para cada nucleosídeo e ^{m}C indica uma 5-metilcitosina. Subscritos: "e" indica um nucleosídeo 2'-MOE modificado; "d" indica um β-D-2'-desoxirribonucleosídeo; "s" indica uma ligação internucleosídica fosforotioato (PS); "o" indica uma ligação internucleosídica fosfodiéster (PO); e "o'" indica -O-P(=O)(OH)-. Os grupos conjugados estão em negrito.

[001056] A estrutura de GalNAc$_3$-1$_a$ foi mostrada anteriormente no Exemplo 9. A estrutura de GalNAc$_3$-3a foi mostrada anteriormente no Exemplo 39. A estrutura de GalNAc$_3$-8a foi mostrada anteriormente no Exemplo 47. A estrutura de GalNAc$_3$-9a foi mostrada anteriormente no Exemplo 52. A estrutura de GalNAc$_3$-6a foi mostrada anteriormente no Exemplo 51. A estrutura de GalNAc$_3$-2a foi mostrada anteriormente no Exemplo 37. A estrutura de GalNAc$_3$-10a foi mostrada anteriormente no Exemplo 46. A estrutura de GalNAc$_3$-5a foi mostrada anteriormente no Exemplo 49. A estrutura de GalNAc$_3$-7a foi mostrada anteriormente no Exemplo 48.

Tratamento

[001057] Os oligonucleotídeos listados acima foram testados *in vitro* em células hepatócitos primários de camundongo colocadas numa densidade de 25.000 células por poço e tratadas com 0,03, 0,08, 0,24, 0,74, 2,22, 6,67 ou 20 nM de oligonucleotídeo modificado. Após um período de tratamento de aproximadamente 16 horas, o RNA foi isolado das células e os níveis de mRNA foram medidos por PCR em tempo rea quantitativa e os níveis de mRNA de SRB-1 foram ajustados de acordo com

o conteúdo total de RNA, conforme medido por RIBOGREEN®.

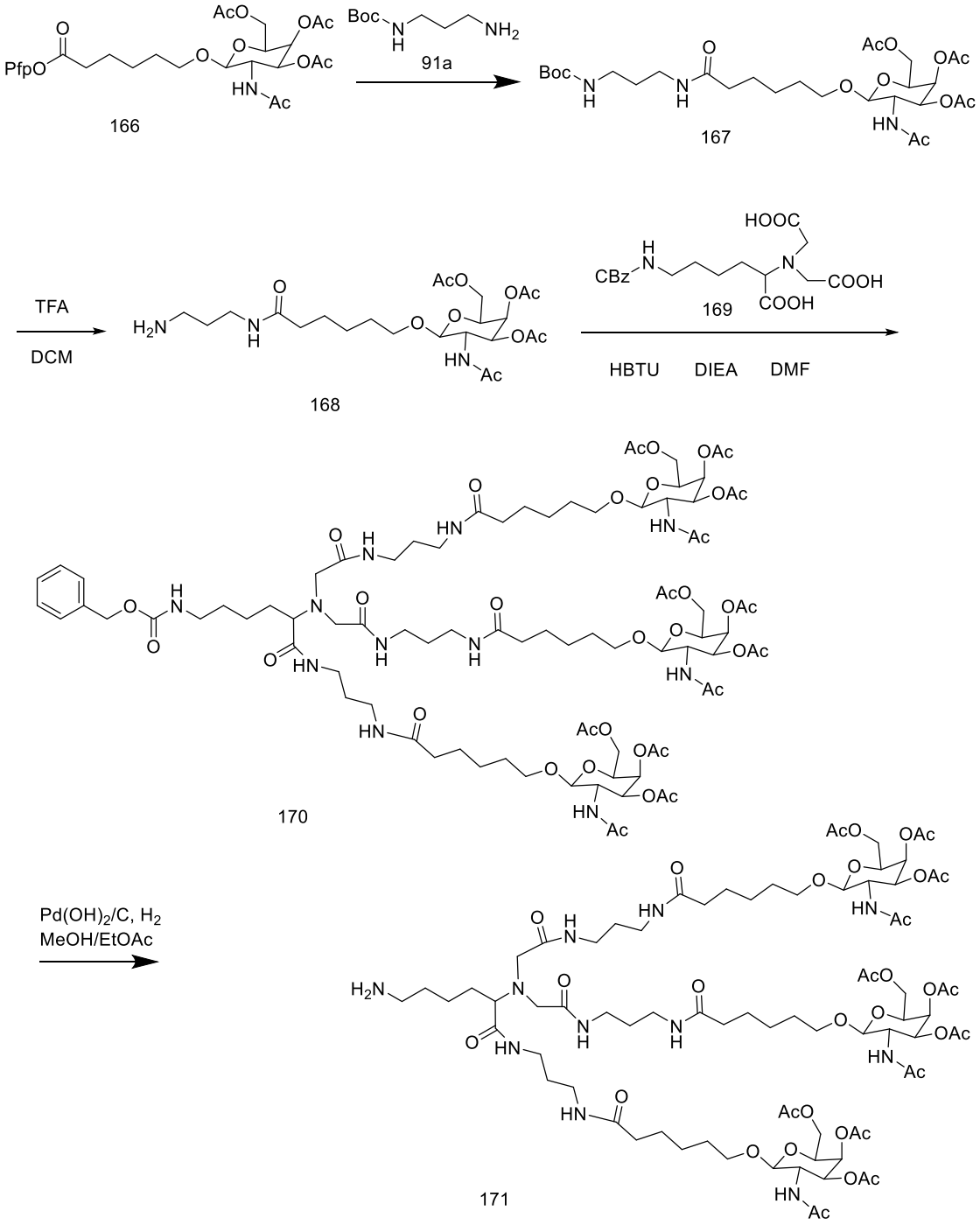
[001058] A IC_{50} foi calculada usando métodos padrão e os resultados são apresentados na Tabela 53. Os resultados mostram que, sob condições de absorção livre nas quais nenhum reagente ou nenhuma técnica de eletroporação são usados para promover artificialmente a entrada dos oligonucleotídeos nas células, os oligonucleotídeos que compreendem um conjugado de GalNAc foram significativamente mais potentes nos hepatócitos do que o oligonucleotídeo de origem (ISIS 353382) que não compreende um conjugado de GalNAc.

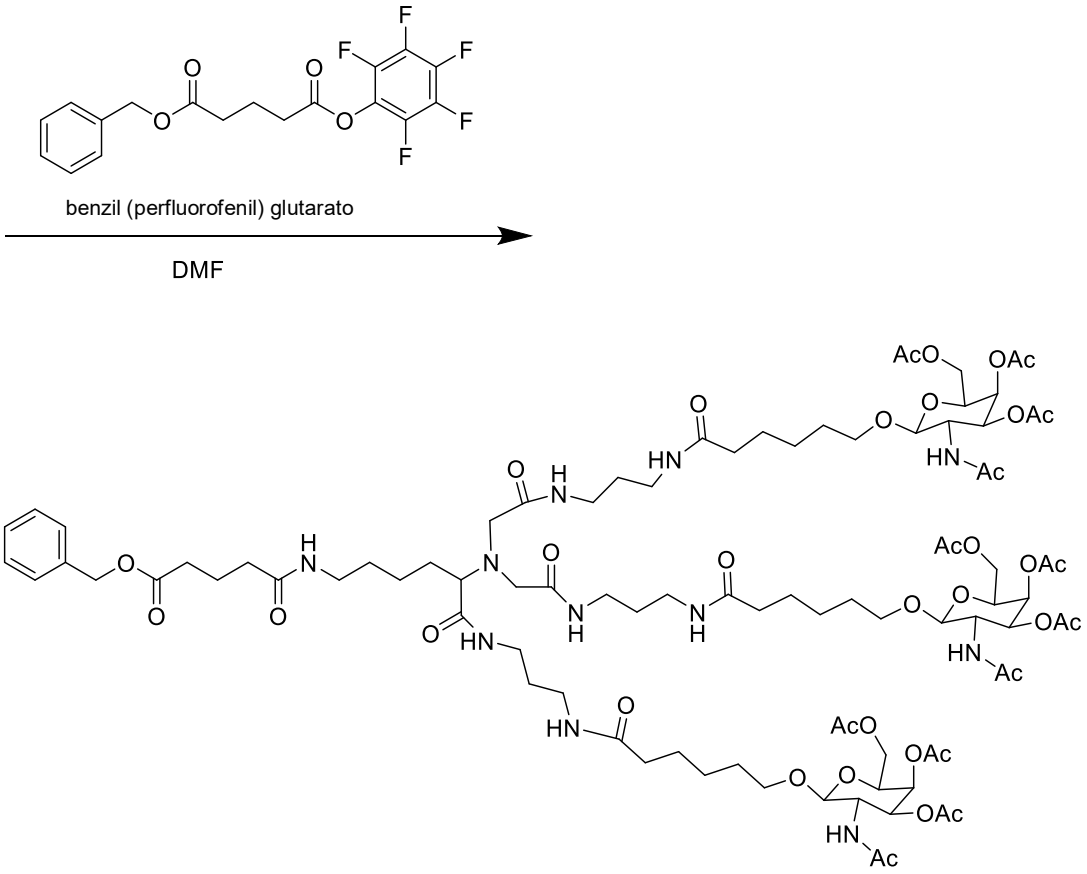
Tabela 53

ASO	IC_{50} (nM)	Ligações internucleosídicas	Conjugado	SEQ ID Nº
ISIS 353382	190[a]	PS	nenhum	252
ISIS 655861	11[a]	PS	**$GalNAc_3$-1**	253
ISIS 655862	3	PO/PS	**$GalNAc_3$-1**	253
ISIS 661161	15[a]	PS	**$GalNAc_3$-3**	254
ISIS 665001	20	PS	**$GalNAc_3$-8**	254
ISIS 664078	55	PS	**$GalNAc_3$-9**	253
ISIS 666961	22[a]	PS	**$GalNAc_3$-6**	254
ISIS 664507	30	PS	**$GalNAc_3$-2**	254
ISIS 666881	30	PS	**$GalNAc_3$-10**	254
ISIS 666224	30[a]	PS	**$GalNAc_3$-5**	254
ISIS 666981	40	PS	**$GalNAc_3$-7**	254

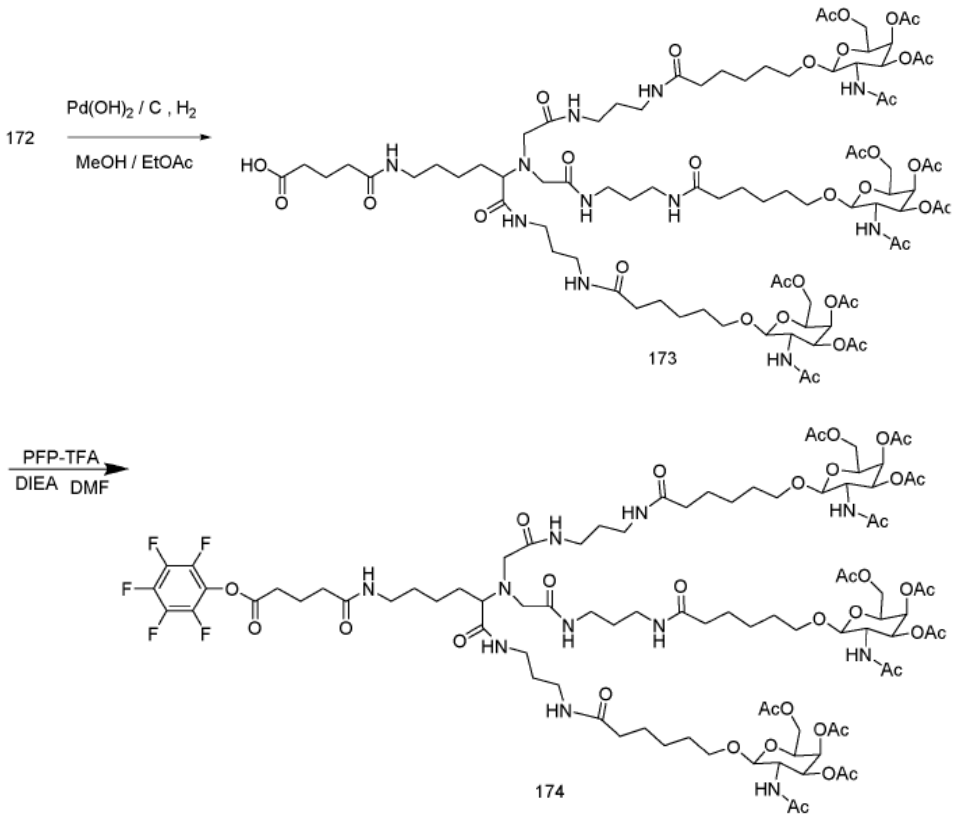
[a]Média de múltiplas execuções.

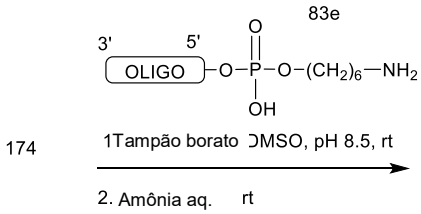
Exemplo 61: Preparação do composto oligomérico 175, compreendendo GalNAc$_3$-12

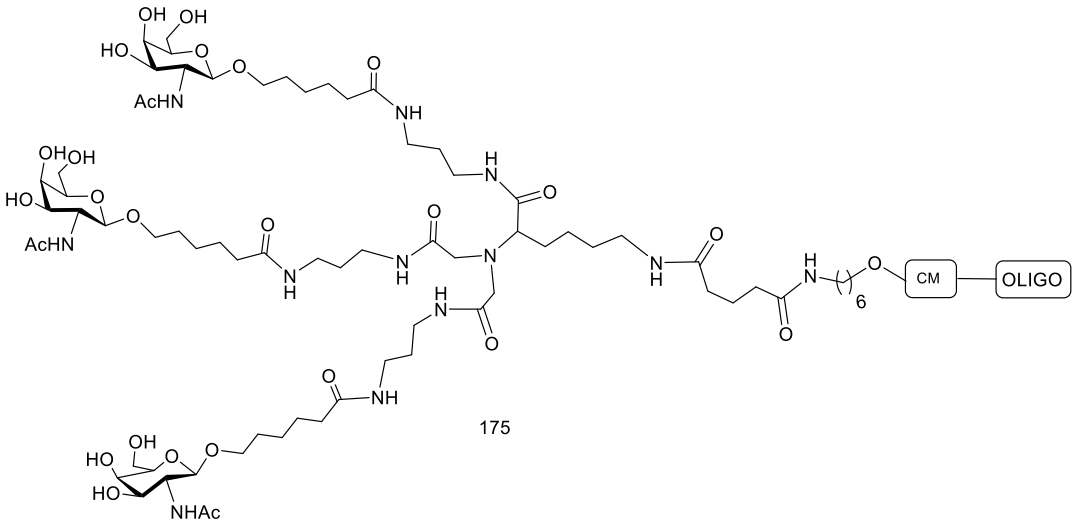



benzil (perfluorofenil) glutarato
DMF

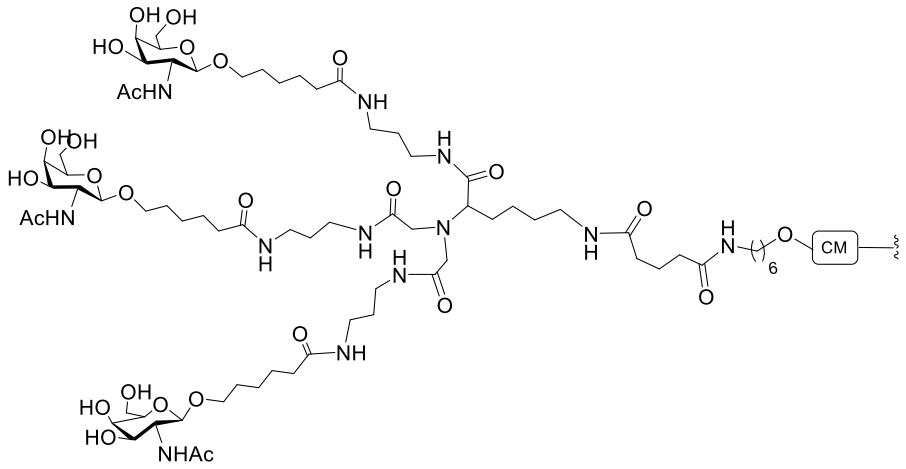
172


172
Pd(OH)2 / C , H2
MeOH / EtOAc
173
PFP-TFA
DIEA DMF
174

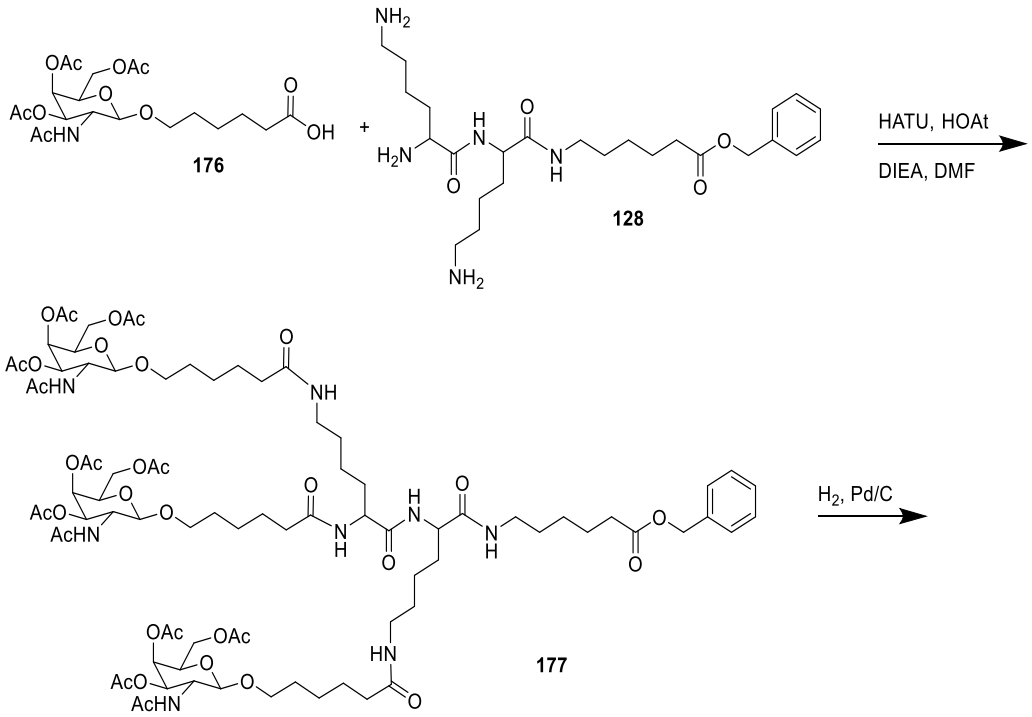


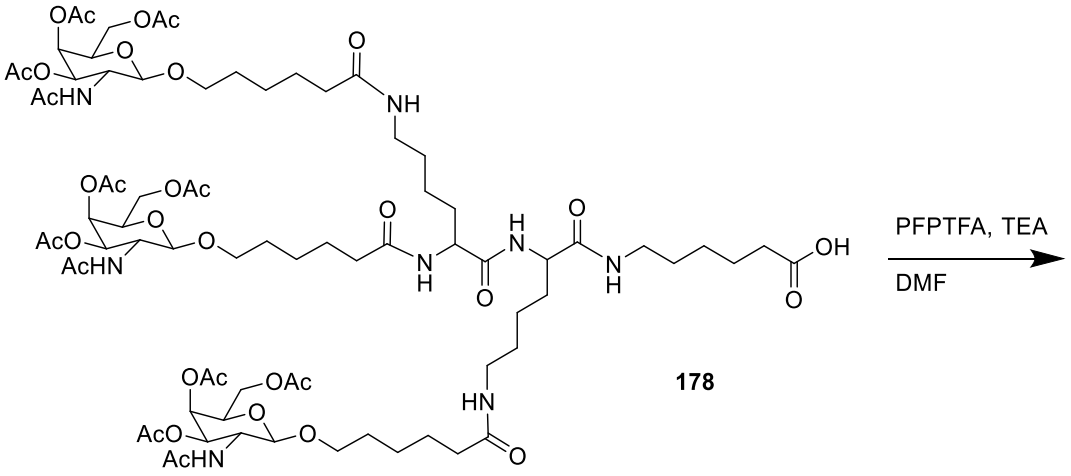


[001059] Composto 169 está disponível comercialmente. O composto 172 foi preparado pela adição de benzil (perfluorofenil) glutarato ao composto 171. O benzil (perfluorofenil) glutarato foi preparado, adicionando-se PFP-TFA e DIEA ao ácido 5-(benziloxi)-5-oxopentanoico em DMF. O Composto Oligomérico 175, compreendendo um grupo de conjugado de GalNAc3-12 foi preparado a partir do composto 174 usando os procedimentos gerais ilustrados no Exemplo 46. A parte do agrupamento de $GalNAc_3$ do grupo de conjugado $GalNAc_3$-12 ($GalNAc_3$-12_a) pode ser combinado com qualquer porção clivável para fornecer uma variedade de grupos conjugados. Em uma certas modalidades, a porção clivável é -P(=O) (OH)-a_d- P(=O)(OH)-. A estrutura de $GalNAc_3$-12 ($GalNAc_3$-12_a-CM-) é mostrada abaixo:

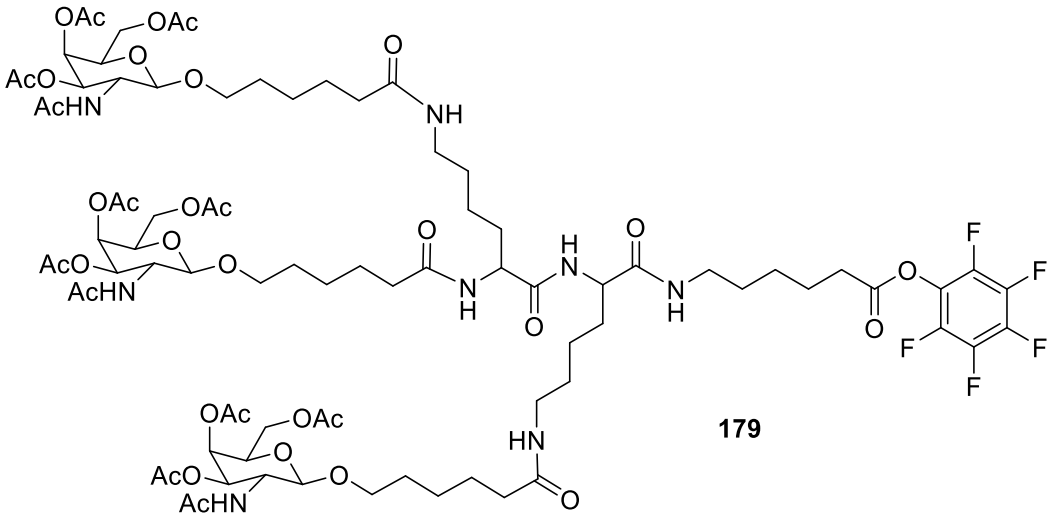


Exemplo 62: Preparação do composto oligomérico 180 compreendendo GalNAc$_3$-13

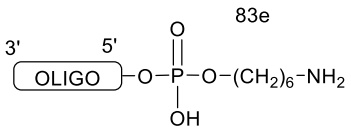




178

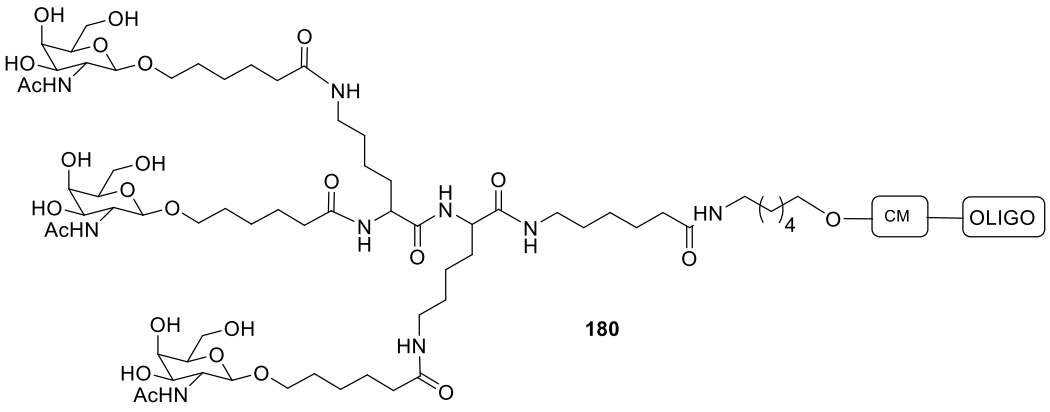


179



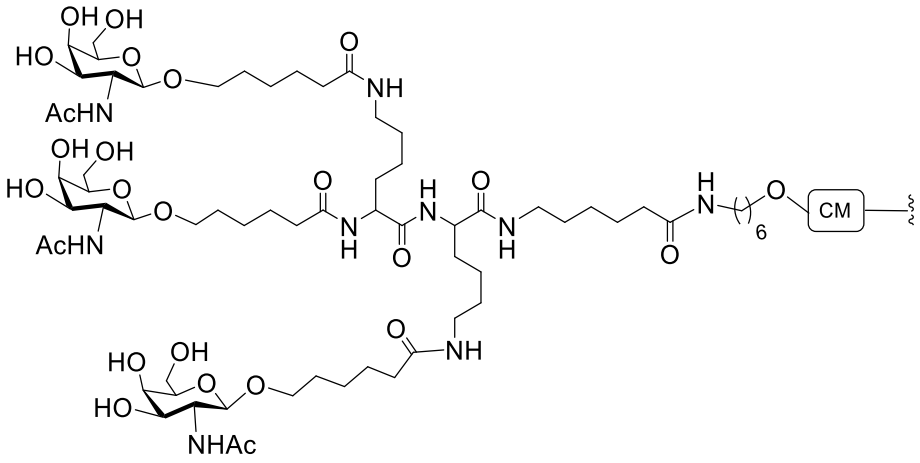
1. Tampão borato DMSO, pH 8.5, rt

2. Amônia aq. rt

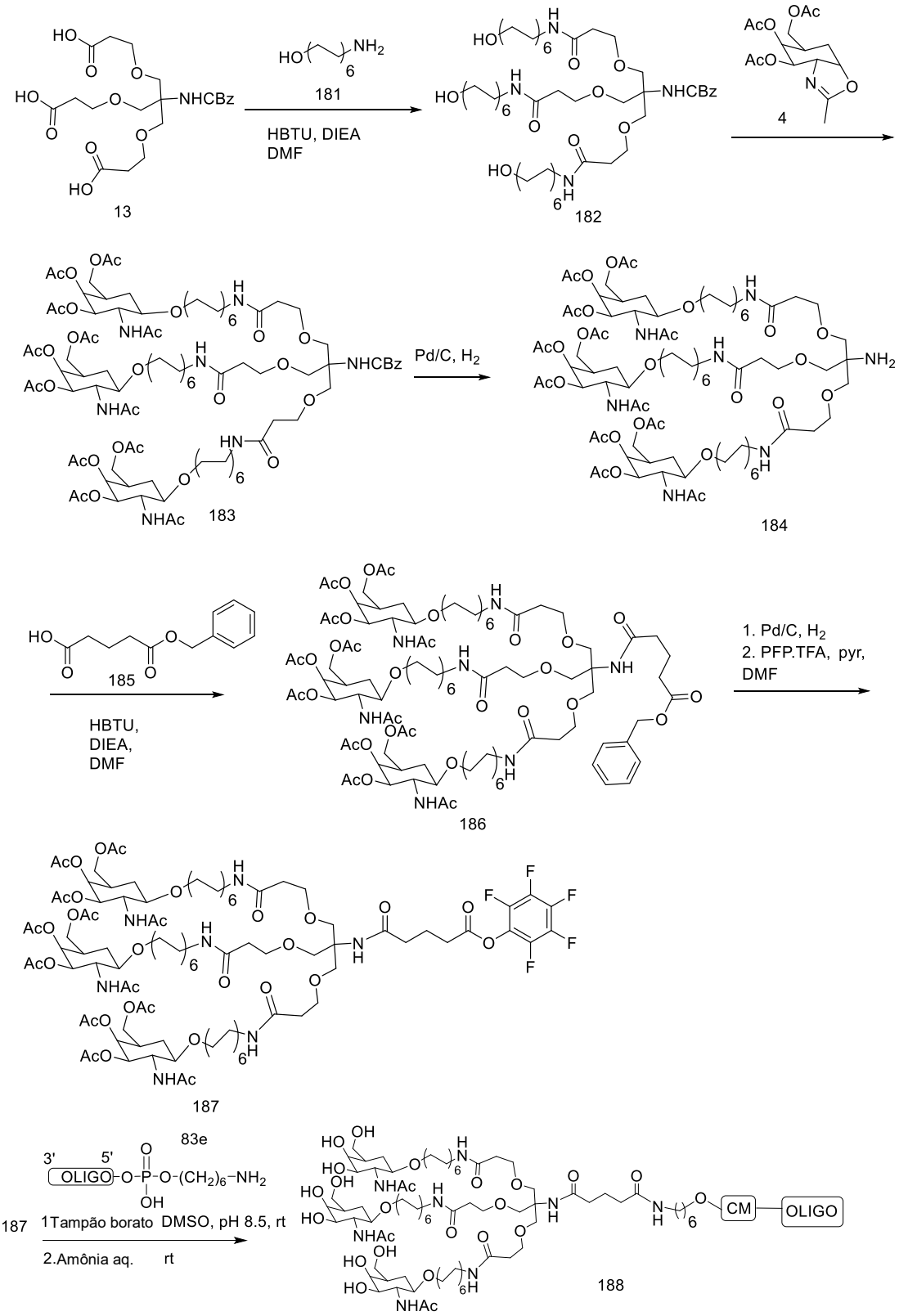


180

[001060] Composto 176 foi preparado usando o procedimento geral mostrado no Exemplo 2. O Composto Oligomérico 180, compreendendo um grupo de conjugado de GalNAc3-13, foi preparado a partir do composto 177 usando os procedimentos gerais ilustrados no Exemplo 49. A parte do agrupamento de $GalNAc_3$ do grupo de conjugado $GalNAc_3$-13 ($GalNAc_3$-13_a) pode ser combinado com qualquer porção clivável para fornecer uma variedade de grupos conjugados. Em uma certas modalidades, a porção clivável é -P(=O) (OH)-a_d- P(=O)(OH)-. A estrutura de $GalNAc_3$-13 ($GalNAc_3$-13_a- CM-) é mostrada abaixo:

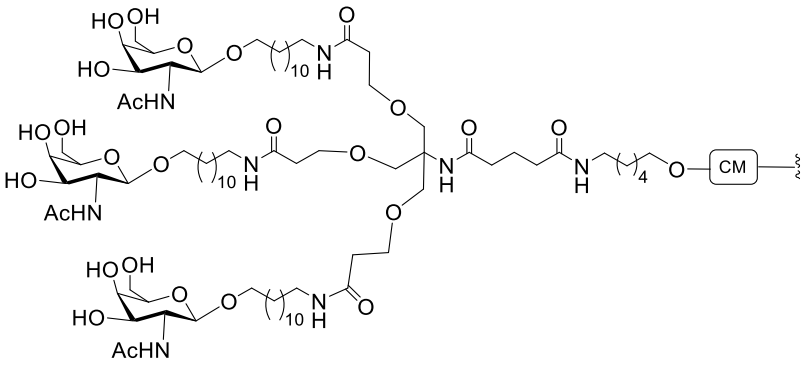


Exemplo 63: Preparação do composto oligomérico 188, compreendendo $GalNAc_3$-14

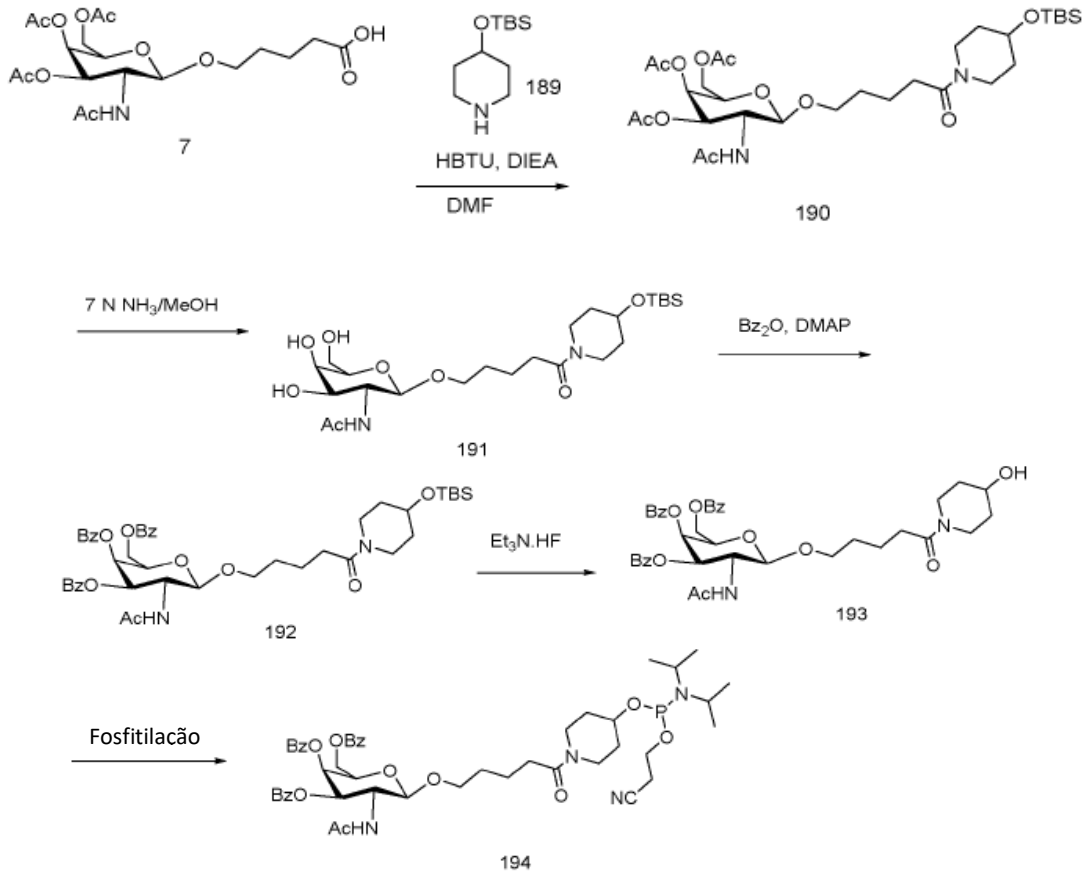


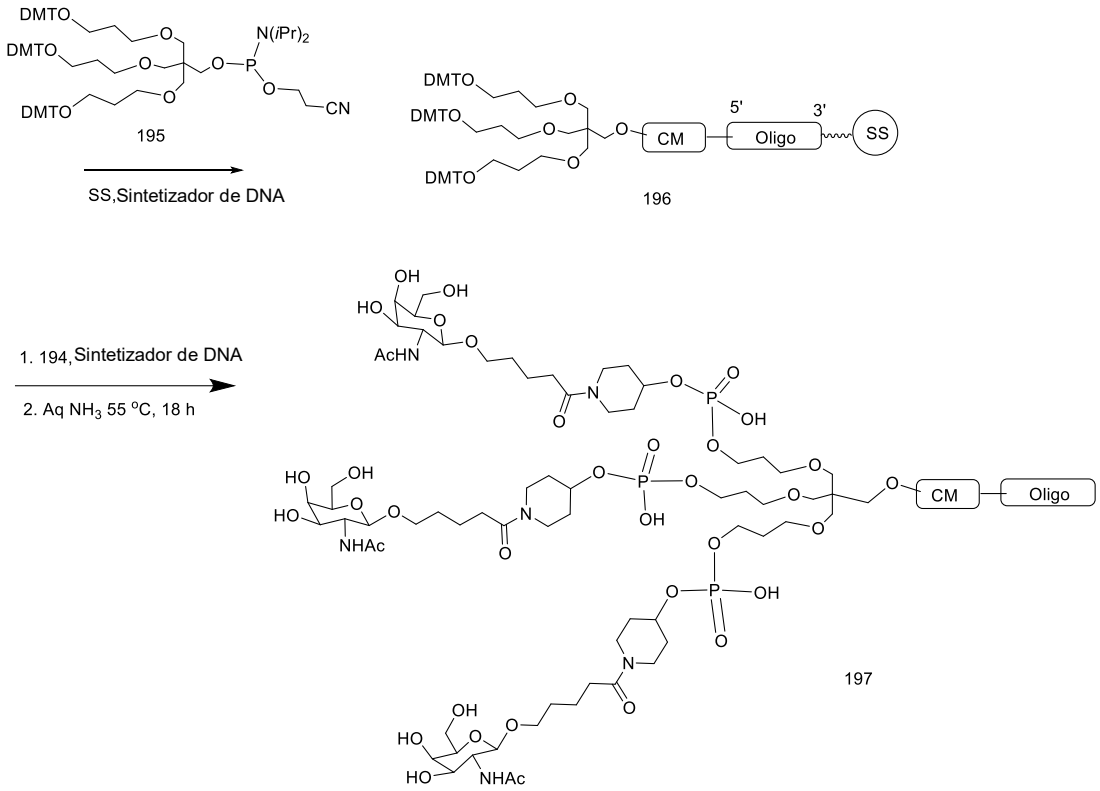
[001061] Compostos 181 e 185 estão disponíveis comercialmente. O Composto Oligomérico 188, compreendendo um grupo de conjugado de

GalNAc3-14 foi preparado a partir do composto 187 usando os procedimentos gerais ilustrados no Exemplo 46. A parte do agrupamento de $GalNAc_3$ do grupo de conjugado $GalNAc_3$-14 ($GalNAc_3$-14_a) pode ser combinado com qualquer porção clivável para fornecer uma variedade de grupos conjugados. Em uma certas modalidades, a porção clivável é -P(=O) (OH)-a_d- P(=O)(OH)-. A estrutura de $GalNAc_3$-14 ($GalNAc_3$-14_a-CM-) é mostrada abaixo:

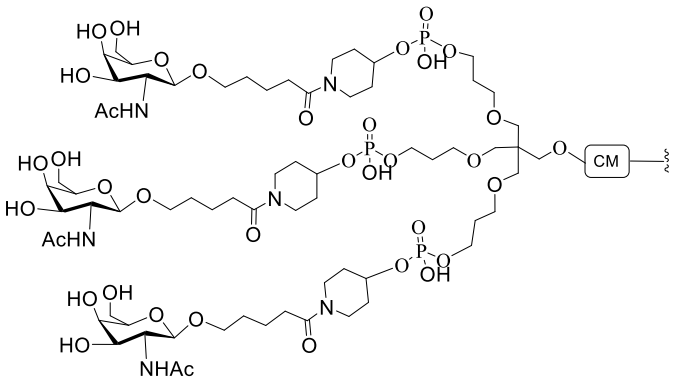


Exemplo 64: Preparação do composto oligomérico 197, compreendendo $GalNAc_3$-15





[001062] Composto 189 está disponível comercialmente. O composto 195 foi preparado usando o procedimento geral mostrado no Exemplo 31. O composto oligomérico 197, que compreende um grupo de conjugado de GalNAc3-15, foi preparado a partir dos compostos 194 e 195 usando procedimentos de síntese de oligonucleotídeo padrão. A parte do agrupamento de $GalNAc_3$ do grupo de conjugado $GalNAc_3$-15 ($GalNAc_3$-15_a) pode ser combinado com qualquer porção clivável para fornecer uma variedade de grupos conjugados. Em uma certas modalidades, a porção clivável é -P(=O) (OH)-a_d- P(=O)(OH)-. A estrutura de $GalNAc_3$-15 ($GalNAc_3$-15_a- CM-) é mostrada abaixo:



Exemplo 65: Estudo dependente de dose de oligonucleotídeos compreendendo grupos de conjugados em 5' (comparação de GalNAc$_3$-3, 12, 13, 14 e 15) direcionando ao SRB-1 *in vivo*

[001063] Os oligonucleotídeos listados abaixo foram testados em um estudo dependente de dose para a inibição antissenso de SRB-1 em camundongos. ISIS 353382 não conjugado foi incluído como um padrão. Cada um dos grupos conjugados GalNAc$_3$ foi ligado no terminal 5' do respectivo oligonucleotídeo por uma porção clivável de nucleosídeo de 2'-desoxiadenosina ligado a fosfodiéster (porção clivável).

Tabela 54

ASOs modificados direcionados a SRB-1

ISIS No.	Sequências (5' para 3')	Conjugado	SEQ ID Nº
353382	$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	nenhum	252
661161	**GalNAc$_3$-3$_{a\text{-}o'}$A$_{do}$**$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}$ $T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}Te$	GalNAc$_3$-3	254
671144	**GalNAc$_3$-12$_{a\text{-}o'}$A$_{do}$**$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}$ $T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}Te$	GalNAc$_3$-12	254
670061	**GalNAc$_3$-13$_{a\text{-}o'}$A$_{do}$**$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}$ $T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}Te$	GalNAc$_3$-13	254
671261	**GalNAc$_3$-14$_{a\text{-}o'}$A$_{do}$**$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}$ $T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}Te$	GalNAc$_3$-14	254
671262	**GalNAc$_3$-15$_{a\text{-}o'}$A$_{do}$**$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}$ $T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}Te$	GalNAc$_3$-15	254

Letras maiúsculas indicam a nucleobase para cada nucleosídeo e ^{m}C indica uma 5-metilcitosina. Subscritos: "e" indica um nucleosídeo 2'-MOE modificado; "d" indica um β-D-2'-desoxirribonucleosídeo; "s" indica uma ligação internucleosídica fosforotioato (PS); "o" indica uma ligação internucleosídica fosfodiéster (PO); e "o'" indica -O-P(=O)(OH)-. Os grupos conjugados estão em negrito.

[001064] A estrutura de GalNAc$_3$-3$_a$ foi mostrada anteriormente no Exemplo 39. A estrutura de GalNAc$_3$-12a foi mostrada anteriormente no Exemplo 61. A estrutura de GalNAc$_3$-13a foi mostrada anteriormente no Exemplo 62. A estrutura de GalNAc$_3$-14a foi mostrada anteriormente no Exemplo 63. A estrutura de GalNAc$_3$-15a foi mostrada anteriormente no Exemplo 64.

Tratamento

[001065] Camundongos C57bl6 de seis a oito semanas de idade

(Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) foram injetados por via subcutânea uma ou duas vezes na dosagem mostrada abaixo com ISIS 353382, 661161, 671144, 670061, 671261, 671262, ou com solução salina. Os camundongos que foram dosados duas vezes receberam a segunda dose três dias após a primeira dose. Cada grupo de tratamento consistiu em 4 animais. Os camundongos foram sacrificados 72 horas após a administração final para determinar os níveis de mRNA de SRB-1 no fígado usando PCR em tempo real e reagente de quantificação de RNA RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) de acordo com protocolos padrão. Os resultados abaixo são apresentados como a porcentagem média dos níveis de mRNA de SRB-1 para cada grupo de tratamento, normalizados para o controle com salina.

[001066] Conforme ilustrado na Tabela 55, o tratamento com oligonucleotídeos antissenso diminuiu os níveis de mRNA de SRB-1 de uma forma dependente da dose. Nenhuma diferença significativa no knockdown alvo foi observada entre os animais que receberam uma dose única e os animais que receberam duas doses (ver ISIS 353382, dosagens 30 e 2 x 15 mg/kg; e ISIS 661161 dosagens 5 e 2 x 2,5 mg/kg). Os oligonucleotídeos que compreendem os conjugados de $GalNAc_3$-3,12, 13, 14 e 15 ligados a fosfodiéster mostraram melhora substancial na potência em comparação ao oligonucleotídeo antissenso não conjugado (ISIS 335382).

Tabela 55

mRNA de SRB-1 (% de Salina)

ISIS No.	Dosagem (mg/kg)	mRNA de SRB-1 (% de Salina)	ED_{50} (mg/kg)	Conjugado
Salina	n/a	100,0	n/a	n/a
353382	3	85,0	22,4	nenhum
	10	69,2		
	30	34,2		
	2 x 15	36,0		
661161	0,5	87,4	2,2	$GalNAc_3$-3
	1,5	59,0		
	5	25,6		
	2 x 2,5	27,5		
	15	17,4		
671144	0,5	101,2	3,4	$GalNAc_3$-12
	1,5	76,1		

	5	32,0		
	15	17,6		
670061	0,5	94,8	2,1	$GalNAc_3$-13
	1,5	57,8		
	5	20,7		
	15	13,3		
671261	0,5	110,7	4,1	$GalNAc_3$-14
	1,5	81,9		
	5	39,8		
	15	14,1		
671262	0,5	109,4	9,8	$GalNAc_3$-15
	1,5	99,5		
	5	69,2		
	15	36,1		

[001067] Os níveis de transaminase, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) hepáticas no soro foram medidos em relação aos camundongos injetados com salina usando protocolos padrão. Também foram avaliadas a bilirrubina total e BUN. As alterações dos pesos corporais foram avaliadas sem nenhuma diferença significativa do grupo com salina (dados não mostrados). Os valores de ALTs, ASTs, bilirrubina total e BUN são mostrados na Tabela 56 abaixo.

Tabela 56

ISIS No.	Dosagem (mg/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)	Bilirrubina Total (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Conjugado
Salina	n/a	28	60	0,1	39	n/a
353382	3	30	77	0,2	36	nenhum
	10	25	78	0,2	36	
	30	28	62	0,2	35	
	2 x 15	22	59	0,2	33	
661161	0,5	39	72	0,2	34	$GalNAc_3$-3
	1,5	26	50	0,2	33	
	5	41	80	0,2	32	
	2 x 2,5	24	72	0,2	28	
	15	32	69	0,2	36	
671144	0,5	25	39	0,2	34	$GalNAc_3$-12
	1,5	26	55	0,2	28	
	5	48	82	0,2	34	
	15	23	46	0,2	32	
670061	0,5	27	53	0,2	33	$GalNAc_3$-13
	1,5	24	45	0,2	35	
	5	23	58	0,1	34	
	15	24	72	0,1	31	
671261	0,5	69	99	0,1	33	$GalNAc_3$-14
	1,5	34	62	0,1	33	
	5	43	73	0,1	32	
	15	32	53	0,2	30	
671262	0,5	24	51	0,2	29	$GalNAc_3$-15
	1,5	32	62	0,1	31	
	5	30	76	0,2	32	
	15	31	64	0,1	32	

Exemplo 66: Efeito de diversas frações cliváveis sobre a inibição antissenso *in vivo* pelo oligonucleotídeos que se direcionam ao SRB-1 compreendendo um agrupamento de 5'-$GalNAc_3$

[001068] Os oligonucleotídeos listados abaixo foram testados em um

estudo dependente de dose para a inibição antissenso de SRB-1 em camundongos. Cada um dos grupo de conjugado $GalNAc_3$ foi ligado no terminal 5' do respectivo oligonucleotídeo por uma porção clivável de nucleosídeo de 2'-desoxiadenosina ligado a fosfodiéster (porção clivável) (CM).

Tabela 57

ASOs modificados direcionados a SRB-1

ISIS No.	Sequências (5’ para 3’)	Agrupamento $_{GalNAc}3$	CM	SEQ ID No.
661161	**$GalNAc_3$-3_a-o’A_{do}**$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}Te$	$GalNAc_3$-3a	A_d	254
670699	**$GalNAc_3$-3_a-o’T_{do}**$G_{es}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{eo}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{eo}{}^{m}C_{eo}{}^{m}C_{es}T_{es}Te$	$GalNAc_3$-3a	T_d	257
670700	**$GalNAc_3$-3_a-o’A_{eo}**$G_{es}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{eo}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{eo}{}^{m}C_{eo}{}^{m}C_{es}T_{es}Te$	$GalNAc_3$-3a	A_e	254
670701	**$GalNAc_3$-3_a-o’T_{eo}**$G_{es}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{eo}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{eo}{}^{m}C_{eo}{}^{m}C_{es}T_{es}Te$	$GalNAc_3$-3a	T_e	257
671165	**$GalNAc_3$-13_a-o’A_{do}**$G_{es}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{eo}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{eo}{}^{m}C_{eo}{}^{m}C_{es}T_{es}Te$	$GalNAc_3$-13a	A_d	254

Letras maiúsculas indicam a nucleobase para cada nucleosídeo e ^{m}C indica uma 5-metilcitosina. Subscritos: "e" indica um nucleosídeo 2’-MOE modificado; "d" indica um β-D-2’-desoxirribonucleosídeo; "s" indica uma ligação internucleosídica fosforotioato (PS); "o" indica uma ligação internucleosídica fosfodiéster (PO); e "o’" indica -O-P(=O)(OH)-. Os grupos conjugados estão em negrito.

[001069] A estrutura de $GalNAc_3$-3_a foi mostrada anteriormente no Exemplo 39. A estrutura de $GalNAc_3$-13a foi mostrada anteriormente no Exemplo 62.

Tratamento

[001070] Camundongos C57bl6 de seis a oito semanas de idade (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) foram injetados por via subscutânea uma vez na dosagem mostrada abaixo com ISIS 661161, 670699, 670700, 670701, 671165, ou com solução salina. Cada grupo de tratamento consistiu em 4 animais. Os camundongos foram sacrificados 72 horas após a administração final para determinar os níveis de mRNA de SRB-1 no fígado usando PCR em tempo real e reagente de quantificação de RNA RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) de acordo com protocolos padrão. Os resultados abaixo são apresentados

como a porcentagem média dos níveis de mRNA de SRB-1 para cada grupo de tratamento, normalizados para o controle com salina.

[001071] Conforme ilustrado na Tabela 58, o tratamento com oligonucleotídeos antissenso diminuiu os níveis de mRNA de SRB-1 de uma forma dependente da dose. Os oligonucleotídeos antissenso compreendendo diversas frações cliváveis todos mostraram potências semelhantes.

Tabela 58

mRNA de SRB-1 (% de Salina)

ISIS No.	Dosagem (mg/kg)	mRNA de SRB-1 (% de Salina)	Agrupamento $_{GalNAc}3$	CM
Salina	n/a	100,0	n/a	n/a
661161	0,5	87,8	$GalNAc_3$-3a	A_d
	1,5	61,3		
	5	33,8		
	15	14,0		
670699	0,5	89,4	$GalNAc_3$-3a	T_d
	1,5	59,4		
	5	31,3		
	15	17,1		
670700	0,5	79,0	$GalNAc_3$-3a	A_e
	1,5	63,3		
	5	32,8		
	15	17,9		
670701	0,5	79,1	$GalNAc_3$-3a	T_e
	1,5	59,2		
	5	35,8		
	15	17,7		
671165	0,5	76,4	$GalNAc_3$-13a	A_d
	1,5	43,2		
	5	22,6		
	15	10,0		

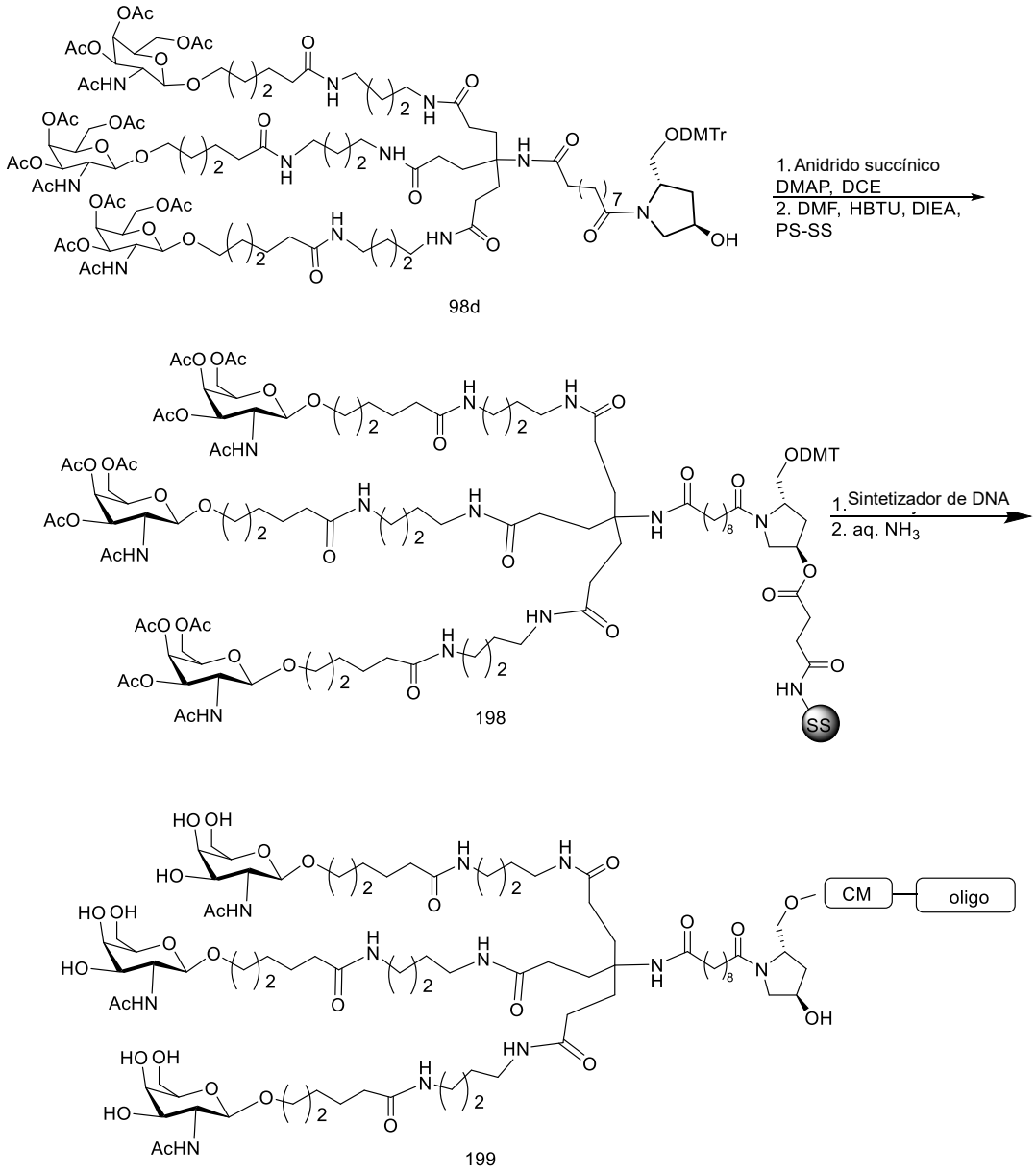
[001072] Os níveis de transaminase, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) hepáticas no soro foram medidos em relação aos camundongos injetados com salina usando protocolos padrão. Também foram avaliadas a bilirrubina total e BUN. As alterações dos pesos corporais foram avaliadas sem nenhuma diferença significativa do grupo com salina (dados não mostrados). Os valores de ALTs, ASTs, bilirrubina total e BUN são mostrados na Tabela 56 abaixo.

Tabela 59

ISIS No.	Dosagem (mg/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)	Bilirrubina Total (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Agrupamento $_{GalNAc}3$	CM
Salina	n/a	24	64	0,2	31	n/a	n/a
661161	0,5	25	64	0,2	31	$GalNAc_3$-3a	A_d
	1,5	24	50	0,2	32		
	5	26	55	0,2	28		

	15	27	52	0,2	31		
670699	0,5	42	83	0,2	31	$GalNAc_3$-3a	T_d
	1,5	33	58	0,2	32		
	5	26	70	0,2	29		
	15	25	67	0,2	29		
670700	0,5	40	74	0,2	27	$GalNAc_3$-3a	A_e
	1,5	23	62	0,2	27		
	5	24	49	0,2	29		
	15	25	87	0,1	25		
670701	0,5	30	77	0,2	27	$GalNAc_3$-3a	T_e
	1,5	22	55	0,2	30		
	5	81	101	0,2	25		
	15	31	82	0,2	24		
671165	0,5	44	84	0,2	26	$GalNAc_3$-13a	A_d
	1,5	47	71	0,1	24		
	5	33	91	0,2	26		
	15	33	56	0,2	29		

Exemplo 67: Preparação do composto oligomérico 199, compreendendo $GalNAc_3$-16

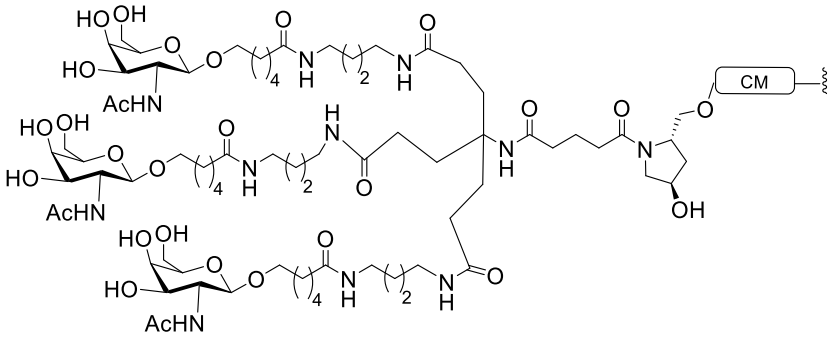


98d

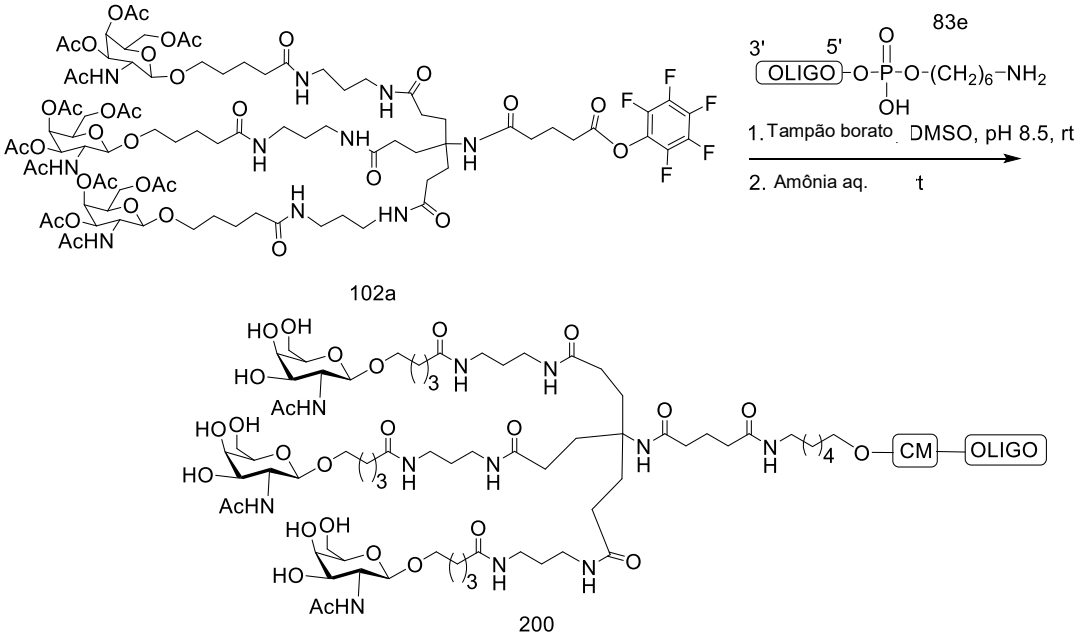
198

199

[001073] Composto Oligomérico 199, compreendendo um grupo de conjugado de GalNAc3-16 foi preparado usando os procedimentos gerais ilustrados nos Exemplos 7 e 9. A parte do agrupamento de $GalNAc_3$ do grupo de conjugado $GalNAc_3$-16 ($GalNAc_3$-16_a) pode ser combinado com qualquer porção clivável para fornecer uma variedade de grupos conjugados. Em determinadas modalidades, a porção clivável é -P(=O)(OH)-a_d- P(=O)(OH)-. A estrutura de $GalNAc_3$-16 ($GalNAc_3$-16_a- CM-) é mostrada abaixo:

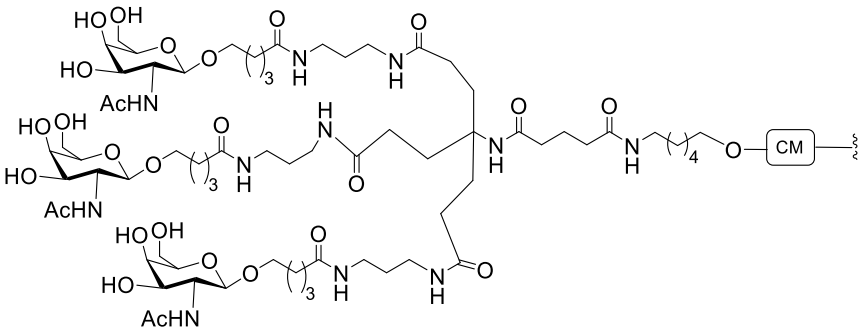


Exemplo 68: Preparação dos compostos oligoméricos 200, compreendendo $GalNAc_3$-17

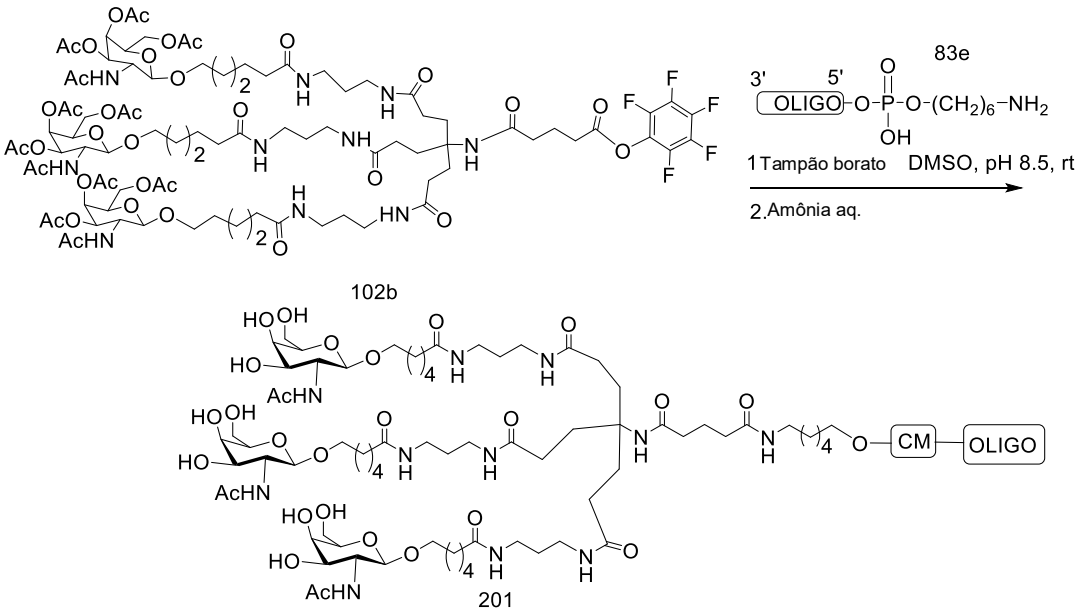


[001074] Composto Oligomérico 200, compreendendo um grupo de conjugado de GalNAc3-17, foi preparado usando os procedimentos gerais ilustrados no Exemplo 46. A parte do agrupamento de $GalNAc_3$ do

grupo de conjugado GalNAc$_3$-17 (GalNAc$_3$-17$_a$) pode ser combinado com qualquer porção clivável para fornecer uma variedade de grupos conjugados. Em uma certas modalidades, a porção clivável é -P(=O)(OH)-a$_d$- P(=O)(OH)-. A estrutura do GalNAc$_3$-17 (GalNAc$_3$-17$_a$- CM-) é mostrada abaixo:

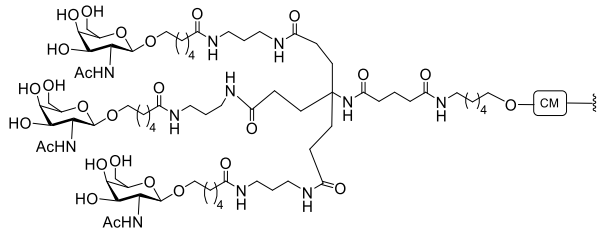


Exemplo 69: Preparação do composto oligomérico 201, compreendendo GalNAc$_3$-18

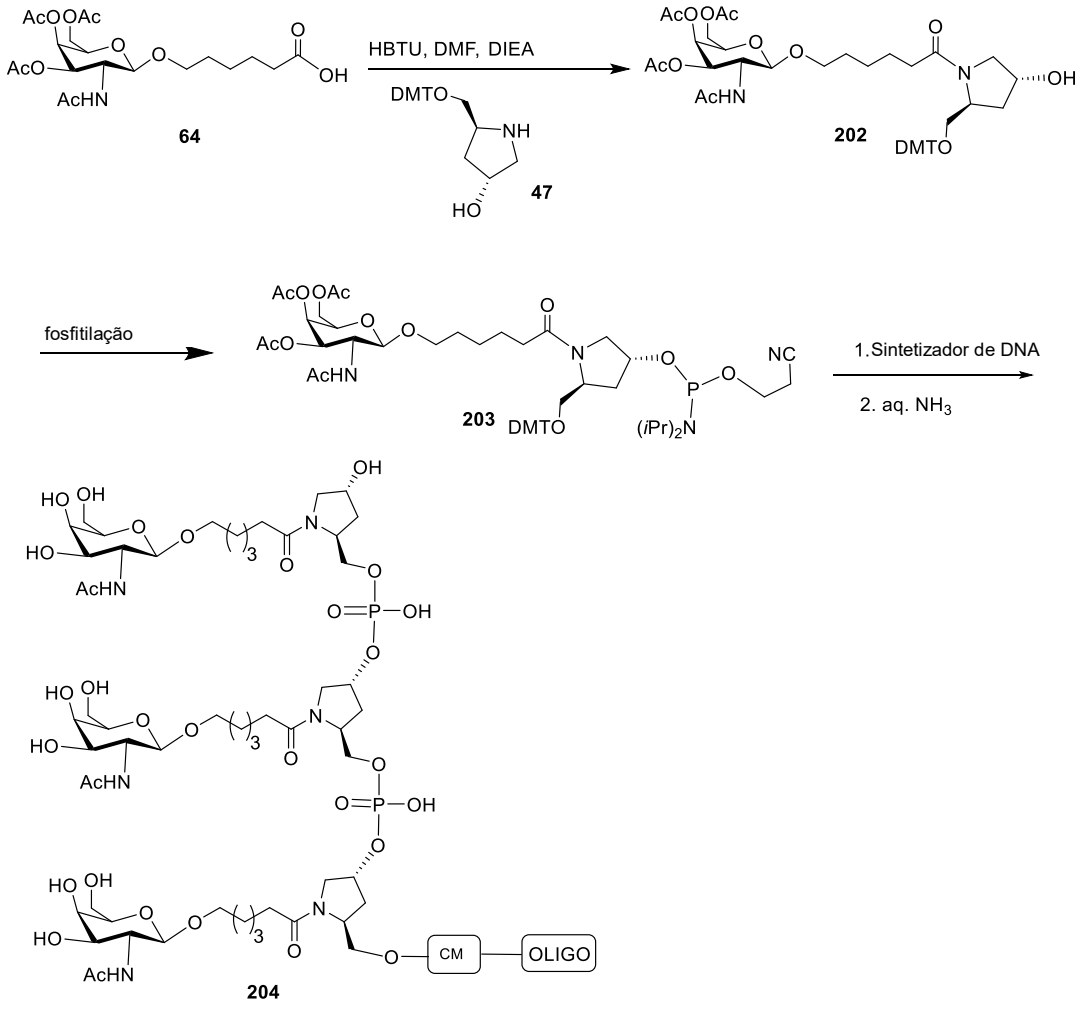


[001075] Composto Oligomérico 201, compreendendo<um grupo de conjugado de GalNAc3-18, foi preparado usando os procedimentos gerais ilustrados no Exemplo 46. A parte do agrupamento de GalNAc$_3$ do grupo de conjugado GalNAc$_3$-18 (GalNAc$_3$-18$_a$) pode ser combinado com qualquer porção clivável para fornecer uma variedade de grupos conjugados. Em uma certas modalidades, a porção clivável é -P(=O)(OH)-a$_d$- P(=O)(OH)-. A estrutura do GalNAc$_3$-18 (GalNAc$_3$-18$_a$- CM-) é

mostrada abaixo:

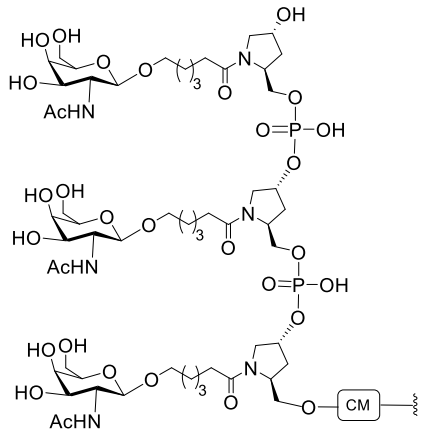


Exemplo 70: Preparação do composto oligomérico 204, compreendendo GalNAc$_3$-19

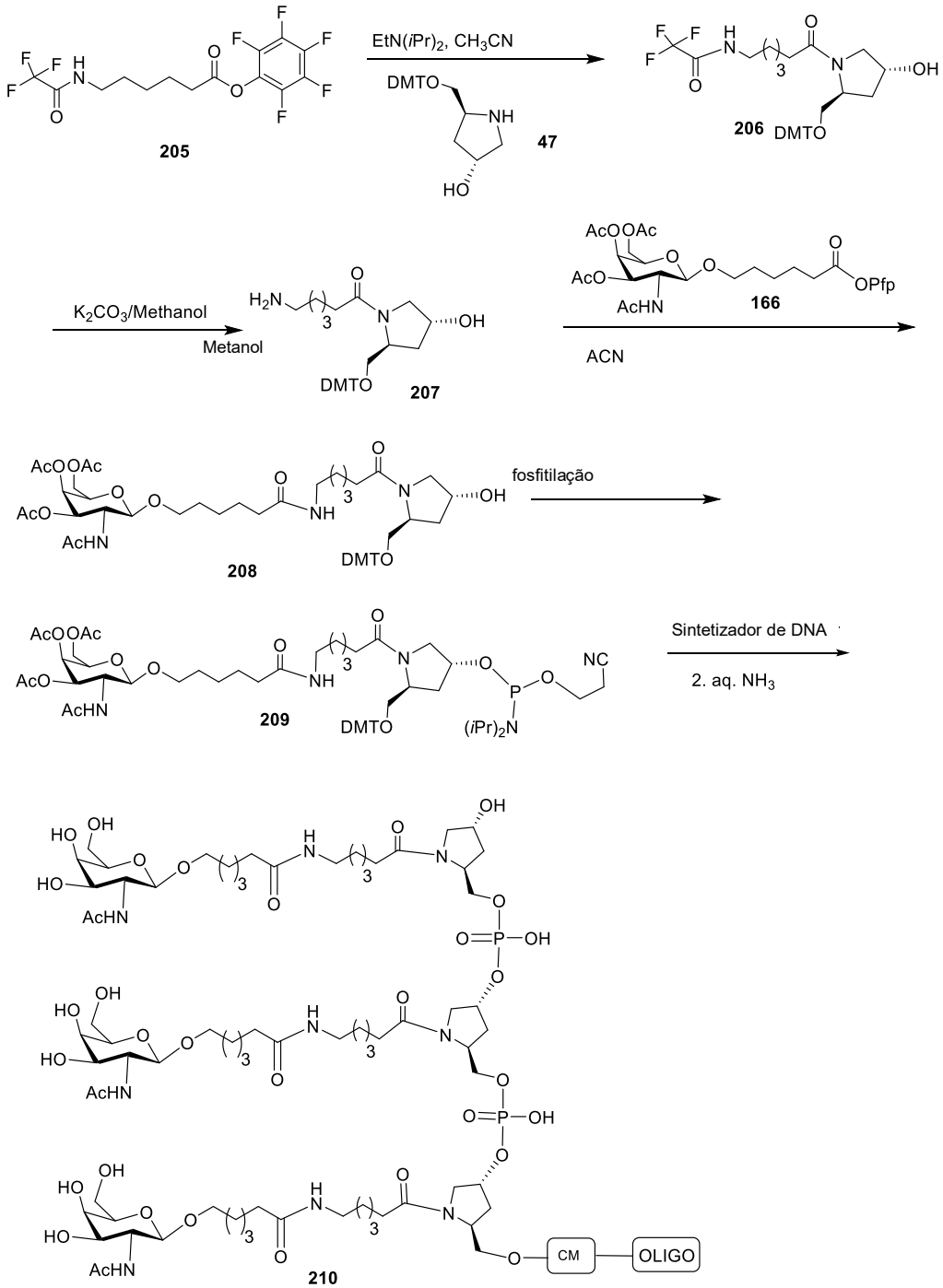


[001076] Composto Oligomérico 204, compreendendo um grupo de conjugado de GalNAc3-19 foi preparado a partir do composto 64 usando os procedimentos gerais ilustrados no Exemplo 52. A parte do agrupamento de GalNAc$_3$ do grupo de conjugado GalNAc$_3$-19 (GalNAc$_3$-19$_a$) pode ser combinado com qualquer porção clivável para fornecer uma variedade de grupos conjugados. Em uma certas modalidades, a porção

clivável é -P(=O) (OH)-a_d- P(=O)(OH)-. A estrutura do GalNAc$_3$-19 (GalNAc$_3$-19$_a$- CM-) é mostrada abaixo:

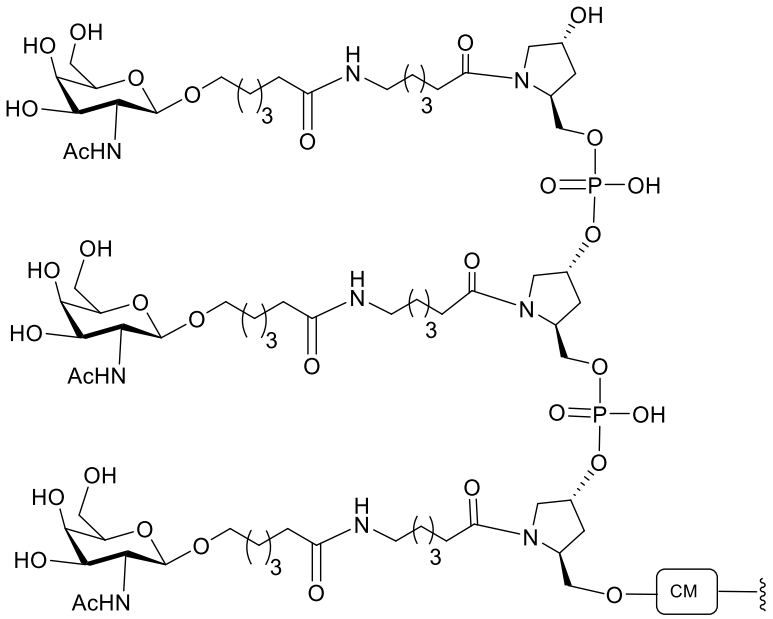


Exemplo 71: Preparação dos compostos oligoméricos 210, compreendendo GalNAc$_3$-20

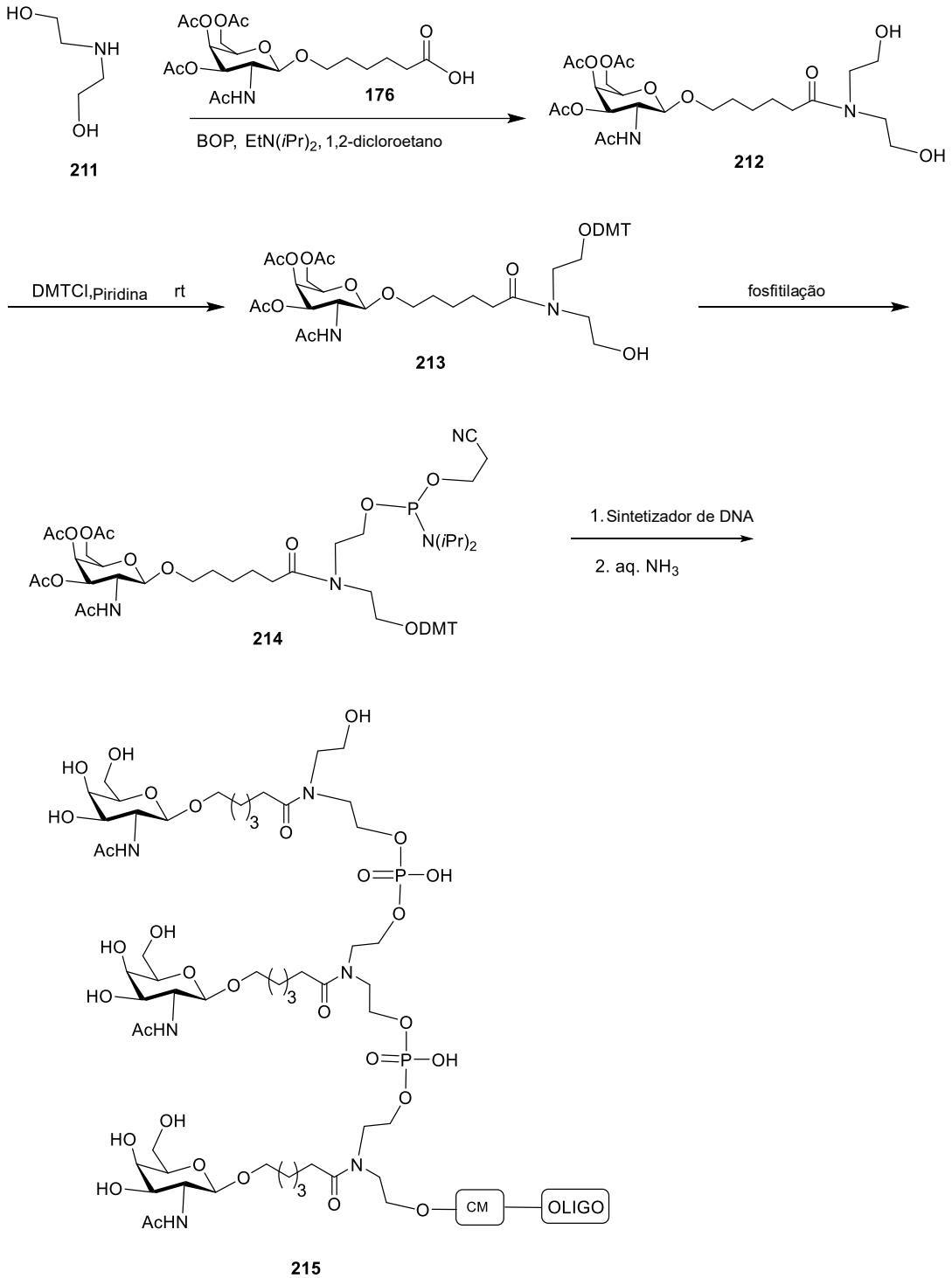


[001077] Composto 205 foi preparado, adicionando-se PFP-TFA e DIEA ao ácido 6-(2,2,2-trifluoroacetamido)hexanoico em acetonitrila , que foi preparada pela adição de anidrido tríflico ao ácido 6-aminohexanoico. A mistura de ração foi aquecida a 80 ºC, em seguida baixada para temperatura ambiente. O Composto Oligomérico 210, compreendendo um grupo de conjugado de GalNAc3-20 foi preparado a partir do composto 208 usando os procedimentos gerais ilustrados no Exemplo 52. A

parte do agrupamento de $GalNAc_3$ do grupo de conjugado $GalNAc_3$-20 ($GalNAc_3$-20_a) pode ser combinado com qualquer porção clivável para fornecer uma variedade de grupos conjugados. Em uma certas modalidades, a porção clivável é -P(=O) (OH)-a_d- P(=O)(OH)-. A estrutura de $GalNAc_3$-20 ($GalNAc_3$-20_a- CM-) é mostrada abaixo:

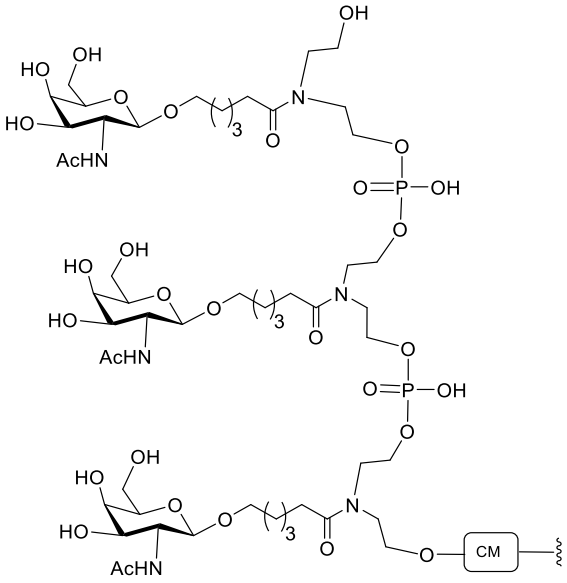


Exemplo 72: Preparação do composto oligomérico 215, compreende GalNAc$_3$-21

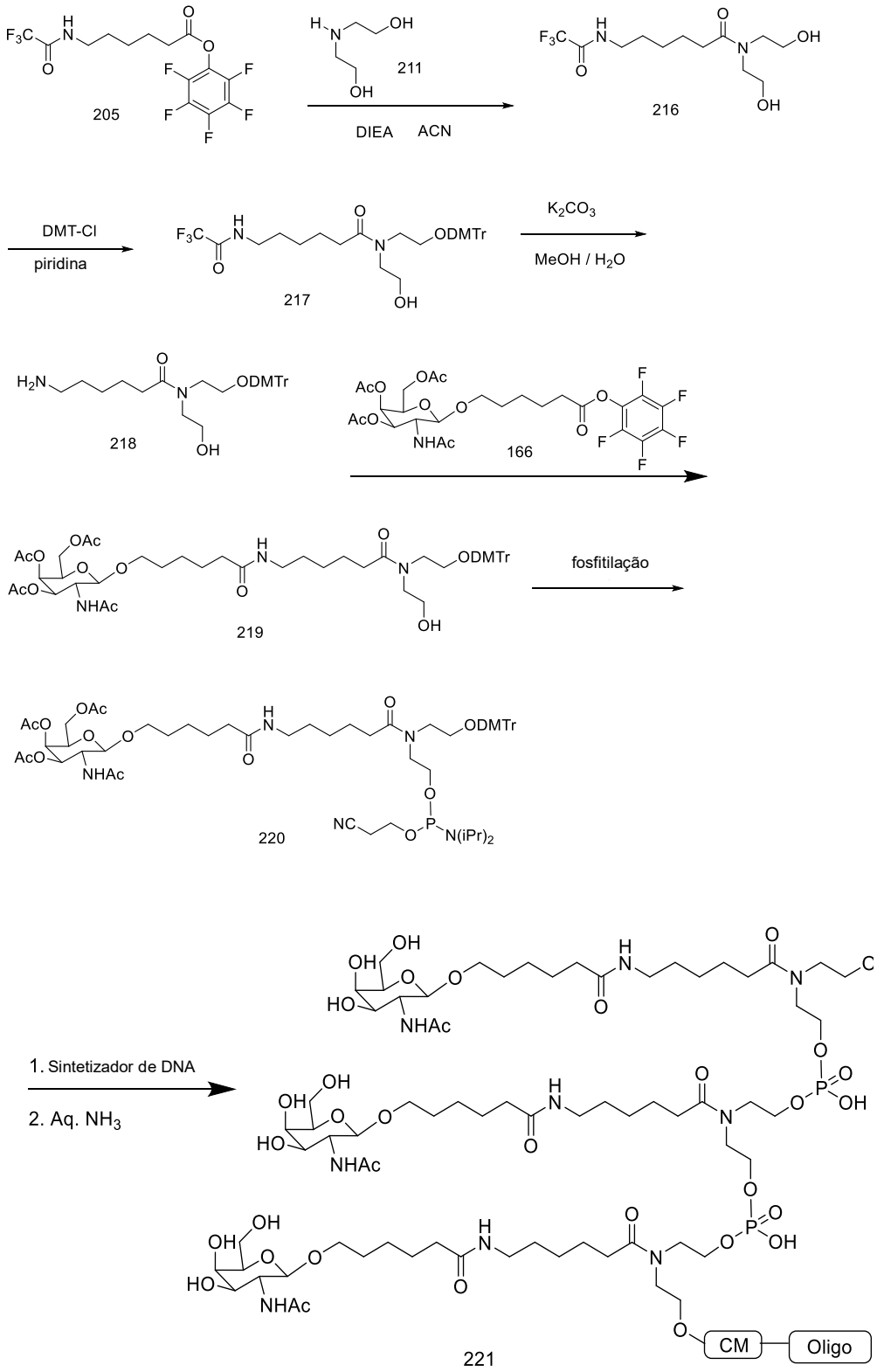


[001078] Composto 211 está disponível comercialmente. O Composto Oligomérico 215, compreendendo um grupo de conjugado de GalNAc3-21 foi preparado a partir do composto 213 usando os procedimentos gerais ilustrados no Exemplo 52. O agrupamento de GalNAc$_3$ parte do

grupo de conjugado GalNAc$_3$-21 (GalNAc$_3$-21$_a$) pode ser combinado com qualquer porção clivável para fornecer uma variedade de grupos conjugados. Em uma certas modalidades, a porção clivável é -P(=O)(OH)-a$_d$- P(=O)(OH)-. A estrutura de GalNAc$_3$-21 (GalNAc$_3$-21$_a$-CM-) é mostrada abaixo:

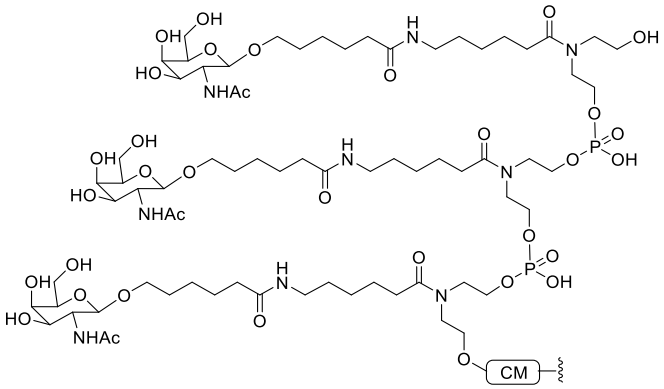


Exemplo 73: Preparação do composto oligomérico 221, compreendendo GalNAc$_3$-22



[001079] Composto 220 foi preparado a partir do composto 219 usando tetrazolida de di-isopropilamônio. O Composto Oligomérico 221,

compreendendo um grupo de conjugado de GalNAc3-21, é preparado a partir do composto 220 usando os procedimentos gerais ilustrados no Exemplo 52. A parte do agrupamento de $GalNAc_3$ do grupo de conjugado $GalNAc_3$-22 ($GalNAc_3$-22_a) pode ser combinado com qualquer porção clivável para fornecer uma variedade de grupos conjugados. Em uma certas modalidades, a porção clivável é -P(=O) (OH)-a_d-P(=O)(OH)-. A estrutura de $GalNAc_3$-22 ($GalNAc_3$-22_a-CM-) é mostrada abaixo:



Exemplo 74: Efeito de diversas frações cliváveis sobre a inibição antissenso *in vivo* pelo oligonucleotídeos que se direcionam ao SRB-1 compreendendo um agrupamento de 5'-GalNAc3.

[001080] Os oligonucleotídeos listados abaixo foram testados em um estudo dependente de dose para a inibição antissenso de SRB-1 em camundongos. Cada um dos grupos de conjugado de $GalNAc_3$ foi ligado no terminal 5' do respectivo oligonucleotídeo.

Tabela 60

ASOs modificados direcionados a SRB-1

ISIS No.	Sequências (5' para 3')	Agrupamento $_{GalNAc}3$	CM	SEQ ID Nº
353382	$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}$ $T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}$ $^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	n/a	n/a	252
661161	**$GalNAc_3$-3_{a}-$_{o}$'A_{do}**$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}$ $G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}$ $T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}Te$	$GalNAc_3$-3a	A_d	254
666904	**$GalNAc_3$-3_{a}-$_{o}$'**$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}$ $G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}$ $T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	$GalNAc_3$-3a	PO	252
675441	**$GalNAc_3$-17_{a}-$_{o}$'A_{do}**$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}$ $G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}$ $T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}Te$	$GalNAc_3$-17a	A_d	254
675442	**$GalNAc_3$-18_{a}-$_{o}$'A_{do}**$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}$ $G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}$ $T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	$GalNAc_3$-18a	A_d	254

[001081] Em todas as tabelas, as letras maiúsculas indicam a nucleo-

base para cada nucleosídeo e ^{m}C indica uma 5-metil citosina. Subscritos: "e" indica um nucleosídeo 2'-MOE modificado; "d" indica um β-D-2'-desoxirribonucleosídeo; "s" indica uma ligação internucleosídica fosforotioato (PS); "o" indica uma ligação internucleosídica fosfodiéster (PO); e "o'" indica -O-P(=O)(OH)-. Os grupos conjugados estão em negrito.

[001082] A estrutura de $GalNAc_3$-3_a foi mostrada anteriormente no Exemplo 39. A estrutura de $GalNAc_3$-17a foi mostrada anteriormente no Exemplo 68 e a estrutura de $GalNAc_3$-18a foi mostrada no Exemplo 69.

Tratamento

[001083] Camundongos C57BL/6 de seis a oito semanas de idade (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) foram injetados por vis subcutânea uma vez na dosagem mostrada abaixo com um oligonucleotídeo listad na Tabela 60 ou com salina. Cada grupo de tratamento consistiu em 4 animais. Os camundongos foram sacrificados 72 horas após a administração final para determinar os níveis de mRNA de SRB-1 usando PCR em tempo real e reagente de quantificação de RNA RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) de acordo com protocolos padrão. Os resultados abaixo são apresentados como a porcentagem média dos níveis de mRNA de SRB-1 para cada grupo de tratamento, normalizados para o controle com salina.

[001084] Conforme ilustrado na Tabela 61, o tratamento com oligonucleotídeos antissenso diminuiu os níveis de mRNA de SRB-1 de uma forma dependente da dose. Os oligonucleotídeos antissenso que compreendem um conjugado de GalNAc mostraram potências semelhantes e foram significativamente mais potentes do que o oligonucleotídeo de origem em que faltava um conjugado de GalNAc.

Tabela 61

mRNA de SRB-1 (% de Salina)

ISIS No.	Dosagem (mg/kg)	mRNA de SRB-1 (% de Salina)	Agrupamento $_{GalNAc}3$	CM
Salina	n/a	100,0	n/a	n/a
353382	3	79,38	n/a	n/a
	10	68,67		
	30	40,70		

661161	0,5	79,18	$GalNAc_3$-3a	A_d
	1,5	75,96		
	5	30,53		
	15	12,52		
666904	0,5	91,30	$GalNAc_3$-3a	PO
	1,5	57,88		
	5	21,22		
	15	16,49		
675441	0,5	76,71	$GalNAc_3$-17a	A_d
	1,5	63,63		
	5	29,57		
	15	13,49		
675442	0,5	95,03	$GalNAc_3$-18a	A_d
	1,5	60,06		
	5	31,04		
	15	19,40		

[001085] Os níveis de transaminase, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) hepáticas no soro foram medidos em relação aos camundongos injetados com salina usando protocolos padrão. Também foram avaliadas a bilirrubina total e BUN. A alteração nos pesos corporais foi avaliada sem nenhuma alteração significativa do grupo com salina (dados não mostrados). Os valores de ALTs, ASTs, bilirrubina total e BUN são mostrados na Tabela 62 abaixo.

Tabela 62:

ISIS No.	Dosagem (mg/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)	Bilirrubina Total (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Agrupamento $_{GalNAc}$3	CM
Salina	n/a	26	59	0,16	42	n/a	n/a
353382	3	23	58	0,18	39	n/a	n/a
	10	28	58	0,16	43		
	30	20	48	0,12	34		
661161	0,5	30	47	0,13	35	$GalNAc_3$-3a	A_d
	1,5	23	53	0,14	37		
	5	26	48	0,15	39		
	15	32	57	0,15	42		
666904	0,5	24	73	0,13	36	$GalNAc_3$-3a	PO
	1,5	21	48	0,12	32		
	5	19	49	0,14	33		
	15	20	52	0,15	26		
675441	0,5	42	148	0,21	36	$GalNAc_3$-17a	A_d
	1,5	60	95	0,16	34		
	5	27	75	0,14	37		
	15	24	61	0,14	36		
675442	0,5	26	65	0,15	37	$GalNAc_3$-18a	A_d
	1,5	25	64	0,15	43		
	5	27	69	0,15	37		
	15	30	84	0,14	37		

Exemplo 75: Análise farmacocinética de oligonucleotídeos compreendendo um grupo de conjugado em 5'

[001086] A PK dos ASOs nas Tabelas 54, 57 e 60 acima foi avaliada usando amostras de fígado que foram obtidas após os procedimentos

de tratamento descritos nos Exemplos 65, 66 e 74. As amostras de fígado foram cortadas e extraídas usando protocolos padrão e analisadas por IP-HPLC-MS juntamente com um padrão interno. O nível de tecido combinado (μg/g) de todos os metabólitos foi medido pela integração dos picos de UV apropriados, e o nível de tecido do ASO de comprimento total em que faltava o conjugado ("de origem", que tem Nº Isis 353382 neste caso) foi medido usando os cromatogramas de íon extraído apropriados (EIC).

Tabela 63

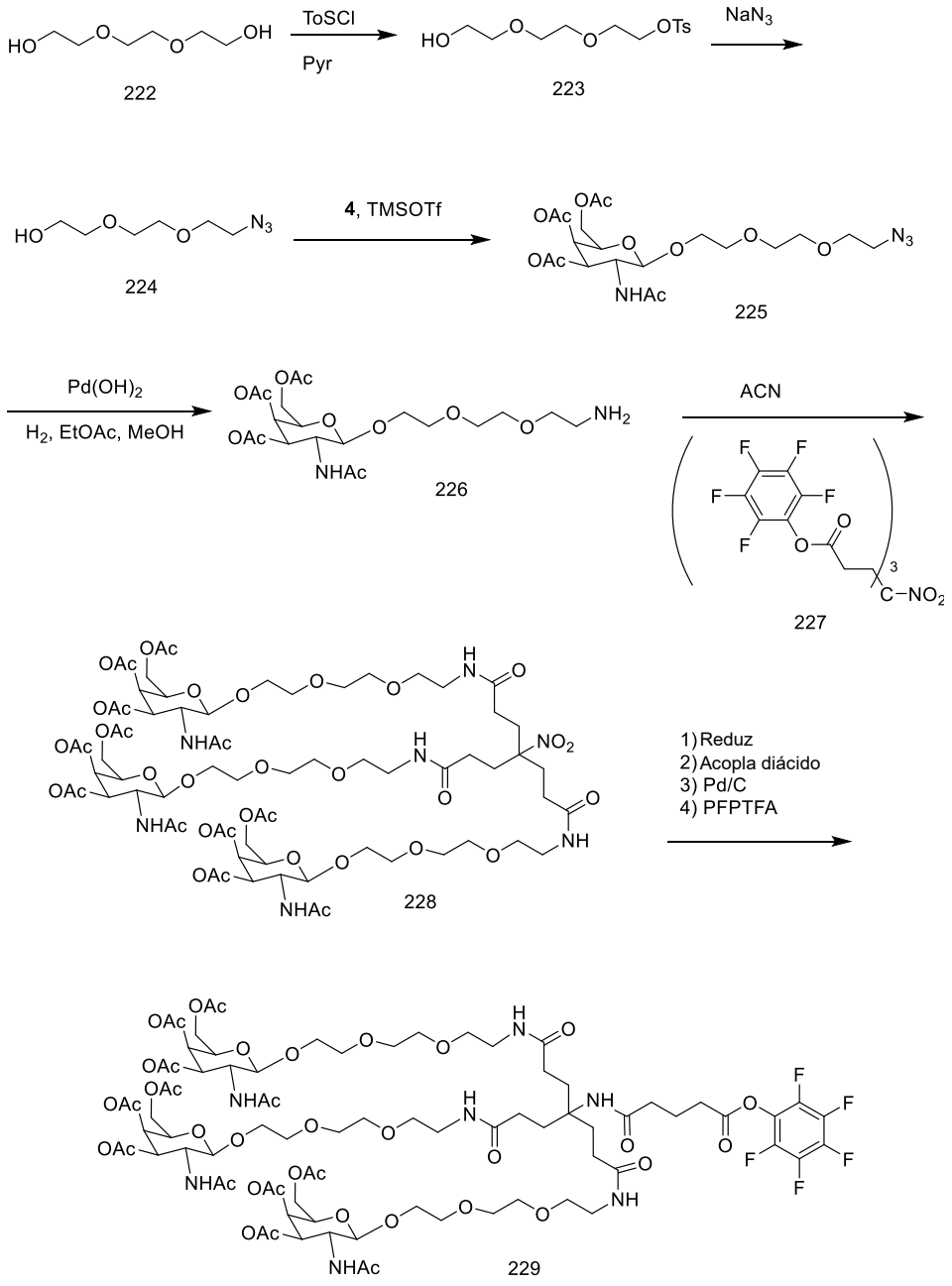
Análise PK no Fígado

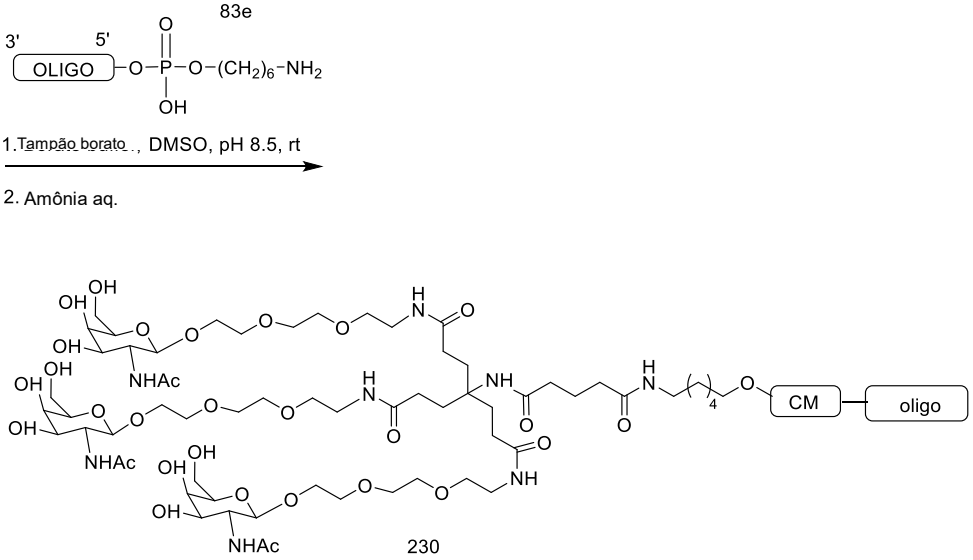
ISIS No.	Dosagem (mg/kg)	Nível de Tecido Total por UV (μg/g)	Nível de Tecido ASO de origem por EIC (μg/g)	Agrupamento $_{GalNAc}3$	CM
353382	3	8,9	8,6	n/a	n/a
	10	22,4	21,0		
	30	54,2	44,2		
661161	5	32,4	20,7	$GalNAc_3$-3a	A_d
	15	63,2	44,1		
671144	5	20,5	19,2	$GalNAc_3$-12a	A_d
	15	48,6	41,5		
670061	5	31,6	28,0	$GalNAc_3$-13a	A_d
	15	67,6	55,5		
671261	5	19,8	16,8	$GalNAc_3$-14a	A_d
	15	64,7	49,1		
671262	5	18,5	7,4	$GalNAc_3$-15a	A_d
	15	52,3	24,2		
670699	5	16,4	10,4	$GalNAc_3$-3a	T_d
	15	31,5	22,5		
670700	5	19,3	10,9	$GalNAc_3$-3a	A_e
	15	38,1	20,0		
670701	5	21,8	8,8	$GalNAc_3$-3a	T_e
	15	35,2	16,1		
671165	5	27,1	26,5	$GalNAc_3$-13a	A_d
	15	48,3	44,3		
666904	5	30,8	24,0	$GalNAc_3$-3a	PO
	15	52,6	37,6		
675441	5	25,4	19,0	$GalNAc_3$-17a	A_d
	15	54,2	42,1		
675442	5	22,2	20,7	$GalNAc_3$-18a	A_d
	15	39,6	29,0		

[001087] Os resultados na Tabela 63 acima mostram que houve maiores níveis de tecido hepático dos oligonucleotídeos compreendendo um grupo de conjugado de $GalNAc_3$ do que do oligonucleotídeo de origem que não compreende um grupo de conjugado de $GalNAc_3$ (ISIS 353382) 72 horas após a administração do oligonucleotídeo, particularmente ao levar em consideração as diferenças na dosagem entre os

oligonucleotídeos com e sem um grupo de conjugado de $GalNAc_3$. Além disso, em 72 horas, 40-98% de cada oligonucleotídeo compreendendo um grupo de conjugado de $GalNAc_3$ foram metabolizados no composto de origem, indicando que os grupos de conjugado de $GalNAc_3$ foram clivados a partir dos oligonucleotídeos.

Exemplo 76: Preparação do composto oligomérico 230, compreendendo $GalNAc_3$-23





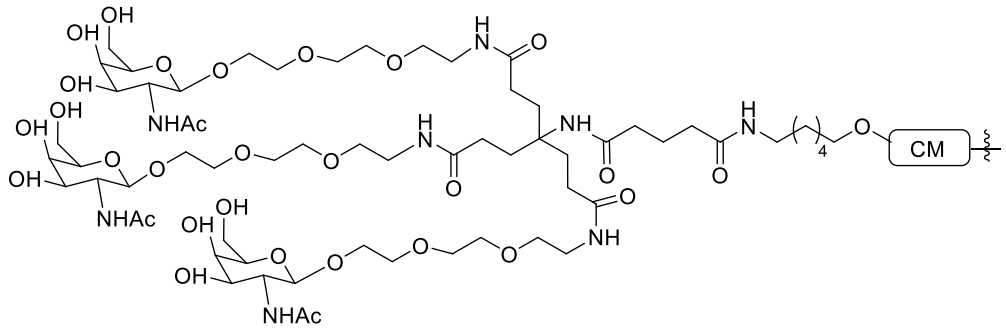
[001088] O composto 222 está disponível comercialmente. 44,48 ml (0,33 mol) do composto 222 foram tratados com cloreto de tosila (25,39 g, 0,13 mol) em piridina (500mL) por 16 horas. A reação foi então evaporada para um óleo, dissolvida em EtOAc e lavada com água, $NaHCO_3$ saturado, salmoura e foi seca sobre Na_2SO_4. O acetato de etila foi concentrado até a secura e purificado por cromatografia em coluna, eluído com EtOAc/hexanos (1:1) seguidos de 10% de metanol em CH_2Cl_2 para render o composto 223 como um óleo incolor. LCMS e RMN foram consistentes com a estrutura. 10 g (32,86 mmol) de 1-Tosiltrietileno glicol (composto 223) foi tratado com azida sódica (10,68 g, 164,28 mmol) em DMSO (100 mL) à temperatura ambiente por 17 horas. A mistura de reação foi então vertida em água, e extraída com EtOAc. A camada orgânica foi lavada com água três vezes e seca sobre Na_2SO_4. A camada orgânica foi concentrada até a secura para render 5,3 g do composto 224 (92%). LCMS e RMN foram consistentes com a estrutura. 1-Azidotrietileno glicol (composto 224, 5,53 g, 23,69 mmol) e composto 4 (6 g, 18,22 mmol) foram tratados com peneiras moleculares 4A (5 g), e TMSOTf (1,65 ml, 9,11 mmol) em diclorometano (100 mL) sob uma atmosfera inerte. Após 14 horas, a reação foi filtrada para remover as peneiras, e a camada orgânica foi lavada com sal. $NAHCO_3$ saturado,

água, salmoura e foi seca sobre Na_2SO_4. A camada orgânica foi concentrada à secura e purificada por cromatografia de coluna, eluída com um gradiente de metanol 2 a 4% em diclorometano para gerar o composto 225. LCMS e RMN foram consistentes com a estrutura. O composto 225 (11,9 g, 23,59 mmol) foi hidrogenado em EtOAc/Metanol (4:1, 250 mL) com catalisador de Pearlman. Após 8 horas, o catalisador foi removido por filtração e os solventes removidos à secura para gerar o composto 226. LCMS e RMN foram consistentes com a estrutura.

[001089] A fim de gerar o composto 227, uma solução de ácido nitrometanotrispropiônico (4,17 g, 15,04 mmol) e base de Hunig (10,3 ml, 60,17 mmol) em DMF (100 mL) foram tratados em gotas com acetato de pentaflourotrifluoro (9,05 ml, 52,65 mmol). Após 30 minutos, a reação foi despejada em água gelada e extraída com EtOAc. A camada orgânica foi lavada com água, salmoura e seca sobre Na_2SO_4. A camada orgânica foi concentrada à secura e, em seguida, recristalizada a partir do heptano para render o composto 227 como um sólido branco. LCMS e RMN foram consistentes com a estrutura. O composto 227 (1,5 g, 1,93 mmol) e o composto 226 (3,7 g, 7,74 mmol) foram agitados à temperatura ambiente em acetonitrila (15 mL) por 2 horas. A reação foi então evaporada à secura e purificada por cromatografia de coluna, eluindo-se com um gradiente de metanol 2 a 10% em diclorometano para gerar o composto 228. LCMS e RMN foram consistentes com a estrutura. O composto 228 (1,7 g, 1,02 mmol) foi tratado com níquel de Raney (cerca de 2 g úmido) em etanol (100mL) numa atmosfera de hidrogênio. Após 12 horas, o catalisador foi removido por filtração e a camada orgânica foi evaporada a um sólido que foi usado diretamente na etapa seguinte. LCMS e RMN foram consistentes com a estrutura. Este sólido (0,87 g, 0,53 mmol) foi tratado com ácido benzilglutárico (0,18 g, 0,8 mmol), HBTU (0,3 g, 0,8 mmol) e DIEA (273,7 µl, 1,6 mmol) em DMF (5 mL). Após 16 horas, o DMF foi removido sob pressão reduzida a 65°C a um

óleo, e o óleo foi dissolvido em diclorometano. A camada orgânica foi lavada com solução de sal. $NaHCO_3$, salmoura e seca sobre Na_2SO_4. Após a evaporação da camada orgânica, o composto foi purificado por cromatografia de coluna e eluído com um gradiente de metanol 2 a 20% em diclorometano para gerar o produto acoplado. LCMS e RMN foram consistentes com a estrutura. O éster benzílico foi desprotegido com catalisador de Pearlman sob uma atmosfera de hidrogênio por 1 hora. O catalisador foi então removido por filtração e os solventes removidos à secura para gerar o ácido. LCMS e RMN foram consistentes com a estrutura. O ácido (486 mg, 0,27 mmol) foi dissolvido em DMF seco (3 mL). Piridina (53,61 µl, 0,66 mmol) foi adicionada e a reação foi purgada com argônio. Acetato de pentaflourotriflouro (46,39 µl, 0,4 mmol) foi lentamente adicionado à mistura de reação. A cor da reação mudou de amarelo pálido para vinho, e gerou uma fumaça clara que foi dissipada com um fluxo de argônio. A reação foi deixada agitar à temperatura ambiente por uma hora (a conclusão da reação foi confirmada por LCMS). O solvente foi removido sob pressão reduzida (rotovap) a 70°C. O resíduo foi diluído com DCM e lavado com 1N $NaHSO_4$, salmoura, bicarbonato de sódio saturado e salmoura novamente. Os produtos orgânicos foram secos com Na_2SO_4, filtrados, e foram concentrados à secura para gerar 225 mg do composto 229 como uma espuma amarela frágil. LCMS e RMN foram consistentes com a estrutura.

[001090] Composto Oligomérico 230, compreendendo um grupo de conjugado de $GalNAc_3$-23 foi preparado a partir do composto 229 usando os procedimentos gerais ilustrados no Exemplo 46. A parte do agrupamento de $GalNAc_3$ do grupo de conjugado $GalNAc_3$-23 ($GalNAc_3$-23_a) pode ser combinado com qualquer porção clivável para fornecer uma variedade de grupos conjugados. A estrutura de $GalNAc_3$-23 ($GalNAc_3$-23_a-CM) é mostrada abaixo:



Exemplo 77: Inibição antissenso *in vivo* por oligonucleotídeos que direcionam SRB-1 compreendendo conjugado GalNAc3

[001091] Os oligonucleotídeos listados abaixo foram testados em um estudo dependente de dose para a inibição antissenso de SRB-1 em camundongos.

Tabela 64

ASOs modificados direcionados a SRB-1

ISIS No.	Sequências (5' para 3')	Agrupamento $_{GalNAc}3$	CM	SEQ ID Nº
661161	**GalNAc$_3$-3$_{a\text{-}o'}$A$_{do}$**G$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$A$_{ds}$G$_{ds}$T$_{ds}$^{m}C$_{ds}$A$_{ds}$T$_{ds}$ G$_{ds}$A$_{ds}$^{m}C$_{ds}$T$_{ds}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$Te	GalNAc$_3$-3a	A$_d$	254
666904	**GalNAc$_3$-3$_{a\text{-}o'}$**G$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$A$_{ds}$G$_{ds}$T$_{ds}$^{m}C$_{ds}$A$_{ds}$T$_{ds}$ G$_{ds}$A$_{ds}$^{m}C$_{ds}$T$_{ds}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{e}$	GalNAc$_3$-3a	PO	252
673502	**GalNAc$_3$-10$_{a\text{-}o'}$A$_{do}$**G$_{es}$^{m}C$_{eo}$T$_{eo}$T$_{eo}$^{m}C$_{eo}$A$_{ds}$G$_{ds}$T$_{ds}$^{m}C$_{ds}$A$_{ds}$T$_{ds}$ G$_{ds}$A$_{ds}$^{m}C$_{ds}$T$_{ds}$T$_{eo}$^{m}C$_{eo}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$Te	GalNAc$_3$-10a	A$_d$	254
677844	**GalNAc$_3$-9$_{a\text{-}o'}$A$_{do}$**G$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$A$_{ds}$G$_{ds}$T$_{ds}$^{m}C$_{ds}$A$_{ds}$T$_{ds}$ G$_{ds}$A$_{ds}$^{m}C$_{ds}$T$_{ds}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$Te	GalNAc$_3$-9a	A$_d$	254
677843	**GalNAc$_3$-23$_{a\text{-}o'}$A$_{do}$**G$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$A$_{ds}$G$_{ds}$T$_{ds}$^{m}C$_{ds}$A$_{ds}$T$_{ds}$ G$_{ds}$A$_{ds}$^{m}C$_{ds}$T$_{ds}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$Te	GalNAc$_3$-23a	A$_d$	254
655861	G$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$A$_{ds}$G$_{ds}$T$_{ds}$^{m}C$_{ds}$A$_{ds}$T$_{ds}$G$_{ds}$A$_{ds}$^{m}C$_{ds}$T$_{ds}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$ ^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{eo}$**A$_{do'}$-GalNAc$_3$-1$_a$**	GalNAc$_3$-1a	A$_d$	253
677841	G$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$A$_{ds}$G$_{ds}$T$_{ds}$^{m}C$_{ds}$A$_{ds}$T$_{ds}$G$_{ds}$A$_{ds}$^{m}C$_{ds}$T$_{ds}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$ ^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{eo}$**A$_{do'}$-GalNAc$_3$-19$_a$**	GalNAc$_3$-19a	A$_d$	253
677842	G$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$A$_{ds}$G$_{ds}$T$_{ds}$^{m}C$_{ds}$A$_{ds}$T$_{ds}$ G$_{ds}$A$_{ds}$^{m}C$_{ds}$T$_{ds}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$ ^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{eo}$**A$_{do'}$-GalNAc$_3$-20$_a$**	GalNAc$_3$-20a	A$_d$	253

[001092] A estrutura GalNAc$_3$-1$_a$ foi mostrada anteriormente no Exemplo 9, GalNAc$_3$-3$_a$ foi mostrada no Exemplo 39, GalNAc$_3$-9$_a$ foi mostrada no Exemplo 52, GalNAc$_3$-10$_a$ foi mostrada no Exemplo 46, GalNAc$_3$-20$_a$ foi mostrada no Exemplo 71, e GalNAc$_3$-23$_a$ foi mostrada no Exemplo 76.

Tratamento

[001093] Camundongos C57BL/6 de seis a oito semanas de idade (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) foram, cada um, injetados por via subcutânea uma vez numa dosagem mostrada abaixo com um oligonucleotídeo listado na Tabela 64 ou com salina. Cada grupo de tratamento

consistiu em 4 animais. Os camundongos foram sacrificados 72 horas após a administração final para determinar os níveis de mRNA de SRB-1 usando PCR em tempo real e reagente de quantificação de RNA RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) de acordo com protocolos padrão. Os resultados abaixo são apresentados como a porcentagem média dos níveis de mRNA de SRB-1 para cada grupo de tratamento, normalizados para o controle com salina.

[001094] Conforme ilustrado na Tabela 65, o tratamento com oligonucleotídeos antissenso diminuiu os níveis de mRNA de SRB-1 de uma forma dependente da dose.

Tabela 65

mRNA de SRB-1 (% de Salina)

ISIS No.	Dosagem (mg/kg)	mRNA de SRB-1 (% de Salina)	Agrupamento $GalNAc_3$	CM
Salina	n/a	100,0	n/a	n/a
661161	0,5	89,18	$GalNAc_3$-3a	A_d
	1,5	77,02		
	5	29,10		
	15	12,64		
666904	0,5	93,11	$GalNAc_3$-3a	PO
	1,5	55,85		
	5	21,29		
	15	13,43		
673502	0,5	77,75	$GalNAc_3$-10a	A_d
	1,5	41,05		
	5	19,27		
	15	14,41		
677844	0,5	87,65	$GalNAc_3$-9a	A_d
	1,5	93,04		
	5	40,77		
	15	16,95		
677843	0,5	102,28	$GalNAc_3$-23a	A_d
	1,5	70,51		
	5	30,68		
	15	13,26		
655861	0,5	79,72	$GalNAc_3$-1a	A_d
	1,5	55,48		
	5	26,99		
	15	17,58		
677841	0,5	67,43	$GalNAc_3$-19a	A_d
	1,5	45,13		
	5	27,02		
	15	12,41		
677842	0,5	64,13	$GalNAc_3$-20a	A_d
	1,5	53,56		
	5	20,47		
	15	10,23		

[001095] Os níveis de transaminase, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) hepáticas no soro também foram

medidos usando protocolos padrão. Também foram avaliadas a bilirrubina total e BUN. As alterações dos pesos corporais foram avaliadas sem nenhuma diferença significativa do grupo com salina (dados não mostrados). Os valores de ALTs, ASTs, bilirrubina total e BUN são mostrados na Tabela 66 abaixo.

Tabela 66

ISIS No.	Dosagem (mg/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)	Bilirrubina Total (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Agrupamento $GalNAc_3$	CM
Salina	n/a	21	45	0,13	34	n/a	n/a
661161	0,5	28	51	0,14	39	$GalNAc_3$-3a	A_d
	1,5	23	42	0,13	39		
	5	22	59	0,13	37		
	15	21	56	0,15	35		
666904	0,5	24	56	0,14	37	$GalNAc_3$-3a	PO
	1,5	26	68	0,15	35		
	5	23	77	0,14	34		
	15	24	60	0,13	35		
673502	0,5	24	59	0,16	34	$GalNAc_3$-10a	A_d
	1,5	20	46	0,17	32		
	5	24	45	0,12	31		
	15	24	47	0,13	34		
677844	0,5	25	61	0,14	37	$GalNAc_3$-9a	A_d
	1,5	23	64	0,17	33		
	5	25	58	0,13	35		
	15	22	65	0,14	34		
677843	0,5	53	53	0,13	35	$GalNAc_3$-23a	A_d
	1,5	25	54	0,13	34		
	5	21	60	0,15	34		
	15	22	43	0,12	38		
655861	0,5	21	48	0,15	33	$GalNAc_3$-1a	A_d
	1,5	28	54	0,12	35		
	5	22	60	0,13	36		
	15	21	55	0,17	30		
677841	0,5	32	54	0,13	34	$GalNAc_3$-19a	A_d
	1,5	24	56	0,14	34		
	5	23	92	0,18	31		
	15	24	58	0,15	31		
677842	0,5	23	61	0,15	35	$GalNAc_3$-20a	A_d
	1,5	24	57	0,14	34		
	5	41	62	0,15	35		
	15	24	37	0,14	32		

Exemplo 78: Inibição antissenso *in vivo* por oligonucleotídeos que direcionam Angiotensinogênio compreendendo conjugado $GalNAc_3$

[001096] Os oligonucleotídeos listados abaixo foram testados em um estudo dependente de dose para inibição antissenso do Angiotensinogênio (AGT) em ratos Sprague Dawley normotensos.

Tabela 67

ASOs modificados direcionados a AGT

ISIS No.	Sequências (5' para 3')	Agrupamento $GalNAc_3$	CM	SEQ ID Nº
552668	$^{m}C_{es}A_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}G_{es}A_{ds}T_{ds}T_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{es}$	n/a	n/a	258

	$G_{es}G_{es}A_{es}T_e$			
669509	$^mC_{es}A_{es}{}^mC_{es}T_{es}G_{es}A_{ds}T_{ds}T_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}{}^mC_{ds}{}^mC_{ds}A_{es}G_{es}$ $G_{es}A_{es}T_{eo}$**$A_{do'}$-GalNAc$_3$-1$_a$**	GalNAc$_3$-1$_a$	A_d	259

[001097] A estrutura de GalNAc$_3$-1$_a$ foi mostrada anteriormente no Exemplo 9.

Tratamento

[001098] Camundongos Sprague Dawley machos de seis semanas de idade foram, cada um, injetados por via subcutânea uma vez por semana numa dosagem mostrada abaixo, para um total de três doses, com um oligonculeotídeo listado na Tabela 67 ou com PBS. Cada grupo de tratamento consistiu em 4 animais. Os camundongos foram sacrificados 72 horas após a dose final. Os níveis de mRNA hepáticos de AGT foram medidos usando PCR em tempo real e reagente de quantificação de RNA RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) de acordo com protocolos padrão. Os níveis plasmáticos da proteína AGT foram medidos usando o ELISA de Angiotensinogênio Total (Catálogo # JP27412, IBL International, Toronto, ON) com plasma diluído 1:20.000. Os resultados abaixo são apresentados como a porcentagem média dos níveis de mRNA de AGT no fígado ou níveis da proteína AGT no plasma para cada grupo de tratamento, normalizados para o controle com PBS.

[001099] Conforme ilustrado no Tabela 68, o tratamento com oligonucleotídeos antissenso diminuiu os níveis da proteína plasmática e do mRNA hepático de AGT de uma forma dependente da dose, e o oligonucleotídeo compreendendo um conjugado de GalNAc foi significativamente mais potente do que o oligonucleotídeo de origem em que faltava um conjugado de GalNAc.

Tabela 68

Níveis da proteína plasmáticos e do mRNA hepático de AGT

ISIS No.	Dosagem (mg/kg)	Fígado AGT mRNA (% PBS)	Proteínas plasmáticas AGT (% PBS)	Agrupamento $_{GalNAc}3$	CM
PBS	n/a	100	100	n/a	n/a
552668	3	95	122	n/a	n/a
	10	85	97		
	30	46	79		

	90	8	11		
669509	0,3	95	70	$GalNAc_3$-1a	A_d
	1	95	129		
	3	62	97		
	10	9	23		

[001100] Os níveis da transaminase, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) hepáticas, no plasma e os pesos corporais também foram medidos no momento do sacrifício usando protocolos padrão. Os resultados são mostrados na Tabela 69 abaixo.

Tabela 69

Níveis de transaminase hepática e pesos corporais dos ratos

ISIS No.	Dosagem (mg/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)	Peso corporal (% de linha de base)	Agrupamento $_{GalNAc}3$	CM
PBS	n/a	51	81	186	n/a	n/a
552668	3	54	93	183	n/a	n/a
	10	51	93	194		
	30	59	99	182		
	90	56	78	170		
669509	0,3	53	90	190	$GalNAc_3$-1a	A_d
	1	51	93	192		
	3	48	85	189		
	10	56	95	189		

Exemplo 79: Duração do estudo de ação *in vivo* de oligonucleotídeos que direcionam APOC-III compreendendo um conjugado $_{GalNAc}3$

[001101] Os oligonucleotídeos listados na Tabela 70 abaixo foram testados em um estudo de dose única para a duração da ação em camundongos.

Tabela 70

ASOs modificados que se direcionam a APOC-III

ISIS No.	Sequências (5' para 3')	Agrupamento $_{GalNAc}3$	CM	SEQ ID Nº
304801	$A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{es}T_{es}T_{es}A_{es}T_{e}$	n/a	n/a	244
647535	$A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{es}T_{es}T_{es}A_{es}T_{eo}\mathbf{A_{do'}\text{-}GalNAc_3\text{-}1_a}$	$GalNAc_3$-1a	A_d	245
663083	$\mathbf{GalNAc_3\text{-}3_{a\text{-}o'}A_{do}}A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{es}T_{es}T_{es}A_{es}T_{e}$	$GalNAc_3$-3a	A_d	260
674449	$\mathbf{GalNAc_3\text{-}7_{a\text{-}o'}A_{do}}A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{es}T_{es}T_{es}A_{es}T_{e}$	$GalNAc_3$-7a	A_d	260
674450	$\mathbf{GalNAc_3\text{-}10_{a\text{-}o'}A_{do}}A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{es}T_{es}T_{es}A_{es}T_{e}$	$GalNAc_3$-10a	A_d	260
674451	$\mathbf{GalNAc_3\text{-}13_{a\text{-}o'}A_{do}}A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{es}T_{es}T_{es}A_{es}T_{e}$	$GalNAc_3$-13a	A_d	260

[001102] A estrutura $GalNAc_3\text{-}1_a$ foi mostrada anteriormente no Exemplo 9, $GalNAc_3\text{-}3_a$ foi mostrada no Exemplo 39, $GalNAc_3\text{-}7_a$ foi mostrada

no Exemplo 48, $GalNAc_3$-10_a foi mostrada no Exemplo 46, $GalNAc_3$-13_a foi mostrada no Exemplo 62.

Tratamento

[001103] Camundongos transgênicos de seis a oito semanas de idade que expressam APOC-III humana foram, cada um, injetados por via subcutânea uma vez com um oligonucleotídeo listado na Tabela 70 ou com PBS. Cada grupo de tratamento consistiu em 3 animais. O sangue foi retirado antes da dosagem para determinar a base de referência e em 72 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas e 6 semanas após a dose. Os níveis de triglicérides plasmáticos e da proteína APOC-III foram medidos conforme descrito no Exemplo 20. Os resultados abaixo são apresentados como a porcentagem média dos níveis de triglicérides plasmáticos e de APOC-III para cada grupo de tratamento, normalizados para os níveis de base de referência, mostrando que os oligonucleotídeos que compreendem um grupo de conjugado de GalNAc exibiam uma duração mais longa de ação do que o oligonucleotídeo de origem sem um grupo de conjugado (ISIS 304801), mesmo com a dosagem do original sendo três vezes a dosagem dos oligonucleotídeos que compreendem um grupo de conjugado de GalNAc.

Tabela 71

Níveis de triglicérides plasmáticos e da proteína APOC-III em camundongos trangênicos

ISIS No.	Dosagem (mg/kg)	Ponto do tempo (dias pós-dose)	Triglicerídeos (% da linha de base)	Proteína de APOC-III (% da linha de base)	Agrupamento $GalNAc_3$	CM
PBS	n/a	3	97	102	n/a	n/a
		7	101	98		
		14	108	98		
		21	107	107		
		28	94	91		
		35	88	90		
		42	91	105		
304801	30	3	40	34	n/a	n/a
		7	41	37		
		14	50	57		
		21	50	50		
		28	57	73		
		35	68	70		
		42	75	93		

647535	10	3	36	37	$GalNAc_3$-1a	A_d
		7	39	47		
		14	40	45		
		21	41	41		
		28	42	62		
		35	69	69		
		42	85	102		
663083	10	3	24	18	$GalNAc_3$-3a	A_d
		7	28	23		
		14	25	27		
		21	28	28		
		28	37	44		
		35	55	57		
		42	60	78		
674449	10	3	29	26	$GalNAc_3$-7a	A_d
		7	32	31		
		14	38	41		
		21	44	44		
		28	53	63		
		35	69	77		
		42	78	99		
674450	10	3	33	30	$GalNAc_3$-10a	A_d
		7	35	34		
		14	31	34		
		21	44	44		
		28	56	61		
		35	68	70		
		42	83	95		
674451	10	3	35	33	$GalNAc_3$-13a	A_d
		7	24	32		
		14	40	34		
		21	48	48		
		28	54	67		
		35	65	75		
		42	74	97		

Exemplo 80: Inibição antissenso *in vivo* por oligonucleotídeos que direcionam Alfa-1-Antitripsina (A1AT) compreendendo conjugado $GalNAc_3$

[001104] Os oligonucleotídeos listados na Tabela 72 abaixo foram testados em um estudo para a inibição dependente de dose de A1AT em camundongos.

Tabela 72

ASOs modificados direcionados à A1AT

ISIS No.	Sequências (5' para 3')	Agrupamento $_{GalNAc}3$	CM	SEQ ID Nº
476366	$A_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}A_{es}A_{ds}T_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{es}A_{es}$ $G_{es}G_{e}$-$_{s}A_{e}$	n/a	n/a	261
656326	$A_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}A_{es}A_{ds}T_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{es}A_{es}$ $G_{es}G_{e}$-$_{s}A_{eo}$**$A_{do'}$-GalNAc$_3$-1$_a$**	$GalNAc_3$-1a	A_d	262
678381	**GalNAc$_3$-3$_{a-o'}$$A_{do}$**$A_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}A_{es}A_{ds}T_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}A_{ds}$ $A_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{es}A_{es}$ $G_{es}G_{es}A_{e}$	$GalNAc_3$-3a	A_d	263
678382	**GalNAc$_3$-7$_{a-o'}$$A_{do}$**$A_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}A_{es}A_{ds}T_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}A_{ds}$ $A_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{es}A_{es}$ $G_{es}G_{es}A_{e}$	$GalNAc_3$-7a	A_d	263
678383	**GalNAc$_3$-10$_{a-o'}$$A_{do}$**$A_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}A_{es}A_{ds}T_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}$ $A_{ds}A_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{es}A_{es}$ $G_{es}G_{es}A_{e}$	$GalNAc_3$-10a	A_d	263
678384	**GalNAc$_3$-13$_{a-o'}$$A_{do}$**$A_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}A_{es}A_{ds}T_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}$ $A_{ds}A_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{es}A_{es}$ $G_{es}G_{es}A_{e}$	$GalNAc_3$-13a	A_d	263

[001105] A estrutura $GalNAc_3$-1_a foi mostrada anteriormente no Exemplo 9, $GalNAc_3$-3_a foi mostrada no Exemplo 39, $GalNAc_3$-7_a foi mostrada no Exemplo 48, $GalNAc_3$-10_a foi mostrada no Exemplo 46, $GalNAc_3$-13_a foi mostrada no Exemplo 62.

Tratamento

[001106] Camundongos C57BL/6 machos de seis semanas de idade (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) foram, cada um, injetados por via subcutânea uma vez por semana numa dosagem mostrada abaixo, para um total de três doses, com um oligonucleotídeo listado na Tabela 72 ou com PBS. Cada grupo de tratamento consistiu em 4 animais. Os camundongos foram sacrificados 72 horas após a administração final. Os níveis de mRNA hepáticos de A1AT foram medidos usando PCR em tempo real e reagente de quantificação de RNA RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) de acordo com protocolos padrão. Os níveis da proteína plasmática A1AT foram determinados usando o ELISA de Alfa-1 Antitripsina de Camundongo (catálogo # 41-A1AMS-E01, Alpco, Salem, NH). Os resultados abaixo são apresentados como a porcentagem média dos níveis da proteína plasmática e do mRNA hepático de A1AT para cada grupo de tratamento, normalizados para o controle com PBS.

[001107] Conforme ilustrado na Tabela 73, o tratamento com oligonucleotídeos antissenso diminuiu os níveis da proteína plasmática A1AT e do mRNA hepático de A1AT de uma forma dependente da dose. Os oligonucleotídeos compreendendo um conjugado de GalNAc foram significativamente mais potentes do que o original (ISIS 476366).

Tabela 73

Níveis da proteína plasmática e do mRNA hepático de A1AT

ISIS No.	Dosagem (mg/kg)	A1AT fígado mRNA (% PBS)	A1AT proteína plasmática (% PBS)	Agrupamento $_{GalNAc}3$	CM
PBS	n/a	100	100	n/a	n/a
476366	5	86	78	n/a	n/a

	15	73	61		
	45	30	38		
656326	0,6	99	90	$GalNAc_3$-1a	A_d
	2	61	70		
	6	15	30		
	18	6	10		
678381	0,6	105	90	$GalNAc_3$-3a	A_d
	2	53	60		
	6	16	20		
	18	7	13		
678382	0,6	90	79	$GalNAc_3$-7a	A_d
	2	49	57		
	6	21	27		
	18	8	11		
678383	0,6	94	84	$GalNAc_3$-10a	A_d
	2	44	53		
	6	13	24		
	18	6	10		
678384	0,6	106	91	$GalNAc_3$-13a	A_d
	2	65	59		
	6	26	31		
	18	11	15		

[001108] Níveis de BUN e transaminase hepática no plasma foram medidos no momento de sacrifício usando protocolos padrão. Os pesos corporais e os pesos dos órgãos também foram medidos. Os resultados são mostrados na Tabela 74 abaixo. O peso corporal é mostrado como % em relação à base de referência. Os pesos dos órgãos são mostrados como % de peso corporal em relação ao grupo controle com PBS.

Tabela 74

ISIS No.	Dosagem (mg/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)	BUN (mg/dL)	Peso corporal (% de linha de base)	Peso do fígado (Rel. % de peso corporal)	Peso do rim (Rel % de peso corporal)	Peso do baço (Rel % de peso corporal)
PBS	n/a	25	51	37	119	100	100	100
476366	5	34	68	35	116	91	98	106
	15	37	74	30	122	92	101	128
	45	30	47	31	118	99	108	123
656326	0,6	29	57	40	123	100	103	119
	2	36	75	39	114	98	111	106
	6	32	67	39	125	99	97	122
	18	46	77	36	116	102	109	101
678381	0,6	26	57	32	117	93	109	110
	2	26	52	33	121	96	106	125
	6	40	78	32	124	92	106	126
	18	31	54	28	118	94	103	120
678382	0,6	26	42	35	114	100	103	103
	2	25	50	31	117	91	104	117
	6	30	79	29	117	89	102	107
	18	65	112	31	120	89	104	113
678383	0,6	30	67	38	121	91	100	123
	2	33	53	33	118	98	102	121
	6	32	63	32	117	97	105	105
	18	36	68	31	118	99	103	108
678384	0,6	36	63	31	118	98	103	98
	2	32	61	32	119	93	102	114
	6	34	69	34	122	100	100	96
	18	28	54	30	117	98	101	104

Exemplo 81: Duração do estudo de ação *in vivo* de oligonucleotídeos que direcionam A1AT compreendendo um agrupamento GalNAc3

[001109] Os oligonucleotídeos listados na Tabela 72 foram testados em um estudo de dose única para duração da ação em camundongos.

Tratamento

[001110] Os camundongos C57BL/6 machos de seis semanas de idade foram, cada um, injetados por via subcutânea uma vez com um oligonucleotídeo listado na Tabela 72 ou com PBS. Cada grupo de tratamento consistiu em 4 animais. O sangue foi retirado No dia antes da dosagem para determinar a base de referência e em 5, 12, 19 e 25 dias após a dose. Os níveis da proteína A1AT plasmática foram medidos através de ELISA (ver o Exemplo 80). Os resultados abaixo são apresentados como a porcentagem média dos níveis da proteína A1AT plasmática para cada grupo de tratamento, normalizados para os níveis de base de referência. Os resultados mostram que os oligonucleotídeos que compreendem um conjugado de GalNAc eram mais potentes e tinham maior duração de ação do que o original em que faltava um conjugado de GalNAc (ISIS 476366). Além disso, os oligonucleotídeos que compreendem um conjugado de 5'-GalNAc (ISIS 678381, 678382, 678383 e 678384) eram geralmente ainda mais potentes com maior duração de ação do que o oligonucleotídeo que compreende um conjugado de 3'-GalNAc (ISIS 656326).

Tabela 75

Níveis da proteína A1AT plasmática em camundongos

ISIS No.	Dosagem (mg/kg)	Ponto do tempo (dias pós-dose)	A1AT (% de linha de base)	Agrupamento GalNAc3	CM
PBS	n/a	5	93	n/a	n/a
		12	93		
		19	90		
		25	97		
476366	100	5	38	n/a	n/a
		12	46		
		19	62		
		25	77		
656326	18	5	33	$GalNAc_3$-1a	A_d

		12	36		
		19	51		
		25	72		
678381	18	5	21	$GalNAc_3$-3a	A_d
		12	21		
		19	35		
		25	48		
678382	18	5	21	$GalNAc_3$-7a	A_d
		12	21		
		19	39		
		25	60		
678383	18	5	24	$GalNAc_3$-10a	A_d
		12	21		
		19	45		
		25	73		
678384	18	5	29	$GalNAc_3$-13a	A_d
		12	34		
		19	57		
		25	76		

Example 82: Inibição antissenso *in vitro* por oligonucleotídeos que direcionam SRB-1 compreendendo conjugado $_{GalNAc}$3

[001111] Os hepatócitos primários de fígado de camundongo foram semeados em placas de 96 poços em 15.000 células/poço 2 horas antes do tratamento. Os oligonucleotídeos listados na Tabela 76 foram adicionados em 2, 10, 50 ou 250 nM em meio Williams E e as células foram incubadas durante a noite a 37 ºC em 5% de CO_2. As células foram lisadas 16 horas após a adição do oligonucleotídeo, e o RNA total foi purificado usando RNease 3000 BioRobot (Qiagen). Os níveis de mRNA de SRB-1 foram determinados usando PCR em tempo real e reagente de quantificação de RNA RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) de acordo com protocolos padrão. Valores de IC_{50} foram determinados usando o software Prism 4 (GraphPad). Os resultados mostram que os oligonucleotídeos que compreendem uma variedade de diferentes grupos de conjugado de GalNAc e uma variedade de diferentes frações cliváveis são significativamente mais potentes em um experimento de absorção livre *in vitro* do que os oligonucleotídeos de origem em que faltam um grupo de conjugado de GalNAc (ISIS 353382 e 666841).

Tabela 76

Inibição da expressão de SRB-1 *in vitro*

ISIS No.	Sequência (5' e 3')	Ligações	Agrupamento GalNAc3	CM	IC_{50} (nM)	SEQ ID No.
353382	$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}$ $^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	PS	n/a	n/a	250	252
655861	$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}$ $^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{eo}\mathbf{A_{do'}}$-**GalNAc$_3-1_a$**	PS	GalNAc$_3$-1$_a$	A_d	40	253
661161	**GalNAc$_3$-3$_{a-o'}$A$_{do}$**$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}$ $^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	PS	GalNAc$_3$-3$_a$	A_d	40	254
661162	**GalNAc$_3$-3$_{a-o'}$A$_{do}$**$G_{es}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{eo}A_{ds}G_{ds}T_{ds}$ $^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{eo}{}^{m}C_{eo}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	PO/PS	GalNAc$_3$-3$_a$	A_d	8	254
664078	$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}$ $^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{eo}\mathbf{A_{do'}}$-**GalNAc$_3-9_a$**	PS	GalNAc$_3$-9$_a$	A_d	20	253
665001	**GalNAc$_3$-8$_{a-o'}$A$_{do}$**$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}$ $^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	PS	GalNAc$_3$-8$_a$	A_d	70	254
666224	**GalNAc$_3$-5$_{a-o'}$A$_{do}$**$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}$ $^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	PS	GalNAc$_3$-5$_a$	A_d	80	254
666841	$G_{es}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}$ $^{m}C_{ds}T_{ds}T_{eo}{}^{m}C_{eo}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	PO/PS	n/a	n/a	>250	252
666881	**GalNAc$_3$-10$_{a-o'}$A$_{do}$**$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}$ $^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	PS	GalNAc$_3$-10$_a$	A_d	30	254
666904	**GalNAc$_3$-3$_{a-o'}$**$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}$ $A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	PS	GalNAc$_3$-3$_a$	PO	9	252
666924	**GalNAc$_3$-3$_{a-o'}$T$_{do}$**$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}$ $^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	PS	GalNAc$_3$-3$_a$	T_d	15	257
666961	**GalNAc$_3$-6$_{a-o'}$A$_{do}$**$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}$ $^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	PS	GalNAc$_3$-6$_a$	A_d	150	254
666981	**GalNAc$_3$-7$_{a-o'}$A$_{do}$**$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}$ $^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	PS	GalNAc$_3$-7$_a$	A_d	20	254
670061	**GalNAc$_3$-13$_{a-o'}$A$_{do}$**$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}$ $^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	PS	GalNAc$_3$-13$_a$	A_d	30	254
670699	**GalNAc$_3$-3$_{a-o'}$T$_{do}$**$G_{es}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{eo}A_{ds}G_{ds}T_{ds}$ $^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}$ $G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{eo}{}^{m}C_{eo}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	PO/PS	GalNAc$_3$-3$_a$	T_d	15	257
670700	**GalNAc$_3$-3$_{a-o'}$A$_{eo}$**$G_{es}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{eo}A_{ds}G_{ds}T_{ds}$ $^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}$ $G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{eo}{}^{m}C_{eo}{}^{m}C_{es}T_{es}T$	PO/PS	GalNAc$_3$-3$_a$	A_e	30	254
670701	**GalNAc$_3$-3$_{a-o'}$T$_{eo}$**$G_{es}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{eo}A_{ds}G_{ds}T_{ds}$ $^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}$ $G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{eo}{}^{m}C_{eo}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	PO/PS	GalNAc$_3$-3$_a$	T_e	25	257
671144	**GalNAc$_3$-12$_{a-o'}$A$_{do}$**$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}$ $^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	PS	GalNAc$_3$-12$_a$	A_d	40	254
671165	**GalNAc$_3$-13$_{a-o'}$A$_{do}$**$G_{es}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{eo}A_{ds}G_{ds}T_{ds}$ $^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}$ $G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{eo}{}^{m}C_{eo}{}^{m}C_{es}T_{es}T$	PO/PS	GalNAc$_3$-13$_a$	A_d	8	254

671261	**GalNAc$_3$-14$_{a-o'}$A$_{do}$**$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}$ $^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	PS	GalNAc$_3$-14$_a$	A_d	>250	254
671262	**GalNAc$_3$-15$_{a-o'}$A$_{do}$**$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}$ $^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	PS	GalNAc$_3$-15$_a$	A_d	>250	254
673501	**GalNAc$_3$-7$_{a-o'}$A$_{do}$**$G_{es}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{eo}A_{ds}G_{ds}T_{ds}$ $^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{eo}{}^{m}C_{eo}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	PO/PS	GalNAc$_3$-7$_a$	A_d	30	254
673502	**GalNAc$_3$-10$_{a-o'}$A$_{do}$**$G_{es}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{eo}A_{ds}G_{ds}T_{ds}$ $^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{eo}{}^{m}C_{eo}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	PO/PS	GalNAc$_3$-10$_a$	A_d	8	254
675441	**GalNAc$_3$-17$_{a-o'}$A$_{do}$**$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}$ $^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	PS	GalNAc$_3$-17$_a$	A_d	30	254
675442	**GalNAc$_3$-18$_{a-o'}$A$_{do}$**$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}$ $^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	PS	GalNAc$_3$-18$_a$	A_d	20	254
677841	$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}$ $^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{eo}\mathbf{A_{do'}}$-**GalNAc$_3-19_a$**	PS	GalNAc$_3$-19$_a$	A_d	40	253
677842	$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}$ $^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{eo}\mathbf{A_{do'}}$-**GalNAc$_3-20_a$**	PS	GalNAc$_3$-20$_a$	A_d	30	253
677843	**GalNAc$_3$-23$_{a-o'}$A$_{do}$**$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}$ $^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	PS	GalNAc$_3$-23$_a$	A_d	40	254

[001112] A estrutura de GalNAc$_3$-1$_a$ foi mostrada anteriormente no Exemplo 9, GalNAc$_3$-3$_a$ foi mostrada anteriormente no Exemplo 39, GalNAc$_3$-5$_a$ foi mostrada anteriormente no Exemplo 49, GalNAc$_3$-6$_a$ foi mostrada anteriormente no Exemplo 51, GalNAc$_3$-7$_a$ foi mostrada anterior-

mente no Exemplo 48, $GalNAc_3$-8_a foi mostrada anteriormente no Exemplo 47, $GalNAc_3$-9_a foi mostrada anteriormente no Exemplo 52, $GalNAc_3$-10_a foi mostrada anteriormente no Exemplo 46, $GalNAc_3$-12_a foi mostrada anteriormente no Exemplo 61, $GalNAc_3$-13_a foi mostrada anteriormente no Exemplo 62, $GalNAc_3$-14_a foi mostrada anteriormente no Exemplo 63, $GalNAc_3$-15_a foi mostrada anteriormente no Exemplo 64, $GalNAc_3$-17_a foi mostrada anteriormente no Exemplo 68, $GalNAc_3$-18_a foi mostrada anteriormente no Exemplo 69, $GalNAc_3$-19_a foi mostrada anteriormente no Exemplo 70, $GalNAc_3$-20_a foi mostrada anteriormente no Exemplo 71 e $GalNAc_3$-23_a foi mostrada anteriormente no Exemplo 76.

Exemplo 83: Inibição antissenso *in vivo* por oligonucleotídeos que se direcionam ao Fator XI compreendendo um agrupamento $_{GalNAc}$3

[001113] Os oligonucleotídeos listados na Tabela 77 abaixo foram testados em um estudo para inibição dependente de dose do Fator XI em camundongos.

Tabela 77

Oligonucleotídeos modificados que se direcionam ao Fator XI

ISIS No.	Sequência (5' e 3')	Agrupamento GalNAc3	CM	SEQ ID No.
404071	$T_{es}G_{es}G_{es}T_{es}A_{es}A_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{es}G_{es}$ $A_{es}G_{es}G_{e}$	n/a	n/a	255
656173	$T_{es}G_{eo}G_{eo}T_{eo}A_{eo}A_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{eo}G_{eo}$ $A_{es}G_{es}G_{eo}\mathbf{A_{do'}}$-**GalNAc$_3-1_a$**	$GalNAc_3$-1_a	A_d	256
663086	**GalNAc$_3$-3$_{a\text{-}o'}$A$_{do}$**$T_{es}G_{eo}G_{eo}T_{eo}A_{eo}A_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}$ $T_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{eo}G_{eo}A_{es}G_{es}G_{e}$	$GalNAc_3$-3_a	A_d	264
678347	**GalNAc$_3$-7$_{a\text{-}o'}$A$_{do}$**$T_{es}G_{eo}G_{eo}T_{eo}A_{eo}A_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}$ $T_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{eo}G_{eo}A_{es}G_{es}G_{e}$	$GalNAc_3$-7_a	A_d	264
678348	**GalNAc$_3$-10$_{a\text{-}o'}$A$_{do}$**$T_{es}G_{eo}G_{eo}T_{eo}A_{eo}A_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}$ $T_{ds}T_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{eo}G_{eo}A_{es}G_{es}G_{e}$	$GalNAc_3$-10_a	A_d	264
678349	**GalNAc$_3$-13$_{a\text{-}o'}$A$_{do}$**$T_{es}G_{eo}G_{eo}T_{eo}A_{eo}A_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}$ $T_{ds}T_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{eo}G_{eo}A_{es}G_{es}G_{e}$	$GalNAc_3$-13_a	A_d	264

[001114] A estrutura $GalNAc_3$-1_a foi mostrada anteriormente no Exemplo 9, $GalNAc_3$-3_a foi mostrada no Exemplo 39, $GalNAc_3$-7_a foi mostrada no Exemplo 48, $GalNAc_3$-10_a foi mostrada no Exemplo 46, $GalNAc_3$-13_a foi mostrada no Exemplo 62.

Tratamento

[001115] Camundongos de seis a oito semanas de idade foram, cada

um, injetados por via subcutânea uma vez por semana numa dosagem mostrada abaixo, para um total de três doses, com um oligonucleotídeo listado abaixo ou com PBS. Cada grupo de tratamento consistiu em 4 animais. Os camundongos foram sacrificados 72 horas após a dose final. Os níveis de mRNA hepático do Fator XI foram medidos usando PCR em tempo real e normalizados para ciclofilina de acordo com protocolos padrão. Transaminases hepáticas, BUN e bilirrubina também foram medidos. Os resultados abaixo são apresentados como a porcentagem média para cada grupo de tratamento, normalizados para o controle com PBS.

[001116] Conforme ilustrado na Tabela 78, o tratamento com oligonucleotídeos antissenso diminuiu o mRNA hepático do Fator XI de uma forma dependente da dose. Os resultados mostram que os oligonucleotídeos compreendendo um conjugado de GalNAc foi mais potente do que o original em que falta um conjugado de GalNAc (ISIS 404071). Além disso, os oligonucleotídeos compreendendo um conjugado de 5'-GalNAc (ISIS 663086, 678347, 678348 e 678349) foram ainda mais potentes do que o oligonucleotídeo que compreende um conjugado de 3'-GalNAc (ISIS 656173).

Tabela 78

Níveis de mRNA hepático do Fator XI, transaminase hepática, BUN e bilirrubina

ISIS No.	Dosagem (mg/kg)	mRNA do Fator XI (% de PBS)	ALT (U/L)	AST (U/L)	BUN (mg/dL)	Bilirrubina (mg/dL)	Agrupamento $_{GalNAc}3$	SEQ ID No.
PBS	n/a	100	63	70	21	0,18	n/a	n/a
404071	3	65	41	58	21	0,15	n/a	255
	10	33	49	53	23	0,15		
	30	17	43	57	22	0,14		
656173	0,7	43	90	89	21	0,16	$GalNAc_3$-1a	256
	2	9	36	58	26	0,17		
	6	3	50	63	25	0,15		
663086	0,7	33	91	169	25	0,16	$GalNAc_3$-3a	264
	2	7	38	55	21	0,16		
	6	1	34	40	23	0,14		
678347	0,7	35	28	49	20	0,14	$GalNAc_3$-7a	264
	2	10	180	149	21	0,18		
	6	1	44	76	19	0,15		
678348	0,7	39	43	54	21	0,16	$GalNAc_3$-10a	264
	2	5	38	55	22	0,17		
	6	2	25	38	20	0,14		
678349	0,7	34	39	46	20	0,16	$GalNAc_3$-13a	264
	2	8	43	63	21	0,14		
	6	2	28	41	20	0,14		

Exemplo 84: Duração do estudo de ação *in vivo* de oligonucleotídeos que direcionam Fator XI compreendendo um conjugado $_{GalNAc}$3

[001117] Os oligonucleotídeos listados na Tabela 77 foram testados em um estudo de dose única para duração da ação em camundongos.

Tratamento

[001118] Camundongos de seis a oito semanas foram, cada um, injetados por via subcutânea uma vez com um oligonucleotídeo listado na Tabela 77 ou com PBS. Cada grupo de tratamento consistiu em 4 animais. Sangue foi retirado por sangramentos da cauda no dia antes da dosagem para determinar a base de referência e em 3, 10 e 17 dias após a dose. Os níveis da proteína do Fator XI plasmático foram medidos por ELISA usando anticorpos de captura do Fator XI e de detecção biotinilados da R & D Systems, Minneapolis, MN (catálogo # AF2460 e # BAF2460, respectivamente) e o Conjunto B do Reagente OptEIA (Catálogo # 550534, BD Biosciences, San Jose, CA). Os resultados abaixo são apresentados como a porcentagem média dos níveis da proteína Fator XI plasmático para cada grupo de tratamento, normalizados para os níveis de base de referência. Os resultados mostram que os oligonucleotídeos que compreendem um conjugado de GalNAc eram mais potentes com maior duração de ação do que o original em que faltava um conjugado de GalNAc (ISIS 404071). Além disso, os oligonucleotídeos que compreendem um conjugado de 5'-GalNAc (ISIS 663086, 678347, 678348 e 678349) foram ainda mais potentes com uma maior duração de ação do que o oligonucleotídeo que compreende um conjugado de 3'-GalNAc (ISIS 656173).

Tabela 79

Níveis da proteína Fator XI plasmático em camundongos

ISIS No.	Dosagem (mg/kg)	Ponto do tempo (dias pós-dose)	Fator XI (% de linha de base)	Agrupamento $_{GalNAc}$3	CM	SEQ ID Nº
PBS	n/a	3	123	n/a	n/a	n/a
		10	56			
		17	100			

404071	30	3	11	n/a	n/a	255
		10	47			
		17	52			
656173	6	3	1	$GalNAc_3$-1a	A_d	256
		10	3			
		17	21			
663086	6	3	1	$GalNAc_3$-3a	A_d	264
		10	2			
		17	9			
678347	6	3	1	$GalNAc_3$-7a	A_d	264
		10	1			
		17	8			
678348	6	3	1	$GalNAc_3$-10a	A_d	264
		10	1			
		17	6			
678349	6	3	1	$GalNAc_3$-13a	A_d	264
		10	1			
		17	5			

Example 85: Inibição antissenso *in vivo* por oligonucleotídeos que direcionam SRB-1 compreendendo conjugado $_{GalNAc}$3

[001119] Os oligonucleotídeos listados na Tabela 76 foram testados em um estudo dependente de dose para a inibição antissenso de SRB-1 em camundongos.

Tratamento

[001120] Camundongos de seis a oito semanas de idade C57BL/6 foram, cada um, injetados por via subcutânea uma vez por semana numa dosagem mostrada abaixo, para um total de três doses, com um oligonucleotídeo listado na Tabela 76 ou com salina. Cada grupo de tratamento consistiu em 4 animais. Os camundongos foram sacrificados 48 horas após a administração final para determinar os níveis de mRNA de SRB-1 usando PCR em tempo real e reagente de quantificação de RNA RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) de acordo com protocolos padrão. Os resultados abaixo são apresentados como a porcentagem média dos níveis de mRNA de SRB-1 hepáticos para cada grupo de tratamento, normalizados para o controle com salina.

[001121] Conforme ilustrado nas Tabela 80 e 841, o tratamento com oligonucleotídeos antissenso diminuiu os níveis do mRNA de SRB-1 de uma forma dependente da dose.

Tabela 80

mRNA de SRB-1 no fígado

ISIS No.	Dosagem (mg/kg)	mRNA de SRB-1 (% de Salina)	Agrupamento $_{GalNAc}$3	CM

Salina	n/a	100	n/a	n/a
655861	0,1	94	$GalNAc_3$-1a	A_d
	0,3	119		
	1	68		
	3	32		
661161	0,1	120	$GalNAc_3$-3a	A_d
	0,3	107		
	1	68		
	3	26		
666881	0,1	107	$GalNAc_3$-10a	A_d
	0,3	107		
	1	69		
	3	27		
666981	0,1	120	$GalNAc_3$-7a	A_d
	0,3	103		
	1	54		
	3	21		
670061	0,1	118	$GalNAc_3$-13a	A_d
	0,3	89		
	1	52		
	3	18		
677842	0,1	119	$GalNAc_3$-20a	A_d
	0,3	96		
	1	65		
	3	23		

Tabela 81

mRNA de SRB-1 no fígado

ISIS No.	Dosagem (mg/kg)	mRNA de SRB-1 (% de Salina)	Agrupamento $_{GalNAc}$3	CM
661161	0,1	107	$GalNAc_3$-3a	A_d
	0,3	95		
	1	53		
	3	18		
677841	0,1	110	$GalNAc_3$-19a	A_d
	0,3	88		
	1	52		
	3	25		

[001122] Os níveis de transaminases hepáticas, bilirrubina total, BUN, e pesos corporais também foram medidos usando protocolos padrão. Os valores médios para cada grupo de tratamento são mostrados na Tabela 82 abaixo.

Tabela 82

ISIS No.	Dosagem (mg/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)	Bilirrubina (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Peso corporal (% de linha de base)	Agrupamento $_{GalNAc}$3	CM
Salina	n/a	19	39	0.17	26	118	n/a	n/a
655861	0,1	25	47	0,17	27	114	$GalNAc_3$-1a	A_d
	0,3	29	56	0,15	27	118		
	1	20	32	0,14	24	112		
	3	27	54	0,14	24	115		
661161	0,1	35	83	0,13	24	113	$GalNAc_3$-3a	A_d
	0,3	42	61	0,15	23	117		
	1	34	60	0,18	22	116		
	3	29	52	0,13	25	117		
666881	0,1	30	51	0,15	23	118	$GalNAc_3$-10a	A_d
	0,3	49	82	0,16	25	119		
	1	23	45	0,14	24	117		
	3	20	38	0,15	21	112		

666981	0,1	21	41	0,14	22	113	$GalNAc_3$-7a	A_d
	0,3	29	49	0,16	24	112		
	1	19	34	0,15	22	111		
	3	77	78	0,18	25	115		
670061	0,1	20	63	0,18	24	111	$GalNAc_3$-13a	A_d
	0,3	20	57	0,15	21	115		
	1	20	35	0,14	20	115		
	3	27	42	0,12	20	116		
677842	0,1	20	38	0,17	24	114	$GalNAc_3$-20a	A_d
	0,3	31	46	0,17	21	117		
	1	22	34	0,15	21	119		
	3	41	57	0,14	23	118		

Exemplo 86 Inibição antissenso *in vivo* por oligonucleotídeos que se direcionam à TTR compreendendo um agrupamento $_{GalNAc}$3

[001123] Os oligonucleotídeos listados na Tabela 83 abaixo foram testados em um estudo dependente de dose para a inibição antissenso da transtirretina humana (TTR) em camundongos transgênicos que expressam o gene da TTR humano.

Tratamento

[001124] Camundongos transgênicos para TTR de oito semanas de idade foram, cada um, injetados por via subcutânea uma vez por semana por três semanas, para um total de três doses, com um oligonucleotídeo e dosagem listados nas tabelas abaixo ou com PBS. Cada grupo de tratamento consistiu em 4 animais. Os camundongos foram sacrificados 72 horas após a administração final. Os sangramentos da cauda foram realizados em vários momentos por todo o experimento, e os níveis plasmáticos de proteína TTR, ALT e AST foram medidos e relatados nas Tabelas 85-87. Após os animais serem sacrificados, os níveis plasmáticos de ALT, AST e TTR humana foram medidos, assim como os pesos corporais, pesos dos órgãos, e níveis hepáticos de mRNA de TTR humana. Os níveis da proteína TTR foram medidos usando um analisador clínico (AU480, Beckman Coulter, CA). PCR em tempo real e reagente de quantificação de RNA RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) Foram usados de acordo com protocolos padrão para determinar os níveis hepáticos de mRNA de TTR humana. Os resultados apresentados nas Tabelas 84-87 são os valores médios para cada grupo de tratamento. Os níveis de mRNA são os va-

lores médios relativos à média para o grupo com PBS. Os níveis plasmáticos da proteína são os valores médios relativos ao valor médio para o grupo com PBS na base de referência. Os pesos corporais são a mudança de peso percentual média da base de referência até o sacrifício para cada grupo de tratamento individual. Os pesos dos órgãos mostrados são normalizados para o peso do corpo do animal, e o peso do órgão normalizado médio para cada grupo de tratamento é então apresentado em relação ao peso do órgão normalizado médio para o grupo com PBS.

[001125] Nas Tabelas 84-87, "BL" indica base de referência, as medições que foram tomadas imediatamente antes da primeira dose. Conforme ilustrado nas Tabelas 84 e 85, o tratamento com oligonucleotídeos antissenso diminuiu o nível de expressão de TTR de uma forma dependente da dose. Os oligonucleotídeos compreendendo um conjugado de GalNAc foram mais potentes que o de origem em que faltava o conjugado de GalNAc (ISIS 420915). Além disso, os oligonucleotídeos que compreendem um conjugado de GalNAc e ligações internucleosídicas PS/PO mistas foram ainda mais potentes que o oligonucleotídeo que compreende um conjugado de GalNAc e ligações PS totais.

Tabela 83

Oligonucleotídeos direcionados à TTR humana

ISIS No.	Sequência 5' para 3'	Ligações	Agrupamento GalNAc3	CM	SEQ ID No.
420915	$T_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}G_{es}G_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}A_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{e}$	PS	n/a	n/a	265
660261	$T_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}G_{es}G_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}A_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{eo}$**A$_{do'}$-GalNAc$_3-1_a$**	PS	GalNAc$_3$-1a	A_d	266
682883	**GalNAc$_3$-3$_{a-o'}$**$T_{es}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}G_{eo}G_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}A_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{e}$	PS/PO	GalNAc$_3$-3a	PO	265
682884	**GalNAc$_3$-7$_{a-o'}$**$T_{es}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}G_{eo}G_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}A_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{e}$	PS/PO	GalNAc$_3$-7a	PO	265
682885	**GalNAc$_3$-10$_{a-o'}$**$T_{es}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}G_{eo}G_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}A_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{e}$	PS/PO	GalNAc$_3$-10a	PO	265
682886	**GalNAc$_3$-13$_{a-o'}$**$T_{es}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}G_{eo}G_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}A_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{e}$	PS/PO	GalNAc$_3$-13a	PO	265
684057	$T_{es}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}G_{eo}G_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}A_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{eo}$**A$_{do'}$-GalNAc$_3-19_a$**	PS/PO	GalNAc$_3$-19a	A_d	266

[001126] A legenda para a Tabela 85 pode ser encontrada no Exemplo 74. A estrutura de GalNAc$_3$-1 foi mostrada no Exemplo 9. A estrutura de GalNAc$_3$-3$_a$ foi mostrada no Exemplo 39. A estrutura de GalNAc$_3$-7$_a$ foi

mostrada no Exemplo 48. A estrutura de $GalNAc_3$-10_a foi mostrada no Exemplo 46. A estrutura de $GalNAc_3$-13_a foi mostrada no Exemplo 62. A estrutura de $GalNAc_3$-19_a foi mostrada no Exemplo 70.

Tabela 84

Inibição antissenso de TTR humana *in vivo*

ISIS No.	Dosagem (mg/kg)	mRNA de TTR (% de PBS)	Proteína de TTR do plasma (% de PBS)	Agrupamento GalNAc	CM	SEQ ID No.
PBS	n/a	100	100	n/a	n/a	
420915	6	99	95	n/a	n/a	265
	20	48	65			
	60	18	28			
660261	0,6	113	87	$GalNAc_3$-1a	A_d	266
	2	40	56			
	6	20	27			
	20	9	11			

Tabela 85

Inibição antissenso de TTR humana *in vivo*

ISIS No.	Dosagem (mg/kg)	mRNA de TTR (% de PBS)	Proteína de TTR do plasma (% de PBS em BL)				Agrupamento GalNAc	CM	SEQ ID No.
			BL	Dia 3	Dia 10	Dia 17 (após o sac)			
PBS	n/a	100	100	96	90	114	n/a	n/a	
420915	6	74	106	86	76	83	n/a	n/a	265
	20	43	102	66	61	58			
	60	24	92	43	29	32			
682883	0,6	60	88	73	63	68	$GalNAc_3$-3a	PO	265
	2	18	75	38	23	23			
	6	10	80	35	11	9			
682884	0,6	56	88	78	63	67	$GalNAc_3$-7a	PO	265
	2	19	76	44	25	23			
	6	15	82	35	21	24			
682885	0,6	60	92	77	68	76	$GalNAc_3$-10a	PO	265
	2	22	93	58	32	32			
	6	17	85	37	25	20			
682886	0,6	57	91	70	64	69	$GalNAc_3$-13a	PO	265
	2	21	89	50	31	30			
	6	18	102	41	24	27			
684057	0,6	53	80	69	56	62	$GalNAc_3$-19a	A_d	266
	2	21	92	55	34	30			
	6	11	82	50	18	13			

Tabela 86

Níveis de transaminases, alterações do peso corporal e peso dos órgãos relativos

ISIS No.	Dosagem (mg/kg)	ALT (U/L)			
		BL	Dia 3	Dia 10	Dia 17
PBS	n/a	33	34	33	24
420915	6	34	33	27	21
	20	34	30	28	19
	60	34	35	31	24
660261	0,6	33	38	28	26
	2	29	32	31	34
	6	29	29	28	34
	20	33	32	28	33

Continuação

AST (U/L)				Corpo (% de BL)	Fígado (% de PBS)	Baço (% de PBS)	Rim (% de PBS)	SEQ ID No.
BL	Dia 3	Dia 10	Dia 17					
58	62	67	52	105	100	100	100	n/a
64	59	73	47	115	99	89	91	265
64	54	56	42	111	97	83	89	
61	58	71	58	113	102	98	95	
70	71	63	59	111	96	99	92	266
61	60	68	61	118	100	92	90	

58	59	70	90	114	99	97	95	
64	54	68	95	114	101	106	92	

Tabela 87

Níveis de transaminases, alterações do peso corporal e peso dos órgãos relativos

ISIS No.	Dosagem (mg/kg)	ALT (U/L)			
		BL	Dia 3	Dia 10	Dia 17
PBS	n/a	32	34	37	41
420915	6	32	30	34	34
	20	41	34	37	33
	60	36	30	32	34
682883	0,6	32	35	38	40
	2	38	39	42	43
	6	35	35	41	38
682884	0,6	33	32	35	34
	2	31	32	38	38
	6	38	32	36	34
682885	0,6	39	26	37	35
	2	30	26	38	40
	6	27	27	34	35
682886	0,6	30	40	34	36
	2	27	26	34	36
	6	40	28	34	37
684057	0,6	35	26	33	39
	2	33	32	31	40
	6	39	33	35	40

Continuação

AST (U/L)				Corpo	Fígado	Baço	Rim	SEQ
BL	Dia 3	Dia 10	Dia 17	(% de BL)	(% de PBS)	(% de PBS)	(% de PBS)	ID No.
62	78	76	77	104	100	100	100	n/a
61	71	72	66	102	103	102	105	265
80	76	63	54	106	107	135	101	
58	81	57	60	106	105	104	99	
53	81	74	76	104	101	112	95	265
71	84	70	77	107	98	116	99	
62	79	103	65	105	103	143	97	
70	74	75	67	101	100	130	99	265
63	77	66	55	104	103	122	100	
65	85	80	62	99	105	129	95	
63	63	77	59	100	109	109	112	265
54	56	71	72	102	98	111	102	
46	52	56	64	102	98	113	96	
58	87	54	61	104	99	120	101	265
51	55	55	69	103	91	105	92	
107	54	61	69	109	100	102	99	
56	51	51	69	104	99	110	102	266
54	57	56	87	103	100	112	97	
67	52	55	92	98	104	121	108	

Exemplo 87: Duração da ação *in vivo* por doses únicas de oligonucleotídeos direcionados à TTR compreendendo um agrupamento de GalNAc3

[001127] Os números ISIS 420915 e 660261 (vide Tabela 83) foram testados em um estudo de dose única para a duração da ação em camundongos. Os números ISIS 420915, 682883 e 682885 (ver a Tabela 83) também foram testados em um estudo de dose única para duração

da ação em camundongos.

Tratamento

[001128] Camundongos transgênicos machos de oito semanas de idade que expressam TTR humana foram, cada um, injetados por via subcutânea uma vez com 100 mg/kg de Nº. ISIS 420915 ou 13,5 mg/kg de Nº. ISIS 660261. Cada grupo de tratamento consistiu em 4 animais. Os sangramentos da cauda foram realizados antes da dosagem para determinar a base de referência e nos dias 3, 7, 10, 17, 24 e 39 após a dose. Os níveis plasmáticos da proteína TTR foram medidos conforme descrito no Exemplo 86. Os resultados abaixo são apresentados como a porcentagem média dos níveis plasmáticos da proteína TTR para cada grupo de tratamento, normalizados para os níveis de base de referência.

Tabela 88

Níveis plasmáticos da proteína TTR

ISIS No.	Dosagem (mg/kg)	Ponto do tempo (dias pós-dose)	TTR (% de linha de base)	Agrupamento $_{GalNAc}3$	CM	SEQ ID No.
420915	100	3	30	n/a	n/a	265
		7	23			
		10	35			
		17	53			
		24	75			
		39	100			
660261	13,5	3	27	$GalNAc_3$-1a	A_d	266
		7	21			
		10	22			
		17	36			
		24	48			
		39	69			

Tratamento

[001129] Camundongos transgênicos fêmeas que expressam a TTR humana foram, cada um, injetados por via subcutânea uma vez com 100 mg/kg de Nº. ISIS 420915, 10,0 mg/kg de Nº. ISIS 682883, ou 10,0 mg/kg de 682885. Cada grupo de tratamento consistiu em 4 animais. Os sangramentos da cauda foram realizados antes da dosagem para determinar a base de referência e nos dias 3, 7, 10, 17, 24 e 39 após a dose. Os níveis plasmáticos da proteína TTR foram medidos conforme descrito no Exemplo 86. Os resultados abaixo são apresentados como a porcentagem média dos níveis plasmáticos da proteína TTR para cada

grupo de tratamento, normalizados para os níveis de base de referência.

Tabela 89

Níveis plasmáticos da proteína TTR

ISIS No.	Dosagem (mg/kg)	Ponto do tempo (dias pós-dose)	TTR (% de linha de base)	Agrupamento $_{GalNAc}3$	CM	SEQ ID No.
420915	100	3	48	n/a	n/a	265
		7	48			
		10	48			
		17	66			
		31	80			
682883	10,0	3	45	$GalNAc_3$-3a	PO	265
		7	37			
		10	38			
		17	42			
		31	65			
682885	10,0	3	40	$GalNAc_3$-10a	PO	265
		7	33			
		10	34			
		17	40			
		31	64			

[001130] Os resultados na Tabela 88 e 89 mostram que os oligonucleotídeos que compreendem um conjugado de GalNAc são mais potentes com uma duração de ação maior que o oligonucleotídeo de origem e que falta um conjugado (ISIS 420915).

Exemplo 88: Modulação de Junção *in vivo* por oligonucleotídeos que direcionam à SMN compreendendo um conjugado $_{GalNAc}3$

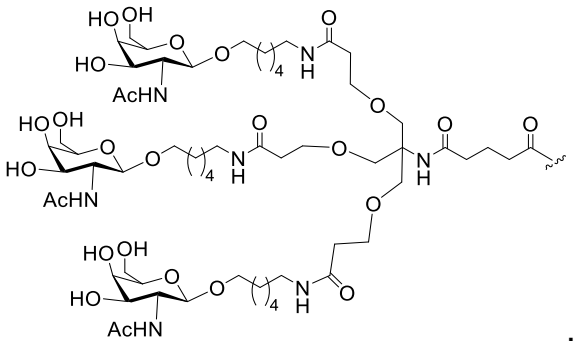
[001131] Os oligonucleotídeos listados na Tabela 90 foram testados para a modulação por junção da Sobrevivência do Neurônio Motor (SMN) em camundongos.

Tabela 90

ASOs modificados direcionados a SMN

ISIS No.	Sequências (5' a 3')	$GalNAc_3$ Cluster	CM	SEQ ID No.
387954	$A_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{es}T_{es}A_{es}A_{es}T_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}G_{es}G_{e}$	n/a	n/a	267
699819	**$GalNAc_3$-7_{a}-o**-$A_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{es}T_{es}A_{es}A_{es}$ $T_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}G_{es}G_{e}$	$GalNAc_3$-7a	PO	267
699821	**$GalNAc_3$-7_{a}-o**-$A_{es}T_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{eo}A_{eo}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{eo}A_{eo}T_{eo}A_{eo}$ $A_{eo}T_{eo}G_{eo}{}^{m}C_{eo}T_{es}G_{es}G_{e}$	$GalNAc_3$-7a	PO	267
700000	$A_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{es}T_{es}A_{es}A_{es}T_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}G_{es}$ G_{eo}**A_{do}-$GalNAc_3$-1_{a}**	$GalNAc_3$-1a	A_d	268
703421	X-ATT^{m}CA^{m}CTTT^{m}CATAATG^{m}CTGG	n/a	n/a	267
703422	**$GalNAc_3$-7_{b}**-X-ATT^{m}CA^{m}CTTT^{m}CATAATG^{m}CTGG	$GalNAc_3$-7b	n/a	267

[001132] A estrutura de $GalNAc_3$-7_a foi mostrada anteriormente no Exemplo 48. "X" indica uma amina primária 5' gerada por Gene Tools (Philomath, OR), e $GalNAc_3$-7_b indica a estrutura de $GalNAc_3$-7_a sem a parte -NH-C_6-O do ligador como mostrado abaixo:



[001133] Os números ISIS 703421 e 703422 são oligonucleotídeos de morfolino, em que cada nucleotídeo dos dois oligonucleotídeos é um nucleotídeo de morfolino.

Tratamento

[001134] Camundongos transgênicos de seis semanas de idade que expressam SMN humana foram injetados por via subcutânea uma vez com um oligonucleotídeo listado na Tabela 91 ou com salina. Cada grupo de tratamento consistiu em 2 machos e 2 fêmeas. Os camundongos foram sacrificados 3 dias após a dose para determinar os níveis hepáticos de mRNA de SMN humana com e sem o éxon 7 usando PCR em tempo real, de acordo com protocolos padrão. O RNA total foi medido usando o reagente Ribogreen. Os níveis de mRNA da SMN foram normalizados para mRNA total, e normalizados ainda para as médias para o grupo tratado com salina. As razões médias resultantes entre mRNA de SMN incluindo o éxon 7 e mRNA de SMN faltando o éxon 7 são mostradas na Tabela 91. Os resultados mostram que os oligonucleotídeos totalmente modificados que modulam a junção e compreendem um conjugado de GalNAc são significativamente mais potentes em alterar a junção no fígado do que os oligonucleotídeos de origem em que falta o conjugado de GalNAc. Ademais, essa tendência é mantida para várias químicas de modificação, incluindo 2'-MOE e oligonucleotídeos modificados por morfolino.

Tabela 91

Efeito de oligonucleotídeos direcionados à SMN humana

in vivo

ISIS No.	Dose (mg/kg)	+Exon 7 / -Exon 7	Agrupamento $_{GalNAc}$3	CM	SEQ ID No.
Salina	n/a	1,00	n/a	n/a	n/a
387954	32	1,65	n/a	n/a	267
387954	288	5,00	n/a	n/a	267
699819	32	7,84	$GalNAc_3$-7a	PO	267
699821	32	7,22	$GalNAc_3$-7a	PO	267
700000	32	6,91	$GalNAc_3$-1a	A_d	268
703421	32	1,27	n/a	n/a	267
703422	32	4,12	$GalNAc_3$-7b	n/a	267

Exemplo 89: Inibição antissenso *in vivo* por oligonucleotídeos direcionados à Apolipoproteína A (Apo(A)) compreendendo um conjugado de GalNAc3

[001135] Os oligonucleotídeos listados na Tabela 92 abaixo foram testados em um estudo para a inibição dependente de dose de Apo(a) em camundongos transgênicos.

Tabela 92

ASOs modificados direcionados à Apo(a)

ISIS No.	Sequências (5' a 3')	Agrupamento $_{GalNAc}$3	CM	SEQ ID No.
494372	$T_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{ds}G_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}G_{ds}T_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}$ $T_{es}G_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{e}$	n/a	n/a	277
681257	**$GalNAc_3$-7$_{um-o}$**$T_{es}G_{eo}{}^{m}C_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{eo}{}^{m}C_{ds}G_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}G_{ds}$ $T_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{eo}G_{eo}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{e}$	$GalNAc_3$-7a	PO	277

[001136] A estrutura $GalNAc_3$-7_a foi mostrada no Exemplo 48.

Tratamento

[001137] Camundongos C57BL/6 fêmeas de oito semanas de idade (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) foram, cada um, injetados por via subcutânea uma vez por semana numa dosagem mostrada abaixo, para um total de seis doses, com um oligonucleotídeo listado na Tabela 92 ou com PBS. Cada grupo de tratamento consistiu em 3-4 animais. Os sangramentos da cauda foram realizados no dia anterior à primeira dose e semanalmente após cada dose para determinar os níveis plasmáticos da proteína Apo(a). Os camundongos foram sacrificados dois dias após a administração final. Os níveis de mRNA hepáticos de Apo(a) foram determinados usando PCR em tempo real e reagente de quantificação de RNA RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) de acordo com protocolos padrão. Os níveis plasmáticos da proteína Apo(a) foram

determinados usando ELISA, e os níveis hepáticos da transaminase foram determinados. Os resultados da proteína plasmática e do mRNA na Tabela 93 são apresentados como a porcentagem média do grupo de tratamento em relação ao grupo tratado com PBS. Os níveis da proteína plasmática foram ainda normalizados para o valor de base de referência (BL) para o grupo com PBS. Os níveis de transaminase absolutos médios e os pesos corporais (% em relação às médias de base de referência) são relatados na Tabela 94.

[001138] Como ilustrado na Tabela 93, o tratamento com os oligonucleotídeos diminuiu os níveis da proteína plasmática e do mRNA hepático da Apo(a) de uma forma dependente de dose. Além disso, o oligonucleotídeo que compreende o conjugado de GalNAc foi significativamente mais potente com uma duração maior de ação do que o oligonucleotídeo de origem em que falta o conjugado de GalNAc. Como ilustrado na Tabela 94, os níveis de transaminase e os pesos corporais não foram afetados pelo oligonucleotídeos, indicando que os oligonucleotídeos foram bem tolerados.

Tabela 93

Níveis de proteína plasmática e de mRNA hepático de Apo(a)

ISIS No.	Dosagem (mg/kg)	mRNA da apo(a) (% de PBS)	Proteína do plasma da apo(a) (% de PBS)						
			BL	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6
PBS	n/a	100	100	120	119	113	88	121	97
494372	3	80	84	89	91	98	87	87	79
	10	30	87	72	76	71	57	59	46
	30	5	92	54	28	10	7	9	7
681257	0,3	75	79	76	89	98	71	94	78
	1	19	79	88	66	60	54	32	24
	3	2	82	52	17	7	4	6	5
	10	2	79	17	6	3	2	4	5

Tabela 94

ISIS No.	Dosagem (mg/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)	Peso corporal (% de linha de base)
PBS	n/a	37	54	103
494372	3	28	68	106
	10	22	55	102
	30	19	48	103
681257	0,3	30	80	104
	1	26	47	105
	3	29	62	102

	10	21	52	107

Exemplo 90: Inibição antissenso *in vivo* por oligonucleotídeos que se direcionam à TTR compreendendo um agrupamento $_{GalNAc}$3

[001139] Os oligonucleotídeos listados na Tabela 95 abaixo foram testados em um estudo dependente de dose para a inibição antissenso da transtirretina humana (TTR) em camundongos transgênicos que expressam o gene da TTR humano.

Tratamento

[001140] Camundongos transgênicos para TTR foram, cada um, injetados por via subcutânea uma vez por semana por três semanas, para um total de três doses, com um oligonucleotídeo e dosagem listados na Tabela 96 ou com PBS. Cada grupo de tratamento consistiu em 4 animais. Antes da primeira dose, um sangramento da cauda foi realizado para determinar os níveis plasmáticos da proteína TTR na base de referência (BL). Os camundongos foram sacrificados 72 horas após a administração final. Os níveis da proteína TTR foram medidos usando um analisador clínico (AU480, Beckman Coulter, CA). PCR em tempo real e reagente de quantificação de RNA RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) Foram usados de acordo com protocolos padrão para determinar os níveis hepáticos de mRNA de TTR humana. Os resultados apresentados na Tabela 96 são os valores médios para cada grupo de tratamento. Os níveis de mRNA são os valores médios relativos à média para o grupo com PBS. Os níveis plasmáticos da proteína são os valores médios relativos ao valor médio para o grupo com PBS na base de referência. "BL" indica base de referência, as medições que foram tomadas imediatamente antes da primeira dose. Conforme ilustrado na Tabela 96, o tratamento com oligonucleotídeos antissenso diminuiu os níveis de mRNA de FXI de uma forma dependente da dose.de expressão de TTR de uma forma dependente da dose. Os oligonucleotídeos que compreendem um conjugado de GalNAc foram mais potentes do

que o de origem em que falta um conjugado de GalNAc (ISIS 420915), e os oligonucleotídeos que compreendem uma porção clivável de fosfodiéster ou desoxiadenosina mostraram melhoras significativas na potência em comparação ao de origem em que falta um conjugado (ver os números ISIS 682883 e 666943 vs 420915 e ver os Exemplo 86 e 87).

Tabela 95

Oligonucleotídeos direcionados à TTR humana

ISIS No.	Sequência 5' para 3'	Ligações	Agrupamento GalNAc	CM	SEQ ID No.
420915	$T_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}G_{es}G_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}A_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{e}$	PS	n/a	n/a	265
682883	**GalNAc$_3$-3$_{a\text{-}o}$**,$T_{es}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}G_{eo}G_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}A_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{e}$	PS/PO	GalNAc$_3$-3a	PO	265
666943	**GalNAc$_3$-3$_{a\text{-}o}$,A$_{do}$**$T_{es}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}G_{eo}G_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}A_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{e}$	PS/PO	GalNAc$_3$-3a	A$_d$	269
682887	**GalNAc$_3$-7$_{a\text{-}o}$,A$_{do}$**$T_{es}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}G_{eo}G_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}A_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{e}$	PS/PO	GalNAc$_3$-7a	A$_d$	269
682888	**GalNAc$_3$-10$_{a\text{-}o}$,A$_{do}$**$T_{es}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}G_{eo}G_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}A_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{e}$	PS/PO	GalNAc$_3$-10a	A$_d$	269
682889	**GalNAc$_3$-13$_{a\text{-}o}$,A$_{do}$**$T_{es}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}G_{eo}G_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}A_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{e}$	PS/PO	GalNAc$_3$-13a	A$_d$	269

[001141] A legenda para a Tabela 95 pode ser encontrada no Exemplo 74. A estrutura de GalNAc$_3$-3$_a$ foi mostrada no Exemplo 39. A estrutura de GalNAc$_3$-7$_a$ foi mostrada no Exemplo 48. A estrutura de GalNAc$_3$-10$_a$ foi mostrada no Exemplo 46. A estrutura de GalNAc$_3$-13$_a$ foi mostrada no Exemplo 62.

Tabela 96

Inibição antissenso de TTR humana *in vivo*

ISIS No.	Dosagem (mg/kg)	mRNA de TTR (% de PBS)	Proteína de TTR (% de BL)	Agrupamento GalNAc	CM
PBS	n/a	100	124	n/a	n/a
420915	6	69	114	n/a	n/a
	20	71	86		
	60	21	36		
682883	0,6	61	73	GalNAc$_3$-3a	PO
	2	23	36		
	6	18	23		
666943	0,6	74	93	GalNAc$_3$-3a	A$_d$
	2	33	57		
	6	17	22		
682887	0,6	60	97	GalNAc$_3$-7a	A$_d$
	2	36	49		
	6	12	19		
682888	0,6	65	92	GalNAc$_3$-10a	A$_d$
	2	32	46		
	6	17	22		
682889	0,6	72	74	GalNAc$_3$-13a	A$_d$
	2	38	45		
	6	16	18		

Exemplo 91: Inibição antissenso *in vivo* por oligonucleotídeos direcionados ao Fator VII compreendendo um conjugado de $GalNAc_3$ em primatas não humanos

[001142] Os oligonucleotídeos listados na Tabela 97 abaixo foram testados em um estudo de aumento de dose não terminal para a inibição antissenso do Fator VII em macacos.

Tratamento

[001143] Macacos expostos (não virgens) foram, cada um, injetados por via subcutânea nos dias 0, 15 e 29 com doses crescentes de um oligonucleotídeo listado na Tabela 97 ou com PBS. Cada grupo de tratamento consistiu em 4 machos e 1 fêmea. Antes da primeira dose e em vários momentos após isso, as retiradas de sangue foram realizadas para determinar os níveis plasmáticos da proteína Fator VII. Os níveis da proteína Fator VII foram medidos por ELISA. Os resultados apresentados na Tabela 98 são os valores médios para cada grupo de tratamento em relação ao valor médio para o grupo com PBS na base de referência (BL), as medidas tomadas imediatamente antes da primeira dose. Como ilustrado na Tabela 98, o tratamento com oligonucleotídeos antissenso diminuiu os níveis de expressão do Fator VII de uma forma dependente de dose, e o oligonucleotídeo compreendnedo o conjugado de GalNAc foi significativamente mais potente em macacos em comparação ao oligonucleotídeo em que falta um conjugado de GalNAc.

Tabela 97

Oligonucleotídeos direcionados ao Factor VII

ISIS No.	Sequência 5' a 3'	Ligações	Agrupamento GalNAc	CM	SEQ ID No.
407935	$A_{es}T_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}A_{es}T_{ds}G_{ds}G_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}G_{es}A_{e}$	PS	n/a	n/a	270
686892	**$GalNAc_3$-$10_{a\text{-}o}$**$A_{es}T_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}A_{es}T_{ds}G_{ds}G_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}G_{es}A_{e}$	PS	$GalNAc_3$-10a	PO	270

[001144] A legenda para a Tabela 97 pode ser encontrada no Exemplo 74. A estrutura de $GalNAc_3$-10_a foi mostrada no Exemplo 46.

Tabela 98

Níveis plasmáticos da proteína Fator VII

ISIS No.	Dia	Dose (mg/kg)	Fator VII (% de BL)

407935	0	n/a	100
	15	10	87
	22	n/a	92
	29	30	77
	36	n/a	46
	43	n/a	43
686892	0	3	100
	15	10	56
	22	n/a	29
	29	30	19
	36	n/a	15
	43	n/a	11

Exemplo 92: Inibição antissenso em hepatócitos primários por oligonucleotídeos antissenso direcionados à Apo-CIII compreendendo um conjugado de GalNAc$_3$

[001145] Os hepatócitos primários de camundongo foram semeados em placas de 96 poços em 15.000 células por poço, e os oligonucleotídeos listados na Tabela 99, direcionados à ApoC-III, foram adicionados em 0,46, 1,37, 4,12, ou 12,35, 37,04, 111,11, ou 333,33 nM ou 1,00 µM. Após a incubação com os oligonucleotídeos por 24 horas, as células foram lisadas e o RNA total foi purificado usando RNeasy (Qiagen). Os níveis de mRNA da apoC-III foram determinados usando PCR em tempo real e um reagente de quantificação de RNA RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc.). de acordo com protocolos padrão. Valores de IC_{50} foram determinados usando o software Prism 4 (GraphPad). Os resultados mostram que independentemente de se a porção clivável era um fosfodiéster ou uma adenosina ligada a fosfodiéster, os oligonucleotídeos que compreendem um conjugado de GalNAc foram significativamente mais potentes do que o oligonucleotídeo de origem em que falta um conjugado.

Tabela 99

Inibição da expressão de APOC-III de camundongo em hepatócitos primários de camundongo

ISIS No.	Sequência (5' a 3')	CM	IC_{50} (nM)	SEQ ID No.
440670	$^{m}C_{es}A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{ds}T_{ds}A_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}G_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{es}A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}A_{e}$	n/a	13,20	271
661180	$^{m}C_{es}A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{ds}T_{ds}A_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}G_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{es}$ $A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}A_{eo}$ **$A_{do'}$-GalNAc$_3$-1$_a$**	A_d	1,40	272
680771	**GalNAc$_3$-3$_{a-o'}$**$^{m}C_{es}A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{ds}T_{ds}A_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}G_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{ds}$ $^{m}C_{es}A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}A_{e}$	PO	0,70	271
680772	**GalNAc$_3$-7$_{a-o'}$**$^{m}C_{es}A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{ds}T_{ds}A_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}G_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{ds}$	PO	1,70	271

	$^{m}C_{es}A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}A_{e}$			
680773	**GalNAc$_3$-10$_{a\text{-}o}$**,$^{m}C_{es}A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{ds}T_{ds}A_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}G_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{es}A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}A_{e}$	PO	2,00	271
680774	**GalNAc$_3$-13$_{a\text{-}o}$**,$^{m}C_{es}A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{ds}T_{ds}A_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}G_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{es}A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}A_{e}$	PO	1,50	271
681272	**GalNAc$_3$-3$_{a\text{-}o}$**,$^{m}C_{es}A_{eo}G_{eo}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{ds}T_{ds}A_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}G_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{eo}A_{eo}G_{es}{}^{m}C_{es}A_{e}$	PO	< 0,46	271
681273	**GalNAc$_3$-3$_{a\text{-}o}$,A$_{do}$**$^{m}C_{es}A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{ds}T_{ds}A_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}G_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{es}A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}A_{e}$	A_d	1,10	273
683733	$^{m}C_{es}A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{ds}T_{ds}A_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}G_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{es}A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}A_{eo}$**A$_{do}$-GalNAc$_3-19_a$**	A_d	2,50	272

[001146] A estrutura GalNAc$_3$-1$_a$ foi mostrada anteriormente no Exemplo 9, GalNAc$_3$-3$_a$ foi mostrada no Exemplo 39, GalNAc$_3$-7$_a$ foi mostrada no Exemplo 48, GalNAc$_3$-10$_a$ foi mostrada no Exemplo 46, GalNAc$_3$-13$_a$ foi mostrada no Exemplo 62, GalNAc$_3$-19$_a$ foi mostrada no Exemplo 70.

Exemplo 93: Inibição antissenso *in vivo* por oligonucleotídeos que direcionam SRB-1 compreendendo asas misturadas e um conjugado 5'-GalNAc3

[001147] Os oligonucleotídeos listados na Tabela 100 foram testados em um estudo dependente de dose para a inibição antissenso de SRB-1 em camundongos.

Tabela 100

ASOs modificados direcionados a SRB

ISIS No.	Sequências (5' a 3')	Agrupamento $_{GalNAc}$3	CM	SEQ ID No.
449093	$T_{ks}T_{ks}{}^{m}C_{ks}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}\ A_{ds}T_{ds}\ G_{ds}\ A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ks}{}^{m}C_{ks}{}^{m}C_{k}$	n/a	n/a	274
699806	**GalNAc$_3$-3$_{a\text{-}o}$**,$T_{ks}T_{ks}{}^{m}C_{ks}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}\ A_{ds}T_{ds}\ G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ks}{}^{m}C_{ks}{}^{m}C_{k}$	GalNAc$_3$-3a	PO	274
699807	**GalNAc$_3$-7$_{a\text{-}o}$**,$T_{ks}T_{ks}{}^{m}C_{ks}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}\ A_{ds}T_{ds}\ G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ks}{}^{m}C_{ks}{}^{m}C_{k}$	GalNAc$_3$-7a	PO	274
699809	**GalNAc$_3$-7$_{a\text{-}o}$**, $T_{ks}T_{ks}{}^{m}C_{ks}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}\ A_{ds}T_{ds}\ G_{ds}\ A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{e}$	GalNAc$_3$-7a	PO	274
699811	**GalNAc$_3$-7$_{a\text{-}o}$**,$T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}\ A_{ds}T_{ds}\ G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ks}{}^{m}C_{ks}{}^{m}C_{k}$	GalNAc$_3$-7a	PO	274
699813	**GalNAc$_3$-7$_{a\text{-}o}$**,$T_{ks}T_{ds}{}^{m}C_{ks}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}\ A_{ds}T_{ds}\ G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ks}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{k}$	GalNAc$_3$-7a	PO	274
699815	**GalNAc$_3$-7$_{a\text{-}o}$**,$T_{es}T_{ks}{}^{m}C_{ks}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}\ A_{ds}T_{ds}\ G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ks}{}^{m}C_{ks}{}^{m}C_{e}$	GalNAc$_3$-7a	PO	274

[001148] A estrutura de GalNAc$_3$-3$_a$ foi mostrada anteriormente no Exemplo 39, e a estrutura de GalNAc$_3$-7a foi mostrada anteriormente no Exemplo 48. Subscritos: "e" indica o nucleosídeo modificado por 2'-MOE; "d" indica β-D-2'-desoxirribonucleosídeo; "k" indica nucleosídeo bicíclico 6'-*(S)*-CH$_3$ (cEt); "s" indica ligações internucleosídicas de fosforotioato (PS); "o" indica ligações internucleosídicas de fosfodiéster (PO). O sobrescrito "m" indica 5-metilcitosinas.

Tratamento

[001149] Camundongos C57BL/6 de seis a oito semanas de idade (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) foram injetados por via subcutânea uma vez na dosagem mostrada abaixo com um oligonucleotídeo listado na Tabela 100 ou com salina. Cada grupo de tratamento consistiu em 4 animais. Os camundongos foram sacrificados 72 horas após a administração final. Os níveis hepáticos de mRNA de SRB-1 foram medidos usando PCR em tempo real. Os níveis de mRNA de SRB-1 foram normalizados para os níveis de mRNA de ciclofilina, de acordo com protocolos padrão. Os resultados são apresentados como a porcentagem média dos níveis de mRNA de SRB-1 para cada grupo de tratamento em relação ao grupo controle com salina. Como ilustrado na Tabela 101, o tratamento com oligonucleotídeos antissenso diminuiu os níveis de mRNA de SRB-1 de uma forma dependente de dose, e os oligonucleotídeos do gapmer que compreendem um conjugado de GalNAc e têm asas que eram modificações de cEt total ou de açúcar misto foram significativamente mais potentes do que o oligonucleotídeo de origem em que falta um conjugado e que compreende asas modificadas por cEt total.

[001150] Os pesos corporais, transaminases hepáticas, bilirrubina total, e BUN também foram medidos, e os valores médios para cada grupo de tratamento são mostrados na Tabela 101. O peso corporal é mostrado como o peso corporal percentual médio relativo ao peso do corpo de base de referência (% BL) medido imediatamente antes da dose de oligonucleotídeo.

Tabela 101

Níveis de mRNA de SRB-1, ALT, AST, BUN e bilirrubina total e pesos corporais

ISIS No.	Dosagem (mg/kg)	mRNA de SRB-1 (% de PBS)	ALT (U/L)	AST (U/L)	Bil	BUN	Peso corporal (% de BL)
PBS	n/a	100	31	84	0,15	28	102
449093	1	111	18	48	0,17	31	104
	3	94	20	43	0,15	26	103

	10	36	19	50	0,12	29	104
699806	0,1	114	23	58	0,13	26	107
	0,3	59	21	45	0,12	27	108
	1	25	30	61	0,12	30	104
699807	0,1	121	19	41	0,14	25	100
	0,3	73	23	56	0,13	26	105
	1	24	22	69	0,14	25	102
699809	0,1	125	23	57	0,14	26	104
	0,3	70	20	49	0,10	25	105
	1	33	34	62	0,17	25	107
699811	0,1	123	48	77	0,14	24	106
	0,3	94	20	45	0,13	25	101
	1	66	57	104	0,14	24	107
699813	0,1	95	20	58	0,13	28	104
	0,3	98	22	61	0,17	28	105
	1	49	19	47	0,11	27	106
699815	0,1	93	30	79	0,17	25	105
	0,3	64	30	61	0,12	26	105
	1	24	18	41	0,14	25	106

Exemplo 94: Inibição antissenso *in vivo* por oligonucleotídeos que direcionam SRB-1 compreendendo modificações de 2'-açúcar e um conjugado 5'-GalNAc3

[001151] Os oligonucleotídeos listados na Tabela 102 foram testados em um estudo dependente de dose para a inibição antissenso de SRB-1 em camundongos.

Tabela 102

ASOs modificados direcionados a SRB-1

ISIS No.	Sequências (5' a 3')	Agrupamento $_{GalNAc}3$	CM	SEQ ID No.
353382	$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	n/a	n/a	252
700989	$G_{ms}C_{ms}U_{ms}U_{ms}C_{ms}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}U_{ms}C_{ms}C_{ms}U_{ms}U_{m}$	n/a	n/a	275
666904	**GalNAc$_3$-3$_{a-o}$**$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}$ $T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	GalNAc$_3$-3a	PO	252
700991	**GalNAc$_3$-7$_{a-o}$**$G_{ms}C_{ms}U_{ms}U_{ms}C_{ms}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}$ $A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}U_{ms}C_{ms}C_{ms}U_{ms}U_{m}$	GalNAc$_3$-7a	PO	275

[001152] O subscrito "m" indica um nucleosídeo modificado por 2'-O-metil. Ver o Exemplo 74 para a legenda completa da tabela. A estrutura de GalNAc$_3$-3$_a$ foi mostrada anteriormente no Exemplo 39, e a estrutura de GalNAc$_3$-7a foi mostrada anteriormente no Exemplo 48.

Tratamento

[001153] O estudo foi completado usando o protocolo descrito no Exemplo 93. Os resultados são mostrados na Tabela 103 abaixo e mostram que os oligonucleotídeos modificados por 2'-MOE e 2'-OMe compreendendo um conjugado de GalNAc foram significativamente mais potentes do que os respectivos oligonucleotídeos de origem em que faltam um conjugado. Os resultados das medições de pesos corporais,

transaminases hepáticas, bilirrubina total, e BUN indicam que os compostos foram todos bem tolerados.

Tabela 103

mRNA de SRB-1

ISIS No.	Dosagem (mg/kg)	mRNA de SRB-1 (% de PBS)
PBS	n/a	100
353382	5	116
	15	58
	45	27
700989	5	120
	15	92
	45	46
666904	1	98
	3	45
	10	17
700991	1	118
	3	63
	10	14

Exemplo 95: Inibição antissenso *in vivo* por oligonucleotídeos que direcionam SRB-1 compreendendo nucleosídeos bicílicos e um conjugado 5'-GalNAc3

[001154] Os oligonucleotídeos listados na Tabela 104 foram testados em um estudo dependente de dose para a inibição antissenso de SRB-1 em camundongos.

Tabela 104

ASOs modificados direcionados a SRB-1

ISIS No.	Sequências (5' a 3')	Agrupamento $_{GalNAc}3$	CM	SEQ ID No.
440762	$T_{ks}{}^{m}C_{ks}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ks}{}^{m}C_{k}$	n/a	n/a	246
666905	**$GalNAc_3$-$3_{a-o'}$**$T_{ks}{}^{m}C_{ks}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ks}{}^{m}C_{k}$	$GalNAc_3$-3_a	PO	246
699782	**$GalNAc_3$-$7_{a-o'}$**$T_{ks}{}^{m}C_{ks}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ks}{}^{m}C_{k}$	$GalNAc_3$-7_a	PO	246
699783	**$GalNAc_3$-$3_{a-o'}$**$T_{ls}{}^{m}C_{ls}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ls}{}^{m}C_{l}$	$GalNAc_3$-3_a	PO	246
653621	$T_{ls}{}^{m}C_{ls}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ls}{}^{m}C_{lo}$**$A_{do'}$-$GalNAc_3$-$1_a$**	$GalNAc_3$-1_a	A_d	247
439879	$T_{gs}{}^{m}C_{gs}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{d}\ G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{gs}{}^{m}C_{g}$	n/a	n/a	246
699789	**$GalNAc_3$-$3_{a-o'}$**$T_{gs}{}^{m}C_{gs}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{d}\ G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{gs}{}^{m}C_{g}$	$GalNAc_3$-3_a	PO	246

[001155] O subscrito "g" indica um nucleosídeo de fluoro-HNA, o subscrito "l" indica um nucleosídeo bloqueado compreendendo uma ponte de 2'-O-C_2-4' Veja a legenda da tabela do Exemplo 74 para outras abreviações. A estrutura de $GalNAc_3$-1_a foi mostrada anteriormente no Exemplo 9, e a estrutura de $GalNAc_3$-3_a foi mostrada anteriormente no Exemplo 39 e a estrutura de $GalNAc_3$-7a foi mostrada anteriormente no Exemplo 48.

Tratamento

[001156] O estudo foi completado usando o protocolo descrito no Exemplo 93. Os resultados são mostrados na Tabela 105 abaixo e mostram que os oligonucleotídeos que compreendem um conjugado de GalNAc e várias modificações de nucleosídeo bicíclico foram significativamente mais potentes do que o oligonucleotídeo de origem em que falta um conjugado e que compreende modificações de nucleosídeo bicíclico. Além disso, o oligonucleotídeo que compreende um conjugado de GalNAc e modificações de fluoro-HNA foi significativamente mais potente do que o de origem em que falta um conjugado e que compreende modificações de fluoro-HNA. Os resultados das medições de pesos corporais, transaminases hepáticas, bilirrubina total, e BUN indicam que os compostos foram todos bem tolerados.

Tabela 105

Níveis de mRNA de SRB-1, ALT, AST, BUN e bilirrubina total e pesos corporais

ISIS No.	Dosagem (mg/kg)	mRNA de SRB-1 (% de PBS)
PBS	n/a	100
440762	1	104
	3	65
	10	35
666905	0,1	105
	0,3	56
	1	18
699782	0,1	93
	0,3	63
	1	15
699783	0,1	105
	0,3	53
	1	12
653621	0,1	109
	0,3	82
	1	27
439879	1	96
	3	77
	10	37
699789	0,1	82
	0,3	69
	1	26

Exemplo 96: Ligação de proteína plasmática de oligonucleotídeos antissenso compreendendo um grupo de conjugado $_{\text{de GalNAc}}$3

[001157] Os oligonucleotídeos listados na Tabela 70 direcionados à ApoC-III e os oligonucleotídeos na Tabela 106 direcionados à Apo(a) foram testados em um ensaio de ultra-filtração a fim de avaliar a ligação da proteína plasmática.

Tabela 106

Oligonucleotídeos modificados direcionados à Apo(a)

ISIS No.	Sequências (5' a 3')	Agrupamento $_{GalNAc}3$	CM	SEQ ID No.
494372	$T_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{ds}G_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}G_{ds}T_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}G_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{e}$	n/a	n/a	277
693401	$T_{es}G_{eo}{}^{m}C_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{eo}{}^{m}C_{ds}G_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}G_{ds}T_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{eo}G_{eo}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{e}$	n/a	n/a	277
681251	**GalNAc$_3$-7$_{a-o}$**,$T_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{ds}G_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}G_{ds}T_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}$ $T_{ds}T_{es}G_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{e}$	GalNAc$_3$-7$_a$	PO	277
681257	**GalNAc$_3$-7$_{a-o}$**,$T_{es}G_{eo}{}^{m}C_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{eo}{}^{m}C_{ds}G_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}G_{ds}T_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}$ $T_{ds}T_{eo}G_{eo}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{e}$	GalNAc$_3$-7$_a$	PO	277

[001158] Veja o Exemplo 74 para a legenda da tabela. A estrutura de GalNAc$_3$-7a foi mostrada anteriormente no Exemplo 48.

[001159] Unidades de ultrafiltração Ultrafree-MC (30.000 NMWL, membrana de celulose regenerada de baixa ligação, Millipore, Bedford, MA) foram pré-condicionadas com 300 µL de 0,5% de Tween 80 e centrifugadas a 2000 g por 10 minutos, em seguida com 300µL de uma solução de 300 µg/mL de um oligonucleotídeo controle em H_2O e centrifugadas em 2000 g por 16 minutos. A fim de avaliar a ligação não específica aos filtros de cada oligonucleotídeo de teste das Tabelas 70 e 106 a serem usados nos estudos, 300 µL de uma solução de 250 ng/mL de oligonucleotídeo em H_2O em pH 7,4 foram colocados nos filtros pré-condicionados e centrifugados a 2000 g por 16 minutos. As amostras não filtradas e filtradas foram analisadas por um ensaio ELISA para determinar as concentrações do oligonucleotídeo. Três réplicas foram usadas para se obter uma concentração média para cada amostra. A concentração da amostra filtrada em relação à amostra não filtrada é usada para determinar a porcentagem de oligonucleotídeo que é recuperada através do filtro na ausência de plasma (% de recuperação).

[001160] Amostras de plasma inteiras congeladas coletadas em K3-EDTA de voluntários humanos sem fármacos normais, macacos cynomolgus e camundongos CD-1 foram compradas da Bioreclamation LLC

(Westbury, NY). Os oligonucleotídeos de teste foram adicionados a alíquotas de 1,2 mL de plasma em duas concentrações (5 e 150 µg/mL). Uma alíquota (300 µL) de cada amostra de plasma enriquecida foi colocada em uma unidade de filtro pré-condicionada e incubada a 37°C por 30 minutos, imediatamente após por centrifugação a 2000 g por 16 minutos. As alíquotas das amostras de plasma enriquecidas filtrada e não filtrada foram analisadas por ELISA para determinar a concentração de oligonucleotídeo em cada amostra. Três replicatas por concentração foram usadas para determinar a porcentagem média de oligonucleotídeo ligado e não ligado em cada amostra. A concentração média da amostra filtrada em relação à concentração da amostra não filtrada é usada é usada para determinar a porcentagem de oligonucleotídeo no plasma que não tá ligada às proteínas plasmáticas (% não ligado). Os valores de oligonucleotídeo não ligado final são corrigidos para a ligação não específica, dividindo-se o % não ligado pelo % de recuperação para cada oligonucleotídeo. Os valores de % de oligonucleotídeo ligado final são determinados, subtraindo-se os valores de % não ligado de 100. Os resultados são mostrados na Tabela 107 para as duas concentrações de oligonucleotídeo testadas (5 e 150 µg/mL) em cada espécie de plasma. Os resultados mostram que os grupos de conjugados de GalNAc não têm um impacto significativo sobre a ligação às proteínas plasmáticas. Além disso, os oligonucleotídeos com ligações internucleosídicas PS totais e ligações PO/PS mistas ligam proteínas plasmáticas, e aqueles com ligações PS totais ligam proteínas plasmáticas em um grau um pouco maior do que aqueles com ligações PO/PS mistas.

Tabela 107

Porcentagem de oligonucleotídeo modificado ligado às proteínas plasmáticas

ISIS No.	Plasma humano		Plasma do macaco		Plasma do rato	
	5 µg/mL	150 µg/mL	5 µg/mL	150 µg/mL	5 µg/mL	150 µg/mL
304801	99,2	98,0	99,8	99,5	98,1	97,2
663083	97,8	90,9	99,3	99,3	96,5	93,0
674450	96,2	97,0	98,6	94,4	94,6	89,3

494372	94,1	89,3	98,9	97,5	97,2	93,6
693401	93,6	89,9	96,7	92,0	94,6	90,2
681251	95,4	93,9	99,1	98,2	97,8	96,1
681257	93,4	90,5	97,6	93,7	95,6	92,7

Exemplo 97: Oligonucleotídeos modificados que direcionam a TTR compreendendo um grupo de conjugado GalNAc3

[001161] Os oligonucleotídeos mostrados na Tabela 108 que compreendem um conjugado de GalNAc foram projetados para se direcionar à TTR.

Tabela 108

Oligonucleotídeos modificados direcionados à TTR

ISIS No.	Sequências (5' a 3')	Agrupamento $_{GalNAc}3$	CM	SEQ ID No.
666941	**$GalNAc_3$-$3_{a\text{-}o}$'A_{do}** T_{es} $^mC_{es}$ T_{es} T_{es} G_{es} G_{ds} T_{ds} T_{ds} A_{ds} $^mC_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{ds} A_{es} T_{es} $^mC_{es}$ $^mC_{es}$ ^mC_e	$GalNAc_3$-3	A_d	269
666942	T_{es} $^mC_{eo}$ T_{eo} T_{eo} G_{eo} G_{ds} T_{ds} T_{ds} A_{ds} $^mC_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{ds} A_{eo} T_{eo} $^mC_{es}$ $^mC_{es}$ $^mC_{eo}$ **A_{do}'-$GalNAc_3$-3_a**	$GalNAc_3$-1	A_d	266
682876	**$GalNAc_3$-$3_{a\text{-}o}$'**T_{es} $^mC_{es}$ T_{es} T_{es} G_{es} G_{ds} T_{ds} T_{ds} A_{ds} $^mC_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{ds} A_{es} T_{es} $^mC_{es}$ $^mC_{es}$ ^mC_e	$GalNAc_3$-3	PO	265
682877	**$GalNAc_3$-$7_{a\text{-}o}$'**T_{es} $^mC_{es}$ T_{es} T_{es} G_{es} G_{ds} T_{ds} T_{ds} A_{ds} $^mC_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{ds} A_{es} T_{es} $^mC_{es}$ $^mC_{es}$ ^mC_e	$GalNAc_3$-7	PO	265
682878	**$GalNAc_3$-$10_{a\text{-}o}$'**T_{es} $^mC_{es}$ T_{es} T_{es} G_{es} G_{ds} T_{ds} T_{ds} A_{ds} $^mC_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{ds} A_{es} T_{es} $^mC_{es}$ $^mC_{es}$ ^mC_e	$GalNAc_3$-10	PO	265
682879	**$GalNAc_3$-$13_{a\text{-}o}$'**T_{es} $^mC_{es}$ T_{es} T_{es} G_{es} G_{ds} T_{ds} T_{ds} A_{ds} $^mC_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{ds} A_{es} T_{es} $^mC_{es}$ $^mC_{es}$ ^mC_e	$GalNAc_3$-13	PO	265
682880	**$GalNAc_3$-$7_{a\text{-}o}$'A_{do}** T_{es} $^mC_{es}$ T_{es} T_{es} G_{es} G_{ds} T_{ds} T_{ds} A_{ds} $^mC_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{ds} A_{es} T_{es} $^mC_{es}$ $^mC_{es}$ ^mC_e	$GalNAc_3$-7	A_d	269
682881	**$GalNAc_3$-$10_{a\text{-}o}$'A_{do}** T_{es} $^mC_{es}$ T_{es} T_{es} G_{es} G_{ds} T_{ds} T_{ds} A_{ds} $^mC_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{ds} A_{es} T_{es} $^mC_{es}$ $^mC_{es}$ ^mC_e	$GalNAc_3$-10	A_d	269
682882	**$GalNAc_3$-$13_{a\text{-}o}$'A_{do}** T_{es} $^mC_{es}$ T_{es} T_{es} G_{es} G_{ds} T_{ds} T_{ds} A_{ds} $^mC_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{ds} A_{es} T_{es} $^mC_{es}$ $^mC_{es}$ ^mC_e	$GalNAc_3$-13	A_d	269
684056	T_{es} $^mC_{es}$ T_{es} T_{es} G_{es} G_{ds} T_{ds} T_{ds} A_{ds} $^mC_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{ds} A_{es} T_{es} $^mC_{es}$ $^mC_{es}$ $^mC_{eo}$ **A_{do}'-$GalNAc_3$-19_a**	$GalNAc_3$-19	A_d	266

[001162] A legenda para a Tabela 108 pode ser encontrada no Exemplo 74. A estrutura de $GalNAc_3$-3_a foi mostrada no Exemplo 39. A estrutura de $GalNAc_3$-7_a foi mostrada no Exemplo 48. A estrutura de $GalNAc_3$-10_a foi mostrada no Exemplo 46. A estrutura de $GalNAc_3$-13_a foi mostrada no Exemplo 62. A estrutura de $GalNAc_3$-19_a foi mostrada no Exemplo 70.

Example 98: Avaliação dos efeitos pro-inflamatórios de oligonucleotídeos compreendendo um conjugado de GalNAc no ensaio hPMBC

[001163] Os oligonucleotídeos são listados na Tabela 109 e foram testados para os efeitos pró-inflamatórios em um ensaio hPMBC conforme descrito nos Exemplos 23 e 24. (Veja as Tabelas 30, 83, 95 e 108 para

descrições dos oligonucleotídeos.) ISIS 353512 é um alto respondedor usado como um controle positivo, e os outros oligonucleotídeos são descritos nas Tabelas 83, 95 e 108. Os resultados mostrados na Tabela 109 foram obtidos usando sangue de um doador voluntário. Os resultados mostram que os oligonculeotídeos que compreendem ligações internucleosídicas PO/PS mistas produziram respostas pró-inflamatórias significativamente menores em comparação aos mesmos oligonucleotídeos com ligações PS totais. Além disso, o grupo de conjugado de GalNAc não teve um efeito significativo neste ensaio.

Tabela 109

ISIS No.	E_{max}/EC_{50}	Agrupamento $_{GalNAc}3$	Ligações	CM
353512	3630	n/a	PS	n/a
420915	802	n/a	PS	n/a
682881	1311	$GalNAc_3$-10	PS	A_d
682888	0,26	$GalNAc_3$-10	PO/PS	A_d
684057	1,03	$GalNAc_3$-19	PO/PS	A_d

Exemplo 99: Afinidades de ligação dos oligonucleotídeos que compreendem um conjugado de GalNAc para o receptor de asialoglicoproteína

[001164] As afinidades de ligação dos oligonucleotídeos listados na Tabela 110 (ver a Tabela 76 para as descrições dos oligonucleotídeos) para o receptor de asialoglicoproteína foram testadas em um ensaio de ligação de receptor competitivo. O ligante competidor, α1-glicoproteína ácida (AGP), foi incubada em 50 mM de tampão de acetato de sódio (pH 5) com 1 U de neuraminidase-agarose por 16 horas em 37˚C, e > 90% de desialilação foram confirmados pelo ensaio de ácido siálico ou cromatografia de exclusão por tamanho (SEC). Monocloreto de iodo foi usado para iodar o AGP de acordo com o mesmo procedimento por Atsma et al. (*vide* J Lipid Res. 1991 Jan; 32(1):173-81.) Neste método, a α1-glicoproteína ácida desialilatada (de-AGP) foi adicionada a 10 mM de cloreto de iodo, $Na^{125}I$ e 1 M de glicinaem NaOH 0,25 M. Após a incubação por 10 minutos à temperatura ambiente, de-AGP rotulado por ^{125}II foi separado de ^{125}I livre, concentrando-se a mistura duas vezes uti-

lizando uma coluna de giro 3 KDMWCO. A proteína foi testada para eficiência de marcação e pureza em um sistema de HPLC equipado com uma coluna Agilent SEC-3 (7,8x300mm) e um contador ß-RAM. Experimentos de competição utilizando de-AGP rotulado por ^{125}I e vários agrupamentos de GalNAc contendo ASOs foram realizados conforme se segue. Células HepG2 humanas (10^6 células/ml) foram colocadas em placas de 6 poços em 2 ml de meio de crescimento apropriado. Foram usados o meio MEM complementado com 10% de soro bovino fetal (FBS), 2 mM de L-Glutamina e 10mM de HEPES. As células foram incubadas 16-20 horas em 37˚C com 5% e 10% de CO_2, respectivamente. As células foram lavadas com meio sem FBS antes do experimento. As células foram incubadas por 30 min em 37°C com 1 ml de mix de competição contendo meio de crescimento apropriado com 2% de FBS, 10^{-8} M ^{125}de-AGP e agrupamento de GalNAc contendo ASOs em concentrações variando de 10^{-11} a 10^{-5} M. Ligações não específicas foram determinadas na presença de 10^{-2} M de açúcar de GalNAc. As células foram lavadas duas vezes com meio sem FBS para remover o de-AGP marcado por ^{125}I não ligado e o competidor ASO de GalNAc. As células foram lisadas usando um tampão RLT da Qiagen contendo 1% de ß-mercaptoetanol. Os lisados foram transferidos para tubos de ensaio de fundo redondo após um breve ciclo de congelamento/descongelamento de 10 min e analisados em um contador ɣ. As ligações não específicas foram subtraídas antes de dividir as contagens de proteína com ^{125}I pelo valor das contagens de concentração mais baixas de GalNAc-ASO. As curvas de inibição foram ajustadas para uma única equação de ligação de competição de sítio usando um algoritmo de regressão não linear para calcular as afinidades de ligação (K_D's).

[001165] Os resultados na Tabela 110 foram obtidos a partir de experimentos realizados em cinco dias diferentes. Os resultados para os oli-

gonucleotídeos marcados com sobrescrito "a" são a média dos experimentos realizados em dois dias diferentes. Os resultados mostram que os oligonucleotídeos que compreendem um grupo de conjugado de GalNAc na extremidade 5' ligavam-se ao receptor de asialoglicoproteína nas células HepG2 humanas com afinidade 1,5 a 16 vezes maior do que os oligonucleotídeos que compreendem um grupo de conjugado de GalNAc na extremidade 3'.

Tabela 110

Resultados do ensaio de ligação ao receptor de asialoglicoproteína

ISIS No.	Conjugado de GalNAc	Extremidade do oligonucleotídeo a que o conjugado de GalNAc é unido	K_D (nM)
661161[a]	$GalNAc_3$-3	5'	3,7
666881[a]	$GalNAc_3$-10	5'	7,6
666981	$GalNAc_3$-7	5'	6,0
670061	$GalNAc_3$-13	5'	7,4
655861[a]	$GalNAc_3$-1	3'	11,6
677841[a]	$GalNAc_3$-19	3'	60,8

Exemplo 100: Inibição antissenso *in vivo* por oligonucleotídeos compreendendo um grupo de conjugado de GalNAc direcionados à Apo(a) *in vivo*

[001166] Os oligonucleotídeos listados na Tabela 111a abaixo foram testados em um estudo de dose única para a duração da ação em camundongos.

Tabela 111a

ASOs modificados direcionados à APO(a)

ISIS No.	Sequências (5' a 3')	Agrupamento $_{GalNAc}3$	CM	SEQ ID No.
681251	**$GalNAc_3$-7$_{a-o}$**,$T_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{ds}G_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}G_{ds}T_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}G_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{e}$	$GalNAc_3$-7a	PO	277
681257	**$GalNAc_3$-7$_{a-o}$**,$T_{es}G_{eo}{}^{m}C_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{eo}{}^{m}C_{ds}G_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}G_{ds}T_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{eo}G_{eo}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{e}$	$GalNAc_3$-7a	PO	277

[001167] A estrutura $GalNAc_3$-7_a foi mostrada no Exemplo 48.

Tratamento

[001168] Camundongos transgênicos fêmeas que expressam a Apo(a) humana foram, cada um, injetados por via subcutânea uma vez por semana, por um total de 6 doses, com um oligonucleotídeo e a dosagem listada na Tabela 111b ou com PBS. Cada grupo de tratamento

consistiu em 3 animais. O sangue foi retirado no dia antes da dosagem para determinar os níveis de base de referência da proteína Apo(a) no plasma e em 72 horas, 1 semana e 2 semanas após a primeira dose. Retiradas adicionais de sangue ocorrerão em 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas e 6 semanas após a primeira dose. Os níveis da proteína Apo(a) foram medidos usando um ELISA. Os resultados na Tabela 111b são apresentados como a porcentagem média dos níveis da proteína Apo(a) no plasma para cada grupo de tratamento, normalizados para os níveis de base de referência (% BL). Os resultados mostram que os oligonucleotídeos que compreendem um grupo de conjugado de GalNAc exibiam potente redução na expressão de Apo(a). Este potente efeito foi observado para o oligonucleotídeo que compreende ligações internucleosídicas PS totais e para o oligonucleotídeo que compreende ligações PO e PS mistas.

Tabela 111b

Níveis plasmáticos da proteína Apo(a)

ISIS No.	Dosagem (mg/kg)	Apo(a) em 72 horas (% de BL)	Apo(a) em 1 semana (% de BL)	Apo(a) em 3 semanas (% de BL)
PBS	n/a	116	104	107
681251	0,3	97	108	93
	1,0	85	77	57
	3,0	54	49	11
	10,0	23	15	4
681257	0,3	114	138	104
	1,0	91	98	54
	3,0	69	40	6
	10,0	30	21	4

Exemplo 101: Inibição antissenso por oligonucleotídeos compreendendo um cluster de GalNAc ligado através de uma porção estável

[001169] Os oligonucleotídeos listados na Tabela 112 foram testados para a inibição da expressão de APOC-III de camundongos *in vivo*. Camundongos C57Bl/6 foram, cada um, injetados por via subcutânea uma vez com um oligonucleotídeo listado na Tabela 112 ou com PBS. Cada grupo de tratamento consistiu em 4 animais. Cada camundongo tratado com ISIS 440670 recebeu uma dose de 2, 6, 20, ou 60 mg/kg. Cada camundongo tratado com ISIS 680772 ou 696847 recebeu 0,6, 2, 6 ou

20 mg/kg. O grupo de conjugado de GalNAc de ISIS 696847 é ligado através de uma porção estável, uma ligação fosforotioato em vez de uma ligação contendo fosfodiéster facilmente clivável. Os animais foram sacrificados 72 horas após a dose. Os níveis hepáticos de mRNA de APOC-III foram medidos usando PCR em tempo real. Os níveis de mRNA de APOC-III foram normalizados para os níveis de mRNA de ciclofilina, de acordo com protocolos padrão. Os resultados são apresentados na Tabela 112 como a porcentagem média dos níveis de mRNA de APOC-III para cada grupo de tratamento em relação ao grupo controle com salina. Os resultados mostram que os oligonucleotídeos que compreendem um grupo de conjugado de GalNAC foram significativamente mais potentes do que o oligonucleotídeo em que falta um grupo de conjugado. Além disso, o oligonucleotídeo que compreende um grupo de conjugado de GalNAc ligado ao oligonucleotídeo através de uma porção clivável(ISIS 680772) foi até mais potente do que o oligonucleotídeo que compreende um grupo de conjugado de GalNAc ligado ao oligonucleotídeo através de uma porção estável (ISIS 696847).

Tabela 112

Oligonucleotídeos modificados direcionados à APOC-III de camundongo

ISIS No.	Sequências (5' a 3')	CM	Dosagem (mg/kg)	mRNA de APOC-III (% de PBS)	SEQ ID No.
440670	$^{m}C_{es}A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{ds}T_{ds}A_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}$ $G_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{es}\ A_{es}G_{es}\ {}^{m}C_{es}A_{e}$	n/a	2	92	271
			6	86	
			20	59	
			60	37	
680772	**GalNAc$_3$-7$_{a\text{-}o}$**,$^{m}C_{es}A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{ds}T_{ds}A_{ds}$ $T_{ds}T_{ds}A_{ds}G_{ds}\ G_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{es}\ A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}A_{e}$	PO	0,6	79	271
			2	58	
			6	31	
			20	13	
696847	**GalNAc$_3$-7$_{a\text{-}s}$**,$^{m}C_{es}A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}$-$T_{ds}T_{ds}A_{ds}T_{ds}$ $T_{ds}A_{ds}G_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{es}\ A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}A_{e}$	n/a (PS)	0,6	83	271
			2	73	
			6	40	
			20	28	

[001170] A estrutura GalNAc$_3$-7$_a$ foi mostrada no Exemplo 48.

Exemplo 102: Distribuição no fígado de oligonucleótidos antissenso compreendendo um conjugado de GalNAc

[001171] A distribuição no fígado de ISIS 353382 (ver a Tabela 36)

que não compreende um conjugado de GalNAc e ISIS 655861 (ver a Tabela 36) que compreende um conjugado de GalNAc foi avaliada. Camundongos balb/c machos foram injetados por via subcutânea uma vez com ISIS 353382 ou 655861 numa dosagem listada na Tabela 113. Cada grupo de tratamento consistiu em 3 animais, exceto para o grupo de 18 mg/kg para ISIS 655861, que consistiu em 2 animais. Os animais foram sacrificados 48 horas após a dose para determinar a distribuição no fígado dos oligonucleotídeos. A fim de medir o número de moléculas de oligonucleotídeo antissenso por célula, um marcador de tris-bipiridina de rutênio(II) (MSD TAG, Meso Scale Discovery) foi conjugado a uma sonda de oligonucleotídeo usada para detectar os oligonucleotídeos antissenso. Os resultados apresentados na Tabela 113 são as concentrações médias de oligonucleotídeo para cada grupo de tratamento em unidades de milhões de moléculas de oligonucleotídeo por célula. Os resultados mostram que, em doses equivalentes, o oligonucleotídeo que compreende um conjugado de GalNAc esteve presente em concentrações maiores o fígado total e em hepatócitos do que o oligonucleotídeo que não compreende um conjugado de GalNAc. Além disso, o oligonucleotídeo que compreende um conjugado de GalNAc esteve presente em concentrações mais baixas em células hepáticas não parenquimatosas do que o oligonucleotídeo que não compreende um conjugado de GalNAc. E, embora as concentrações de ISIS 655861 em hepatócitos e em células hepáticas não parenquimatosas sejam semelhantes por célula, o fígado é aproximadamente 80% de hepatócitos em volume. Assim, a maioria do oligonucleotídeo ISIS 655861 que esteve presente no fígado foi encontrada nos hepatócitos, considerando que a maioria do oligonucleotídeo ISIS 353382 que esteve presente no fígado foi encontrada em células hepáticas não parenquimatosas.

Tabela 113

ISIS No.	Dosagem (mg/kg)	Concentração no fígado inteiro (moléculas*10^6 por célula)	Concentração nos hepatócitos (moléculas*10^6 por cécula)	Concentração nas células não parenquimais do fígado (moléculas*10^6 por

				célula)
353382	3	9,7	1,2	37,2
	10	17,3	4,5	34,0
	20	23,6	6,6	65,6
	30	29,1	11,7	80,0
	60	73,4	14,8	98,0
	90	89,6	18,5	119,9
655861	0,5	2,6	2,9	3,2
	1	6,2	7,0	8,8
	3	19,1	25,1	28,5
	6	44,1	48,7	55,0
	18	76,6	82,3	77,1

Example 103: Duração do estudo de ação *in vivo* de oligonucleotídeos que direcionam APOC-III compreendendo um conjugado GalNAc3

[001172] Os oligonucleotídeos listados na Tabela 114 abaixo foram testados em um estudo de dose única para a duração da ação em camundongos.

Tabela 114

ASOs modificados que se direcionam a APOC-III

ISIS No.	Sequências (5' a 3')	Agrupamento de $GalNAc_3$	CM	SEQ ID No.
304801	$A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{es}T_{es}$ $T_{es}A_{es}T_{e}$	n/a	n/a	244
663084	**$GalNAc_3$-3_{a}-$_{o}$'A_{do}**$A_{es}G_{eo}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}$ $^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{eo}T_{eo}$ $T_{es}A_{es}T_{e}$	$GalNAc_3$-3a	A_d	260
679241	$A_{es}G_{eo}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{eo}T_{eo}$ $T_{es}A_{es}T_{eo}$**A_{do}'-$GalNAc_3$-19_{a}**	$GalNAc_3$-19a	A_d	245

[001173] A estrutura de $GalNAc_3$-3_a foi mostrada anteriormente no Exemplo 39, e a estrutura de $GalNAc_3$-19_a foi mostrada no Exemplo 70.

Tratamento

[001174] Camundongos transgênicos fêmeas que expressam a APOC-III humana foram, cada um, injetados por via subcutânea uma vez com um oligonucleotídeo listado na Tabela 114 ou com PBS. Cada grupo de tratamento consistiu em 3 animais. O sangue foi retirado antes da dosagem para determinar a base de referência e em 3, 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias após a dose. Os níveis de triglicérides plasmáticos e da proteína APOC-III foram medidos conforme descrito no Exemplo 20. Os resultados na Tabela 115 são apresentados como a percentagem média dos níveis de triglicérides plasmáticos e APOC-III para cada grupo de tratamento, normalizados para os níveis de base de referência. Uma

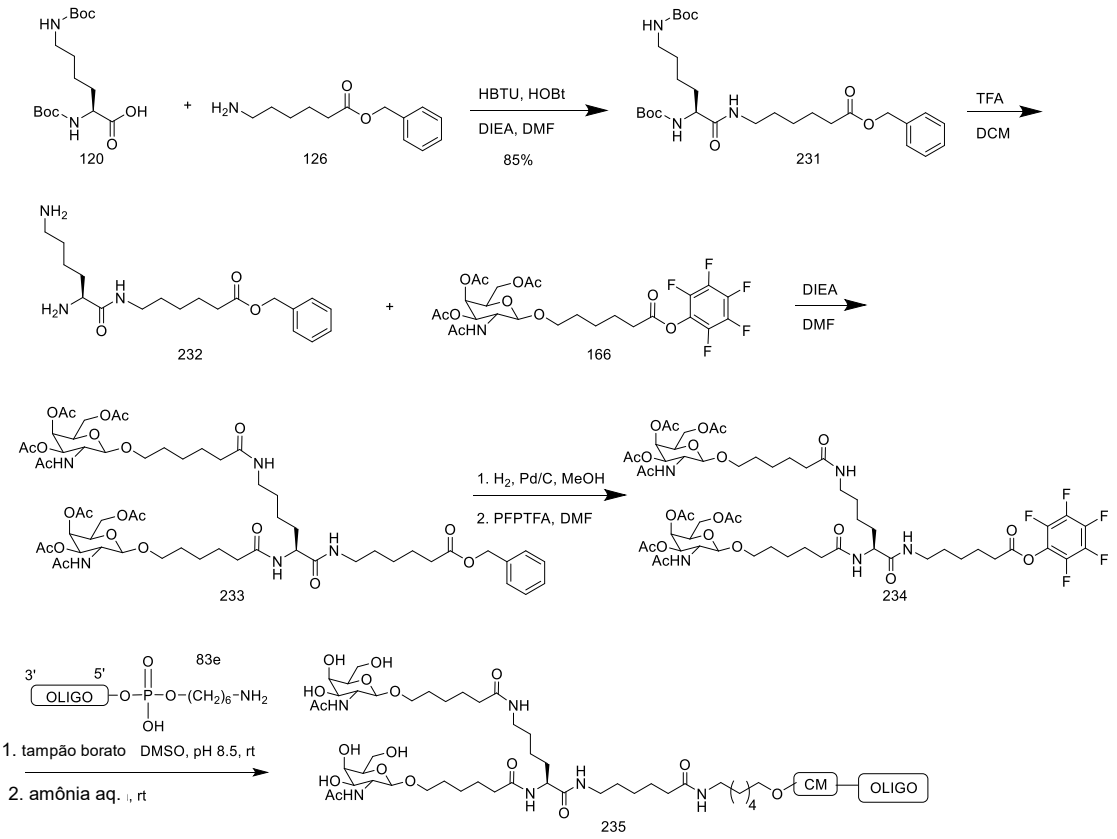
comparação dos resultados na Tabela 71 do Exemplo 79 com os resultados na Tabela 115 abaixo mostra que os oligonucleotídeos que compreendem uma mistura de ligações internucleosídicas de fosfodiéster e fosforotioato exibiram maior duração de ação do que os oligonucleotídeos equivalentes que compreendem apenas ligações internucleosídicas de fosforotioato.

Tabela 115

Níveis de triglicérides plasmáticos e da proteína APOC-III em camundongos trangênicos

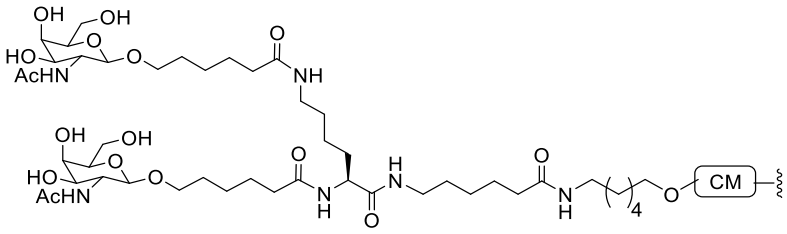
ISIS No.	Dosagem (mg/kg)	Ponto do tempo (dias pós-dose)	Triglicerídeos (% da linha de base)	Proteína de APOC-III (% da linha de base)	Agrupamento $_{GalNAc}3$	CM
PBS	n/a	3	96	101	n/a	n/a
		7	88	98		
		14	91	103		
		21	69	92		
		28	83	81		
		35	65	86		
		42	72	88		
304801	30	3	42	46	n/a	n/a
		7	42	51		
		14	59	69		
		21	67	81		
		28	79	76		
		35	72	95		
		42	82	92		
663084	10	3	35	28	$GalNAc_3$-3a	A_d
		7	23	24		
		14	23	26		
		21	23	29		
		28	30	22		
		35	32	36		
		42	37	47		
679241	10	3	38	30	$GalNAc_3$-19a	A_d
		7	31	28		
		14	30	22		
		21	36	34		
		28	48	34		
		35	50	45		
		42	72	64		

Exemplo 104: Síntese de oligonucleotídeos compreendendo um conjugado de 5'-GalNAc2

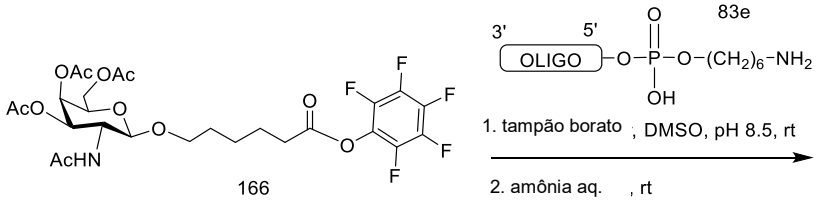


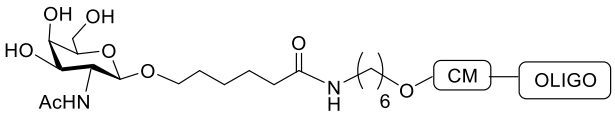
[001175] O composto 120 está disponível comercialmente, e a síntese do composto 126 é descrita no Exemplo 49. O composto 120 (1 g, 2,89 mmol), HBTU (0,39 g, 2,89 mmol), e HOBt (1,64 g, 4,33 mmol) foram dissolvidos em DMF (10 mL) e *N*,*N*-di-isopropiletilamina (1,75 mL, 10,1 mmol) foi adicionada. Após cerca de 5 min, éster benzílico de ácido aminohexanoico (1,36 g, 3,46 mmol) foi adicionado à reação. Após 3 h, a mistura de reação foi vertida em 100 mL de 1 M de NaHSO4 e extraída com 2 x 50 mL de acetato de etil. As camadas orgânicas foram combinadas e lavadas com 3 x 40 mL de $NaHCO_3$ saturado e 2 x de salmoura, secas com Na_2SO_4, filtradas e concentradas. LCMS e RMN foram consistentes com a estrutura. O composto 231 (1,34 g, 2,438 mmol) foi dissolvido em diclorometano (10 mL) e ácido trifluoracético (10 mL) foi adicionado. Após agitação em temperatura ambiente por 2 h, a mistura de reação foi concentrada sob pressão reduzida e co-evaporada com tolueno (3 x 10 mL). O resíduo foi seco sob pressão reduzida para produzir o composto 232 como sal de trifluoroacetato. A síntese do composto

166 é descrito no Exemplo 54. O composto 166 (3,39 g, 5,40 mmol) foi dissolvido em DMF (3 mL). Uma solução do composto 232 (1,3 g, 2,25 mmol) foi dissolvida em DMF (3 mL) e *N*,*N*-di-isopropiletilamina (1,55 mL) foi adicionada. A reação foi agitada à temperatura ambiente por 30 minutos, em seguida, vertida em água (80 mL) e a camada aquosa foi extraída com EtOAc (2x100 mL). A fase orgânica foi separada e lavada com sentado. NaHCO aqueous$_3$ (3 x 80 mL), 1 M $NaHSO_4$ (3 x 80 mL) e salmoura (2 x 80 mL), então secada (Na_2SO_4), filtrada e concentrada. O resíduo foi purificado por cromatografia de coluna em sílica-gel para produzir o composto 233. LCMS e RMN foram consistentes com a estrutura. O composto 233 (0,59 g, 0,48 mmol) foi dissolvido em metanol (2,2 mL) e acetato de etila (2,2 mL). O paládio no carbono (10 wt% Pd/C, úmido, 0,07 g) foi adicionado, e a mistura de reação foi agitado sob atmosfera de hidrogênio por 3 h. A mistura de reação foi filtrada através de uma capa de Celite e concentrada para render o ácido carboxílico. O ácido carboxílico (1,32 g, 1,15 mmol, ácido sem cluster) foi dissolvido em DMF (3,2 mL). A isto, *N*,*N*-di-isopropiletilamina (0,3 mL, 1,73 mmol) e PFPTFA (0,30 mL, 1,73 mmol) foram adicionados. Após 30 min de agitação à temperatura ambiente, a mistura de reação foi vertida em água (40 mL) e extraída com EtOAc (2 x 50 mL). Um acompanhamento padrão foi concluído conforme descrito acima para produzir o composto 234. LCMS e RMN foram consistentes com a estrutura. O oligonucleotídeo 235 foi preparado usando o procedimento geral descrito no Exemplo 46. A parte do agrupamento $GalNAc_2$ ($GalNAc_2$-24_a) do grupo de conjugado $GalNAc_2$-24 pode ser combinado com qualquer porção clivável presente no oligonucleotídeo para fornecer uma variedade de grupos conjugados. A estrutura de $GalNAc_2$-24 ($GalNAc_2$-24_a-CM) é mostrada abaixo:



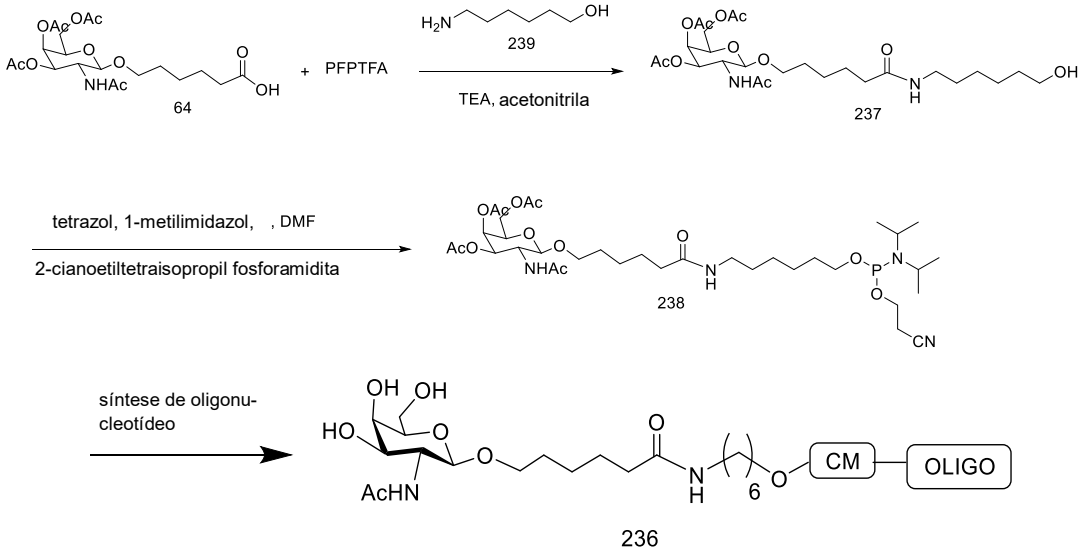
Exemplo 105: Síntese de oligonucleotídeos compreendendo um conjugado de GalNAc1-25



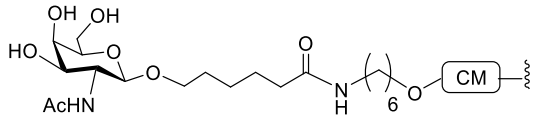


[001176] A síntese do composto 166 é descrita no Exemplo 54. O oligonucleotídeo 236 foi preparado usando o procedimento geral descrito no Exemplo 46.

[001177] Alternativamente, o oligonucleotídeo 236 foi sintetizado usando o esquema abaixo, e o composto 238 foi usado para formar o oligonucleotídeo 236 usando os procedimentos descritos no Exemplo 10.



[001178] A parte do agrupamento $GalNAc_1$ ($GalNAc_1$-25_a) do grupo de conjugado $GalNAc_1$-25 pode ser combinado com qualquer porção clivável presente no oligonucleotídeo para fornecer uma variedade de grupos conjugados. A estrutura de $GalNAc_1$-25 ($GalNAc_1$-25_a-CM) é mostrada abaixo:



Exemplo 106: Inibição antissenso *in vivo* por oligonucleotídeos direcionados a SRB-1 compreendendo um conjugado de 5'-$GalNAc_2$ ou um conjugado $_{5'\text{-}GalNAc}3$

[001179] Os oligonucleotídeos listados nas Tabelas 116 e 117 foram testados em estudos dependentes da dose para uma inibição antissenso de SRB-1 em camundongos.

Tratamento

[001180] Camundongos C57BL/6 machos de seis semanas de idade (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) foram injetados por via subcutânea uma vez com 2, 7, ou 20 mg/kg de Nº. ISIS 440762; ou com 0,2, 0,6, 2, 6, ou 20 mg/kg de Nº. ISIS 686221, 686222, ou 708561; ou com solução salina. Cada grupo de tratamento consistiu em 4 animais. Os camundongos foram sacrificados 72 horas após a administração final. Os níveis hepáticos de mRNA de SRB-1 foram medidos usando PCR em tempo real. Os níveis de mRNA de SRB-1 foram normalizados para os níveis de mRNA de ciclofilina, de acordo com protocolos padrão. Os oligonucleotídeos antissenso diminuíram os níveis de mRNA de SRB-1 de uma forma dependente de dose, e os resultados de ED_{50} são apresentados nas Tabelas 116 e 117. Embora estudos anteriores mostrem que os oligonucleotídeos conjugados a GalNAc trivalentes foram significativamente mais potentes do que os oligonucleotídeos conjugados a GalNAc, que foram, por sua vez, significativamente mais potentes do que os oligonucleotídeos conjugados a GalNAc monovalentes (*ver*, por

exemplo, Khorev et al., *Bioorg. & Med. Chem.*, Vol. 16, 5216-5231 (2008)), o tratamento com oligonucleotídeos antissenso compreendendo clusters de GalNAc monovalentes, divalentes e trivalentes diminuiu os níveis de mRNA de SRB-1 com potências semelhantes, como mostrado nas Tabelas 116 e 117.

Tabela 116

Oligonucleotídeos modificados direcionados a SRB-1

ISIS No.	Sequências (5' a 3')	Agrupamento GalNAc	ED_{50} (mg/kg)	SEQ ID No.
440762	$T_{ks}{}^{m}C_{ks}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ks}{}^{m}C_{k}$	n/a	4,7	246
686221	**$GalNAc_2$-24_a-$_o$,A_{do}**$T_{ks}{}^{m}C_{ks}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}$ $G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ks}{}^{m}C_{k}$	$GalNAc_2$-24_a	0,39	250
686222	**$GalNAc_3$-13_a-$_o$,A_{do}**$T_{ks}{}^{m}C_{ks}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}$ $G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ks}{}^{m}C_{k}$	$GalNAc_3$-13_a	0,41	250

[001181] Veja o Exemplo 93 para a legenda da tabela. A estrutura de $GalNAc_3$-13a foi mostrada anteriormente no Exemplo 62, e a estrutura de $GalNAc_2$-24a foi mostrada no Exemplo 104.

Tabela 117

Oligonucleotídeos modificados direcionados a SRB-1

ISIS No.	Sequências (5' a 3')	Agrupamento GalNAc	ED_{50} (mg/kg)	SEQ ID No.
440762	$T_{ks}{}^{m}C_{ks}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ks}{}^{m}C_{k}$	n/a	5	246
708561	**$GalNAc_1$-25_a-$_o$,**$T_{ks}{}^{m}C_{ks}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}$ $A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ks}{}^{m}C_{k}$	$GalNAc_1$-25_a	0,4	246

[001182] Veja o Exemplo 93 para a legenda da tabela. A estrutura de $GalNAc_1$-25a foi mostrada no Exemplo 105.

[001183] As concentrações dos oligonucleotídeos nas Tabelas 116 e 117 no fígado também foram avaliadas, usando os procedimentos descritos no Exemplo 75. Os resultados mostrados nas Tabelas 117a e 117b abaixo são os níveis médios totais teciduais do oligonucleotídeo antissenso para cada grupo de tratamento, conforme medido por UV em unidades de µg de oligonucleotídeo por grama de tecido hepático. Os resultados mostram que os oligonucleotídeos que compreendem um grupo de conjugado de GalNAc acumulado no fígado em níveis significativamente mais altos do que a mesma dose do oligonucleotídeo em que falta um grupo de conjugado de GalNAc. Além disso, os oligonucle-

otídeos antissenso que compreendem um, dois ou três ligantes de GalNAc em seus respectivos grupos de conjugado todos se acumularam o fígado em níveis semelhantes. Este resultado é surpreendente em vista da referência da literatura de Khorev et al. citada acima e é consistente com os dados de atividade mostrados nas Tabelas 116 e 117 acima.

Tabela 117a

Concentrações no fígado de oligonucleotídeos compreendendo um grupo de conjugado GalNAc2 ou GalNAc3

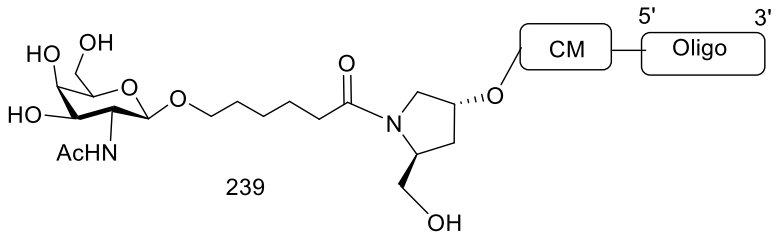
ISIS No.	Dosagem (mg/kg)	[Oligonucleotídeo antissenso] (µg/g)	Agrupamento GalNAc	CM
440762	2	2,1	n/a	n/a
	7	13,1		
	20	31,1		
686221	0,2	0,9	$GalNAc_2$-24_a	A_d
	0,6	2,7		
	2	12,0		
	6	26,5		
686222	0,2	0,5	$GalNAc_3$-13_a	A_d
	0,6	1,6		
	2	11,6		
	6	19,8		

Tabela 117b

Concentrações no fígado de oligonucleotídeos compreendendo um grupo de conjugado $_{GalNAc}$1

ISIS No.	Dosagem (mg/kg)	[Oligonucleotídeo antissenso] (µg/g)	Agrupamento GalNAc	CM
440762	2	2,3	n/a	n/a
	7	8,9		
	20	23,7		
708561	0,2	0,4	$GalNAc_1$-25_a	PO
	0,6	1,1		
	2	5,9		
	6	23,7		
	20	53,9		

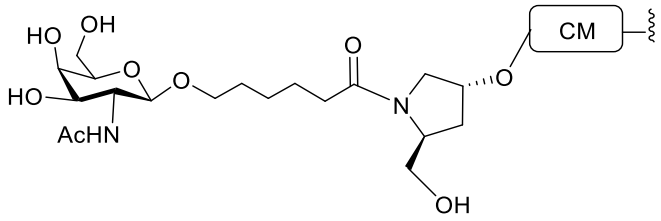
Exemplo 107: Síntese de oligonucleotídeos compreendendo um conjugado de GalNAc1-26 ou GalNAc1-27



239

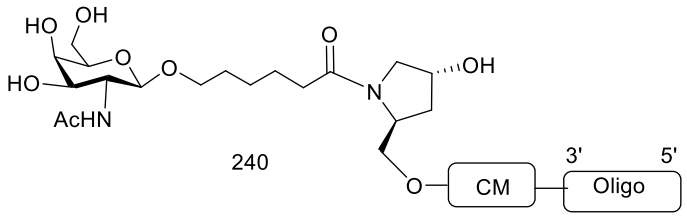
[001184] O oligonucleotídeo 239 é sintetizado através do acoplamento

do composto 47 (ver o Exemplo 15) ao ácido 64 (ver o Exemplo 32) usando HBTU e DIEA em DMF. O composto contendo amida resultante é fosfitilado, em seguida, adicionado à extremidade 5' de um oligonucleotídeo usando os procedimentos descritos no Exemplo 10. A parte do agrupamento GalNAc$_1$ (GalNAc$_1$-26$_a$) do grupo de conjugado GalNAc$_1$-26 pode ser combinado com qualquer porção clivável presente no oligonucleotídeo para fornecer uma variedade de grupos conjugados. A estrutura de GalNAc$_1$-26 (GalNAc$_1$-26$_a$-CM) é mostrada abaixo:



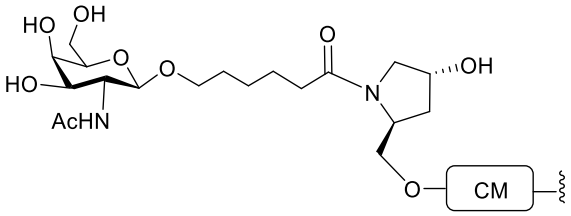
.

[001185] A fim de adicionar o grupo de conjugado de GalNAc$_1$ à extremidade 3’ de um oligonucleotídeo, a amida formada a partir da reação dos compostos 47 e 64 é adicionada a um suporte sólido usando os procedimentos descritos no Exemplo 7. A síntese do oligonucleotídeo é então concluída usando os procedimentos descritos no Exemplo 9 a fim de formar o oligonucleotídeo 240.



240

[001186] A parte do agrupamento GalNAc$_1$ (GalNAc$_1$-27$_a$) do grupo de conjugado GalNAc$_1$-27 pode ser combinado com qualquer porção clivável presente no oligonucleotídeo para fornecer uma variedade de grupos conjugados. A estrutura de GalNAc$_1$-27 (GalNAc$_1$-27$_a$-CM) é mostrada abaixo:



Exemplo 108: Inibição antissenso *in vivo* por oligonucleotídeos compreendendo um grupo de conjugado de GalNAc direcionados à Apo(a) *in vivo*

[001187] Os oligonucleotídeos listados na Tabela 118 abaixo foram testados em um estudo de dose única em camundongos.

Tabela 118

ASOs modificados direcionados à APO(a)

ISIS No.	Sequências (5' a 3')	Agrupamento $_{GalNAc}3$	CM	SEQ ID No.
494372	$T_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{ds}G_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}G_{ds}T_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}$ $T_{ds}T_{es}G_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{e}$	n/a	n/a	277
681251	**GalNAc$_3$-7$_{a-o'}$**$T_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{ds}G_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}G_{ds}$ $T_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}G_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{e}$	GalNAc$_3$-7a	PO	277
681255	**GalNAc$_3$-3$_{a-o'}$**$T_{es}G_{eo}{}^{m}C_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{eo}{}^{m}C_{ds}G_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}G_{ds}$ $T_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{eo}G_{eo}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{e}$	GalNAc$_3$-3a	PO	277
681256	**GalNAc$_3$-10$_{a-o'}$**$T_{es}G_{eo}{}^{m}C_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{eo}{}^{m}C_{ds}G_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}G_{ds}$ $T_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{eo}G_{eo}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{e}$	GalNAc$_3$-10a	PO	277
681257	**GalNAc$_3$-7$_{a-o'}$**$T_{es}G_{eo}{}^{m}C_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{eo}{}^{m}C_{ds}G_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}G_{ds}$ $T_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{eo}G_{eo}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{e}$	GalNAc$_3$-7a	PO	277
681258	**GalNAc$_3$-13$_{a-o'}$**$T_{es}G_{eo}{}^{m}C_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{eo}{}^{m}C_{ds}G_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}G_{ds}$ $T_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{eo}G_{eo}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{e}$	GalNAc$_3$-13a	PO	277
681260	$T_{es}G_{eo}{}^{m}C_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{eo}{}^{m}C_{ds}G_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}G_{ds}$ $T_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}$ $T_{eo}G_{eo}$ $T_{es}T_{es}{}^{m}C_{eo}$**A$_{do'}$-GalNAc$_3$-19**	GalNAc$_3$-19a	A$_d$	276

[001188] A estrutura GalNAc$_3$-7$_a$ foi mostrada no Exemplo 48.

Tratamento

[001189] Camundongos transgênicos machos que expressam a Apo(a) humana foram, cada um injetados por via subcutânea uma vez com um oligonucleotídeo e dosagem listados na Tabela 119 ou com PBS. Cada grupo de tratamento consistiu em 4 animais. O sangue foi retirado no dia antes da dosagem para determinar os níveis de base de referência da proteína Apo(a) no plasma e em 1 semana após a primeira dose. Retiradas adicionais de sangue ocorrerão semanalmente por aproximadamente 8 semanas. Os níveis da proteína Apo(a) foram medidos usando um ELISA. Os resultados na Tabela 119 são apresenta-

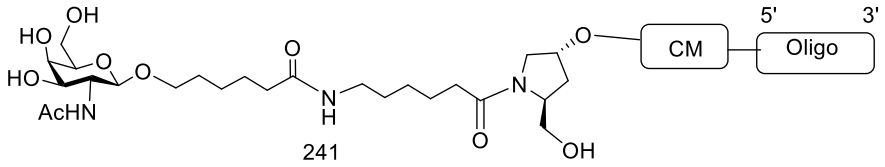
dos como a porcentagem média dos níveis da proteína Apo(a) plasmática para cada grupo de tratamento, normalizados para os níveis de base de referência (% BL). Os resultados mostram que os oligonucleotídeos antissenso reduziram a expressão da proteína Apo(a). Além disso, os oligonucleotídeos que compreendem um grupo de conjugado de GalNAc exibiram uma redução até mais potente da expressão de Apo(a) do que os oligonucleotídeos que não compreendem um grupo de conjugado.

Tabela 119

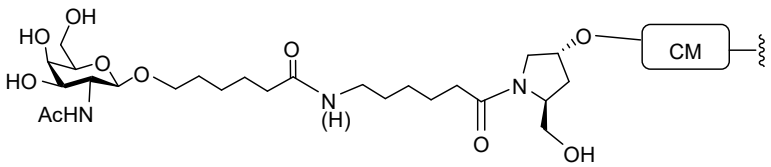
Níveis plasmáticos da proteína Apo(a)

ISIS No.	Dosagem (mg/kg)	Apo(a) em 1 semana(% de BL)
PBS	n/a	143
494372	50	58
681251	10	15
681255	10	14
681256	10	17
681257	10	24
681258	10	22
681260	10	26

Exemplo 109: Síntese de oligonucleotídeos compreendendo um conjugado de GalNAc1-28 ou GalNAc1-29

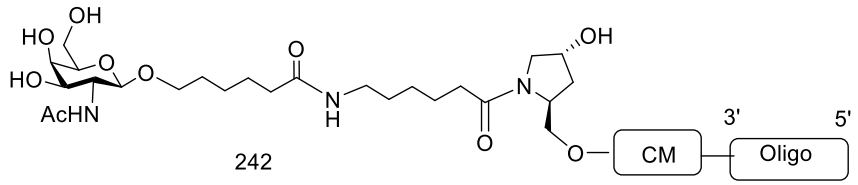


[001190] O oligonucleotídeo 241 é sintetizado usando procedimentos semelhantes àqueles descritos no Exemplo 71 para formar o intermediário fosforamidita, seguido pelos procedimentos descritos no Exemplo 10 para sintetizar o oligonucleotídeo. A parte do agrupamento GalNAc$_1$(GalNAc$_1$-28$_a$) do grupo de conjugado GalNAc$_1$-28 pode ser combinado com qualquer porção clivável presente no oligonucleotídeo para fornecer uma variedade de grupos conjugados. A estrutura de GalNAc$_1$-



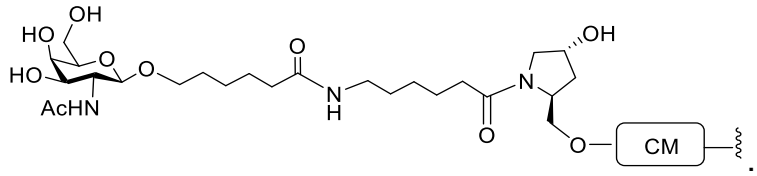
28 (GalNAc$_1$-28$_a$-CM) é mostrada abaixo:

[001191] A fim de adicionar o grupo de conjugado de GalNAc$_1$ à extremidade 3' de um oligonucleotídeo, procedimentos semelhantes àqueles descritos no Exemplo 71 são usados para formar o intermediário hidroxila, que é então adicionado ao suporte sólido usando os procedimentos descritos no Exemplo 7. A síntese do oligonucleotídeo é então concluída usando os procedimentos descritos no Exemplo 9 a fim de formar o oligonucleotídeo 242.

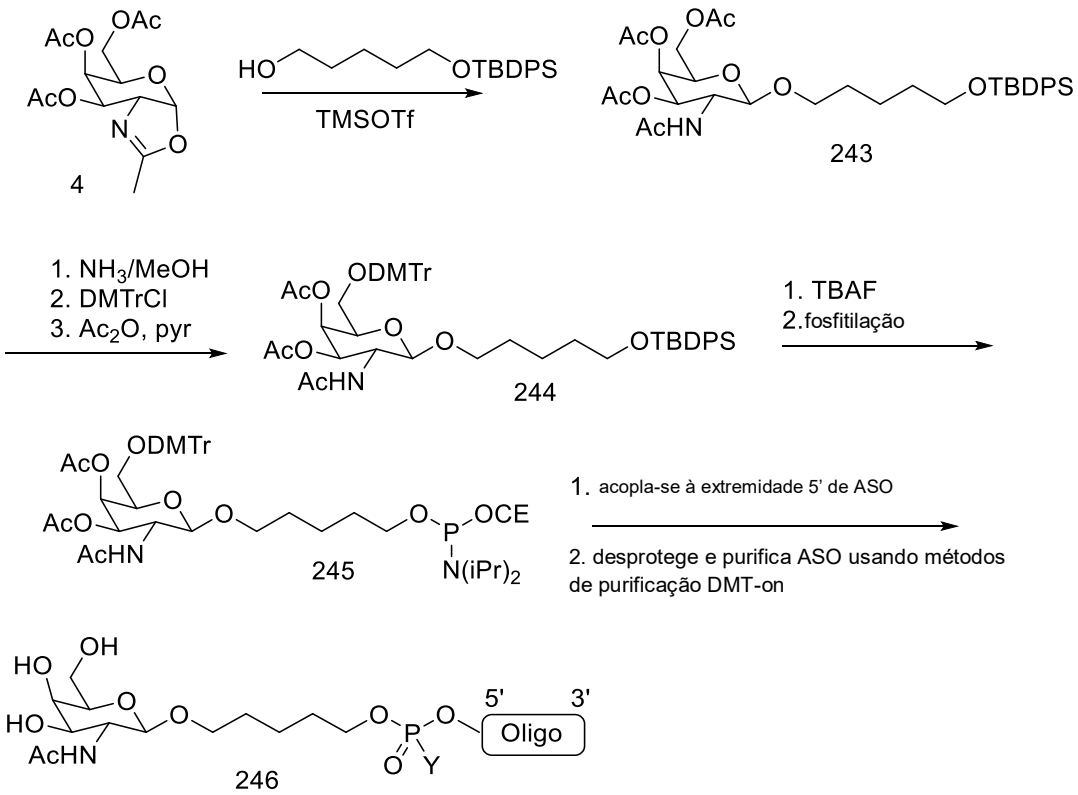


242

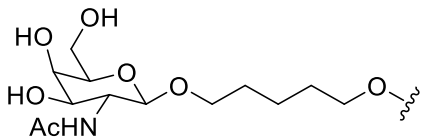
[001192] A parte do agrupamento GalNAc$_1$ (GalNAc$_1$-29$_a$) do grupo de conjugado GalNAc$_1$-29 pode ser combinado com qualquer porção clivável presente no oligonucleotídeo para fornecer uma variedade de grupos conjugados. A estrutura de GalNAc$_1$-29 (GalNAc$_1$-29$_a$-CM) é mostrada abaixo:



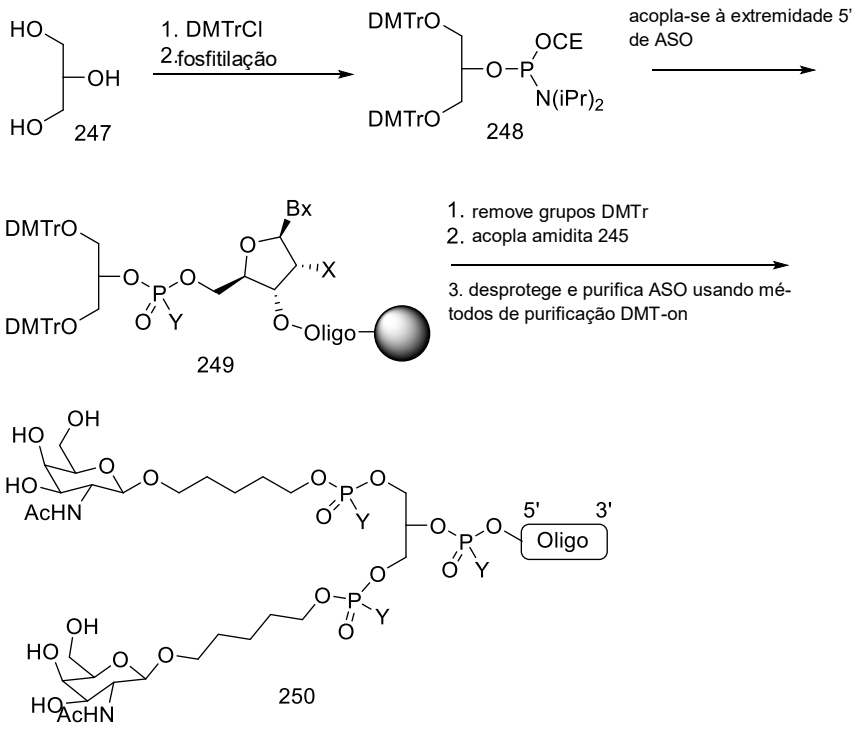
Exemplo 110: Síntese de oligonucleotídeos compreendendo um conjugado de GalNAc1-30



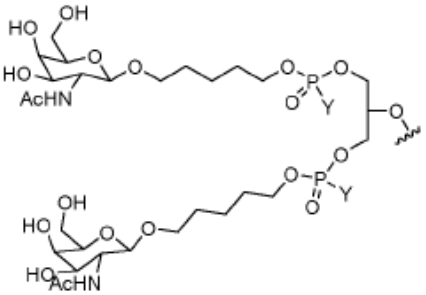
[001193] O oligonucleotídeo 246 compreendendo um grupo de conjugado de GalNAc$_1$-30, em que Y é selecionado de O, S, uma alquila C_1-C_{10} substituída ou não substituída, amina, amina substituída, azido, alquenila ou alquinila, é sintetizado como mostrado acima. A parte do agrupamento GalNAc$_1$ (GalNAc$_1$-30$_a$) do grupo de conjugado GalNAc$_1$-30 pode ser combinado com qualquer porção clivável para fornecer uma variedade de grupos conjugados. Em determinadas modalidades, o símbolo Y é parte da porção clivável. Em determinadas modalidades, Y é parte de uma porção estável, e a porção clivável está presente no oligonucleotídeo. A estrutura de GalNAc$_1$-30$_a$ é mostrada abaixo:



Exemplo 111: Síntese de oligonucleotídeos compreendendo um conjugado de GalNAc2-31 ou GalNAc2-32



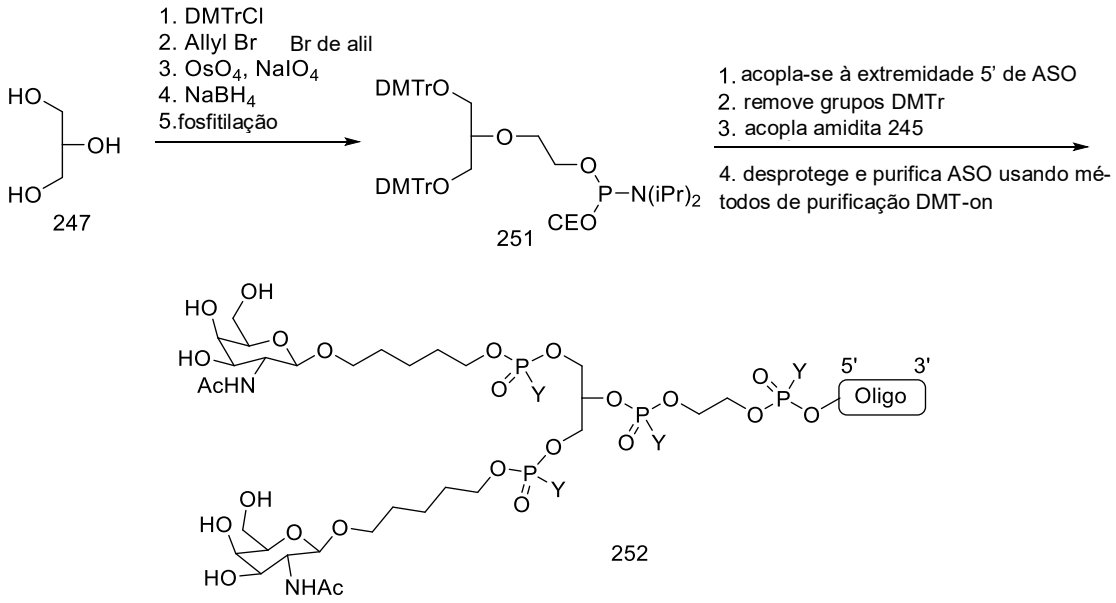
[001194] O oligonucleotídeo 250 compreendendo um grupo de conjugado de $GalNAc_2$-31, em que Y é selecionado de O, S, um alquila C_1-C_{10} substituída ou não substituída, amina, amina substituída, azido, alquenila ou alquinila, é sintetizado como mostrado acima. A parte do



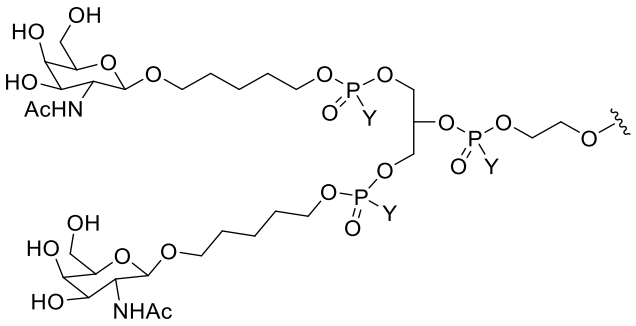
agrupamento $GalNAc_2$ ($GalNAc_2$-31_a) do grupo de conjugado $GalNAc_1$-30 pode ser combinado com qualquer porção clivável para fornecer uma variedade de grupos conjugados. Em determinadas modalidades, o grupo contendo Y diretamente adjacente à extremidade 5' do oligonucleotídeo é parte da porção clivável. Em determinadas modalidades, o grupo contendo Y diretamente adjacente à extremidade 5' do oligonucleotídeo é parte de uma porção estável, e a porção clivável está presente no oligonucleotídeo. A estrutura de $GalNAc_2$-31_a é mostrada

abaixo:

[001195] A síntese de um oligonucleotídeo compreendendo um conjugado de $GalNAc_2$-32 é mostrada abaixo.



[001196] O oligonucleotídeo 252 compreendendo um grupo de conjugado de $GalNAc_2$-32, em que Y é selecionado de O, S, um alquila C_1-C_{10} substituído ou não substituído, amina, amina substituída, azido, alquenila ou alquinila, é sintetizado como mostrado acima. A parte do agrupamento $GalNAc_2$ ($GalNAc_2$-32_a) do grupo de conjugado $GalNAc_2$-32 pode ser combinado com qualquer porção clivável para fornecer uma variedade de grupos conjugados. Em determinadas modalidades, o grupo contendo Y diretamente adjacente à extremidade 5' do oligonucleotídeo é parte da porção clivável. Em determinadas modalidades, o grupo contendo Y diretamente adjacente à extremidade 5' do oligonucleotídeo é parte de uma porção estável, e a porção clivável está presente no oligonucleotídeo. A estrutura de $GalNAc_2$-32_a é mostrada abaixo:



Exemplo 112: Oligonucleotídeo modificados compreendendo um conjugado $_{GalNAc}1$

[001197] Os oligonucleotídeos na Tabela 120 direcionados a SRB-1 foram sintetizados com um grupo de conjugado de $GalNAc_1$ a fim de testar ainda mais a potência dos oligonucleotídeos que compreendem grupos de conjugado que contêm um ligante de GalNAc.

Tabela 120

ISIS No.	Sequência (5' a 3')	Agrupamento GalNAc	CM	SEQ ID NO.
711461	**$GalNAc_1$-$25_{a\text{-}o'}$$A_{do}$** G_{es} $^mC_{es}$ T_{es} T_{es} $^mC_{es}$ A_{ds} G_{ds} T_{ds} $^mC_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} $^mC_{ds}$ T_{ds} T_{es} $^mC_{es}$ $^mC_{es}$ T_{es} T_e	$GalNAc_1$-25_a	A_d	254
711462	**$GalNAc_1$-$25_{a\text{-}o'}$**G_{es} $^mC_{es}$ T_{es} T_{es} $^mC_{es}$ A_{ds} G_{ds} T_{ds} $^mC_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} $^mC_{ds}$ T_{ds} T_{es} $^mC_{es}$ $^mC_{es}$ T_{es} T_e	$GalNAc_1$-25_a	PO	252
711463	**$GalNAc_1$-$25_{a\text{-}o'}$**G_{es} $^mC_{eo}$ T_{eo} T_{eo} $^mC_{eo}$ A_{ds} G_{ds} T_{ds} $^mC_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} $^mC_{ds}$ T_{ds} T_{eo} $^mC_{eo}$ $^mC_{es}$ T_{es} T_e	$GalNAc_1$-25_a	PO	252
711465	**$GalNAc_1$-$26_{a\text{-}o'}$$A_{do}$** G_{es} $^mC_{es}$ T_{es} T_{es} $^mC_{es}$ A_{ds} G_{ds} T_{ds} $^mC_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} $^mC_{ds}$ T_{ds} T_{es} $^mC_{es}$ $^mC_{es}$ T_{es} T_e	$GalNAc_1$-26_a	A_d	254
711466	**$GalNAc_1$-$26_{a\text{-}o'}$**G_{es} $^mC_{es}$ T_{es} T_{es} $^mC_{es}$ A_{ds} G_{ds} T_{ds} $^mC_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} $^mC_{ds}$ T_{ds} T_{es} $^mC_{es}$ $^mC_{es}$ T_{es} T_e	$GalNAc_1$-26_a	PO	252
711467	**$GalNAc_1$-$26_{a\text{-}o'}$**G_{es} $^mC_{eo}$ T_{eo} T_{eo} $^mC_{eo}$ A_{ds} G_{ds} T_{ds} $^mC_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} $^mC_{ds}$ T_{ds} T_{eo} $^mC_{eo}$ $^mC_{es}$ T_{es} T_e	$GalNAc_1$-26_a	PO	252
711468	**$GalNAc_1$-$28_{a\text{-}o'}$$A_{do}$** G_{es} $^mC_{es}$ T_{es} T_{es} $^mC_{es}$ A_{ds} G_{ds} T_{ds} $^mC_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} $^mC_{ds}$ T_{ds} T_{es} $^mC_{es}$ $^mC_{es}$ T_{es} T_e	$GalNAc_1$-28_a	A_d	254
711469	**$GalNAc_1$-$28_{a\text{-}o'}$**G_{es} $^mC_{es}$ T_{es} T_{es} $^mC_{es}$ A_{ds} G_{ds} T_{ds} $^mC_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} $^mC_{ds}$ T_{ds} T_{es} $^mC_{es}$ $^mC_{es}$ T_{es} T_e	$GalNAc_1$-28_a	PO	252
711470	**$GalNAc_1$-$28_{a\text{-}o'}$**G_{es} $^mC_{eo}$ T_{eo} T_{eo} $^mC_{eo}$ A_{ds} G_{ds} T_{ds} $^mC_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} $^mC_{ds}$ T_{ds} T_{eo} $^mC_{eo}$ $^mC_{es}$ T_{es} T_e	$GalNAc_1$-28_a	PO	252
713844	G_{es} $^mC_{es}$ T_{es} T_{es} $^mC_{es}$ A_{ds} G_{ds} T_{ds} $^mC_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} $^mC_{ds}$ T_{ds} T_{es} $^mC_{es}$ $^mC_{es}$ T_{es} $T_{eo'}$-**$GalNAc_1$-27_a**	$GalNAc_1$-27_a	PO	252
713845	G_{es} $^mC_{eo}$ T_{eo} T_{eo} $^mC_{eo}$ A_{ds} G_{ds} T_{ds} $^mC_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} $^mC_{ds}$ T_{ds} T_{eo} $^mC_{eo}$ $^mC_{es}$ T_{es} $T_{eo'}$-**$GalNAc_1$-27_a**	$GalNAc_1$-27_a	PO	252
713846	G_{es} $^mC_{eo}$ T_{eo} T_{eo} $^mC_{eo}$ A_{ds} G_{ds} T_{ds} $^mC_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} $^mC_{ds}$ T_{ds} T_{eo} $^mC_{eo}$ $^mC_{es}$ T_{es} T_{eo} **$A_{do'}$-$GalNAc_1$-27_a**	$GalNAc_1$-27_a	A_d	253
713847	G_{es} $^mC_{es}$ T_{es} T_{es} $^mC_{es}$ A_{ds} G_{ds} T_{ds} $^mC_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} $^mC_{ds}$ T_{ds} T_{es} $^mC_{es}$ $^mC_{es}$ T_{es} $T_{eo'}$-**$GalNAc_1$-29_a**	$GalNAc_1$-29_a	PO	252
713848	G_{es} $^mC_{eo}$ T_{eo} T_{eo} $^mC_{eo}$ A_{ds} G_{ds} T_{ds} $^mC_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} $^mC_{ds}$ T_{ds} T_{eo} $^mC_{eo}$ $^mC_{es}$ T_{es} $T_{eo'}$-**$GalNAc_1$-29_a**	$GalNAc_1$-29_a	PO	252
713849	G_{es} $^mC_{es}$ T_{es} T_{es} $^mC_{es}$ A_{ds} G_{ds} T_{ds} $^mC_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} $^mC_{ds}$ T_{ds} T_{es} $^mC_{es}$ $^mC_{es}$ T_{es} T_{eo} **$A_{do'}$-$GalNAc_1$-29_a**	$GalNAc_1$-29_a	A_d	253
713850	G_{es} $^mC_{eo}$ T_{eo} T_{eo} $^mC_{eo}$ A_{ds} G_{ds} T_{ds} $^mC_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} $^mC_{ds}$ T_{ds} T_{eo} $^mC_{eo}$ $^mC_{es}$ T_{es} T_{eo} **$A_{do'}$-$GalNAc_1$-29_a**	$GalNAc_1$-29_a	A_d	253

Exemplo 113: Projeto e seleção dos compostos antissenso duplicados direcionados à apolipoproteína C-III

[001198] De acordo com a presente invenção, uma série dos ácidos

nucleicos duplicados que compreendem os compostos antissenso da presente invenção e seus complementos são projetados para direcionar-se à apolipoproteína C-III. A sequência da nucleobase do filamento do antissenso do duplicado compreende pelo menos uma porção de um oligonucleotídeo na Tabela 121. As extremidades dos filamentos podem ser modificadas pela adição de ou mais nucleobases naturais ou modificadas para formar uma saliência. O filamento sense do dsRNA é então projetado e sintetizado como o complemento do filamento antissenso e também pode conter modificações ou adições a ambos os terminais. Por exemplo, em uma modalidade, ambos os filamentos do duplicado de dsRNA seriam complementares nas nucleobases centrais, cada um contendo saliências em um ou nos dois terminais.

[001199] Por exemplo, um duplicado compreendendo um filamento antissenso com a sequência CGAGAGGCGGACGGGACCG(SEQ ID NO: 12) e com uma saliência de duas nucleobases de deóxitimidina (dT) teria a seguinte estrutura (Antissenso de SEQ ID NO 13, Complemento de SEQ ID NO: 14):

cgagaggcggacgggaccgTT Filamento do Antissenso (SEQ ID NO: 13)
||||||||||||||||||
TTgctctccgcctgccctggc Complemento (SEQ ID NO: 14)

[001200] Em outra modalidade, um duplicado compreendendo um filamento antissenso com a mesma sequência CGAGAGGCGGACGGGACCG (SEQ ID NO: 12) pode ser preparado com extremidades cegas (nenhuma saliência de filamento simples) conforme mostrado (Antissenso de SEQ ID NO: 15, Complemento de SEQ ID NO: 16):

cgagaggcggacgggaccg Filamento do Antissenso (SEQ ID NO: 15)
|||||||||||||||||||
gctctccgcctgccctggc Complemento (SEQ ID NO: 16)

[001201] Os filamentos de RNA do duplicado podem ser sintetizados pelos métodos divulgados aqui ou comprado na Dharmacon Research

Inc., (Lafayette, CO). Uma vez sintetizados, os filamentos complementares são anelados. Os filamentos simples aliquotados e diluídos a uma concentração de 50 µM. Uma vez diluído, 30 µL 30 de cada filamento é combinado com 15 µL de uma solução de 5X do tampão de anelação. A concentração final de amortecedor mencionado é de 100mM de acetato de potássio, 30 mM de HEPES-KOH de pH 7,4 e acetato de magnésio de 2mM. O volume final é de 75 µL. Esta solução é incubada por 1 minuto a 90°C e então centrifugada por 15 segundos. O tubo é deixado em repouso por 1 hora a 37°C, período durante o qual os duplicados de dsRNA são usados na experimentação. A concentração final do duplicado de dsRNA é de 20 µM. Esta solução pode ser armazenada congelada (- 20°C) e descongelada por até 5 vezes.

[001202] Uma vez preparados, os compostos antissenso duplicados são avaliados quanto à sua capacidade de modular a expressão da apolipoproteína C-III.

[001203] Quando as células atingem 80% de confluência, elas são tratadas com os compostos antissenso duplicados da invenção. Para as células cultivadas em placas de 96 poços, os poços são lavados por uma vez com meio de soro reduzido OPTI-MEM-1™ (Gibco BRL) de 200 µL e então tratados com meio de 130 µL de OPTI-MEM-1™ contendo reagente de LIPOFECTIN™ de 12 µg/mL (Gibco BRL) e então o composto antissenso duplicado desejado a uma concentração final de 200 nM. Após 5 horas do tratamento, o meio é substituído por um meio novo. As células são colhidas 16 horas após o tratamento, período em que o RNA é isolado e a redução alvo é medida por RT-PCR.

Exemplo 114: Inibição de antissenso de expressão da apolipoproteína C-III humana por oligonucleotídeos de fosforotioato quimérico com asas de 2'-MOE e um intervalo deóxi

[001204] De acordo com a presente invenção, uma série de compos-

tos antissenso foram projetados para ser direcionada a diferentes regiões da apolipoproteína C-III RNA humana, utilizando sequências publicadas (nucleotídeos de 6238608 a 6242565 de número de acesso GenBank NT_035088,1, representando uma sequência genômica, incorporada aqui como SEQ ID NO: 3, e o número de acesso GenBank NM_000040,1, incorporado aqui como SEQ ID NO: 1). Os compostos são mostrados na Tabela 121. O "local alvo" indica o primeiro número de nucleotídeo (mais extremo em 5') na sequência alvo específica a que o composto se liga. Todos os compostos na Tabela 121 são oligonucleotídeos quiméricos (gapmers) com 20 nucleotídeos de extensão, compostos de uma região de "intervalo" central consistindo em dez 2'-deoxinucleotídeos, a qual é ladeada em ambos os lados (direções 5' e 3') por "asas" de cinco nucleotídeos. As asas são compostas de *2'-O-(2-metoxietil)nucleotídeos*, também conhecidos como (2'-MOE) nucleotídeos. As ligações internucleosídeos (estrutura) são fosforotioato (P=S) ao longo de todo o oligonucleotídeo. Todos os resíduos da citidina são 5-metilcitidinas. Os compostos foram analisados quanto a seu efeito em níveis humanos de mRNA da apolipoproteína C-III por PCR quantitativo em tempo real, conforme descrito em outros exemplos aqui. Os dados apresentam médias de três experimentos em que células HepG2 foram tratadas com os oligonucleotídeos antissenso da presente invenção. O controle positivo para cada ponto de dado é identificado na tabela pelo número de ID em sequência. Se presente, "N.D." indica "nenhum dado".

Tabela 121 - Inibição de níveis de mRNA da apolipoproteína C-III humana por oligonucleotídeos de fosforotioato quiméricos com asas de 2'-MOE e um intervalo deóxi.

ISIS #	REGIÃO	SEQ ID NO ALVO	LOCAL ALVO	SEQUÊNCIA	% DE INIBIÇÃO	SEQ ID NO	SEQ ID NO DE CONTROLE
167824	5'UTR	3	414	ctggagcagctgcctctagg	79	19	1
167835	Codificação	3	1292	ccctgcatgaagctgagaag	60	20	1
167837	Codificação	1	141	gtgcttcatgtaaccctgca	88	21	1
167846	Codificação	3	1369	tggcctgctgggccacctgg	66	22	1
167848	Codificação	3	3278	tgctccagtagtctttcagg	81	23	1
167851	Codificação	3	3326	tgacctcagggtccaaatcc	41	24	1
304739	5'UTR	3	401	ctctagggatgaactgagca	62	25	1
304740	5'UTR	3	408	cagctgcctctagggatgaa	44	26	1

304741	5'UTR	1	17	ttcctggagcagctgcctct	57	27	1
304742	5'UTR	1	24	acctctgttcctggagcagc	78	28	1
304743	Códon Inicial	1	29	atggcacctctgttcctgga	78	29	1
304744	Códon Inicial	3	1065	gggctgcatggcacctctgt	73	30	1
304745	Codificação	3	1086	ggcaacaacaaggagtaccc	90	31	1
304746	Codificação	3	1090	ggagggcaacaacaaggagt	80	32	1
304747	Codificação	1	87	agctcgggcagaggccagga	49	33	1
304748	Codificação	1	92	tctgaagctcgggcagaggc	72	34	1
304749	Codificação	1	97	cggcctctgaagctcgggca	11	35	1
304750	Codificação	3	1267	catcctcggcctctgaagct	49	36	1
304751	Codificação	3	1273	gggaggcatcctcggcctct	65	37	1
304752	Codificação	3	1278	gagaagggaggcatcctcgg	82	38	1
304753	Codificação	3	1281	gctgagaagggaggcatcct	75	39	1
304754	Codificação	3	1289	tgcatgaagctgagaaggga	74	40	1
304755	Codificação	1	143	gcgtgcttcatgtaaccctg	95	41	1
304756	Codificação	3	1313	ttggtggcgtgcttcatgta	92	42	1
304757	Codificação	3	1328	gcatccttggcggtcttggt	98	43	1
304758	Codificação	3	1334	ctcagtgcatccttggcggt	97	44	1
304759	Codificação	3	1336	tgctcagtgcatccttggcg	93	45	1
304760	Codificação	3	1347	ctcctgcacgctgctcagtg	65	46	1
304761	Codificação	3	1349	gactcctgcacgctgctcag	77	47	1
304762	Codificação	3	1358	gccacctgggactcctgcac	89	48	1
304763	Codificação	1	210	gcccctggcctgctgggcca	71	49	1
304764	Codificação	1	211	agcccctggcctgctgggcc	62	50	1
304765	Codificação	3	3253	gaagccatcggtcacccagc	71	51	1
304766	Codificação	3	3255	ctgaagccatcggtcaccca	85	52	1
304767	Codificação	3	3265	tttcagggaactgaagccat	73	53	1
304768	Codificação	3	3273	cagtagtctttcagggaact	40	54	1
304769	Codificação	3	3283	aacggtgctccagtagtctt	66	55	1
304770	Codificação	3	3287	ccttaacggtgctccagtag	88	56	1
304771	Codificação	3	3295	gaacttgtccttaacggtgc	59	57	1
304772	Codificação	3	3301	ctcagagaacttgtccttaa	88	58	1
304773	Codificação	3	3305	agaactcagagaacttgtcc	75	59	1
304774	Codificação	3	3310	atcccagaactcagagaact	0	60	1
304775	Codificação	3	3320	cagggtccaaatcccagaac	70	61	1
304776	Codificação	3	3332	ttggtctgacctcagggtcc	90	62	1
304777	Codificação	3	3333	gttggtctgacctcagggtc	84	63	1
304778	Codificação	3	3339	gctgaagttggtctgacctc	81	64	1
304779	Codificação	3	3347	cagccacggctgaagttggt	75	65	1
304780	Códon de parada	3	3351	caggcagccacggctgaagt	83	66	1
304781	Códon de parada	3	3361	attgaggtctcaggcagcca	79	67	1
304782	3'UTR	3	3385	tggataggcaggtggacttg	64	68	1
304783	3'UTR	1	369	ctcgcaggatggataggcag	76	69	1
304784	3'UTR	1	374	aggagctcgcaggatggata	58	70	1
304785	3'UTR	1	380	gacccaaggagctcgcagga	73	71	1
304786	3'UTR	1	385	tgcaggacccaaggagctcg	92	72	1
304787	3'UTR	3	3417	tggagattgcaggacccaag	88	73	1
304788	3'UTR	3	3422	agccctggagattgcaggac	69	74	1
304789	3'UTR	3	3425	ggcagccctggagattgcag	76	75	1
304790	3'UTR	3	3445	ccttttaagcaacctacagg	65	76	1
304791	3'UTR	3	3450	ctgtccctttaagcaacct	53	77	1
304792	3'UTR	3	3456	agaatactgtccctttaag	72	78	1
304793	3'UTR	3	3461	cactgagaatactgtccctt	67	79	1
304794	3'UTR	3	3469	taggagagcactgagaatac	59	80	1
304795	3'UTR	3	3472	gggtaggagagcactgagaa	74	81	1
304796	3'UTR	3	3509	aggccagcatgcctggaggg	63	82	1
304797	3'UTR	3	3514	ttgggaggccagcatgcctg	55	83	1
304798	3'UTR	3	3521	agctttattgggaggccagc	90	84	1
304799	3'UTR	3	3526	tgtccagctttattgggagg	85	85	1
304800	3'UTR	3	3528	cttgtccagctttattggga	94	86	1
304801	3'UTR	3	3533	agcttcttgtccagctttat	74	87	1
304802	3'UTR	3	3539	catagcagcttcttgtccag	73	88	1
304803	junção éxon: íntron	3	416	acctggagcagctgcctcta	87	89	1

304804	junção éxon: íntron	3	424	agggcattacctggagcagc	68	90	1
304805	junção éxon: íntron	3	1053	acctctgttcctgcaaggaa	74	91	1
304806	junção éxon: íntron	3	1121	aagtgcttacgggcagaggc	78	92	1
304807	junção éxon: íntron	3	1380	gcgggtgtacctggcctgct	52	93	1
304808	íntron	3	2337	aaccctgttgtgaactgcac	59	94	1
304809	íntron	3	2405	agtgagcaataccgcctgag	80	95	1
304810	íntron	3	2542	cgggcttgaattaggtcagg	56	96	1

[001205] Como mostrado na tabela acima, SEQ ID NOs 19, 20, 21, 22, 23, 25, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 55, 56, 57, 58, 59, 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 e 96 apresentaram pelo menos 45% de inibição da expressão da apolipoproteína humana C-III nessa análise e são preferíveis, portanto. Os SEQ ID NOs mais preferíveis são 75, 86 e 85. As regiões alvo a que essas sequências preferíveis são complementares são referidos aqui como "segmentos alvo preferíveis" e são, portanto, preferíveis para o direcionamento pelos compostos da presente invenção. Esses segmentos preferíveis são mostrados em uma Tabela 123 abaixo. As sequências representam o complemento reverso dos compostos preferíveis do antissenso mostrados na tabela acima. O "local alvo" indica o primeiro número de nucleotídeo (mais extremo em 5') no ácido nucleico alvo a que o oligonucleotídeo se liga. Também apresenta-se na Tabela 123 a espécie em que cada um dos segmentos alvos preferíveis foi encontrado.

Exemplo 115 A inibição de antissenso da expressão da apolipoproteína C-III em ratos por oligonucleotídeos de fosforotioato quimérico com asas 2'MOE e um intervalo deóxi.

[001206] De acordo com a presente invenção, uma segunda série de compostos antissenso foram projetados para ser direcionada a diferentes regiões da apolipoproteína C-III RNA de ratos, utilizando sequências publicadas (número de acesso GenBank L04150,1, incorporado aqui como SEQ ID NO: 11). Os compostos são mostrados na Tabela 2. O "local alvo" indica o primeiro número de nucleotídeo (mais extremo em

5') no ácido nucleico alvo específico a que o composto se liga. Todos os compostos na Tabela 2 são oligonucleotídeos quiméricos (gapmers) com 20 nucleotídeos de extensão, compostos de uma região de "intervalo" central consistindo em dez 2'-deoxinucleotídeos, a qual é ladeada em ambos os lados (direções 5' e 3') por "asas" de cinco nucleotídeos. As asas são compostas de *2'-O-(2-metoxietil) nucleotídeos*, também conhecidos como (2'-MOE)nucleotídeos. As ligações internucleosídeos (estrutura) são fosforotioato (P=S) ao longo de todo o oligonucleotídeo. Todos os resíduos da citidina são 5-metilcitidinas. Os compostos foram analisados quanto a seu efeito em níveis de mRNA da apolipoproteína C-III em ratos por PCR quantitativo em tempo real, conforme descrito em outros exemplos aqui. Os dados apresentam média de três experimentos em que células hepatócitas primárias de ratos foram tratadas com os oligonucleotídeos antissenso da presente invenção. Se presente, "N.D." indica "nenhum dado".

Tabela 122 - Inibição de níveis de mRNA da apolipoproteína C-III em ratos por oligonucleotídeos de fosforotioato quiméricos com asas de 2'-MOE e um intervalo deóxi.

ISIS #	REGIÃO	SEQ ID NO ALVO	LOCAL ALVO	SEQUÊNCIA	% DE INIBIÇÃO	SEQ ID NO
167858	5'UTR	11	1	tagggataaaactgagcagg	47	97
167859	5'UTR	11	21	ctggagtagctagctgcttc	30	98
167860	códon de partida	11	41	gctgcatggcacctacgtac	80	99
167861	Codificação	11	62	ccacagtgaggagcgtccgg	86	100
167862	Codificação	11	88	ggcagatgccaggagagcca	55	101
167863	Codificação	11	104	ctacctcttcagctcgggca	56	102
167864	Codificação	11	121	cagcagcaaggatccctcta	83	103
167865	Codificação	11	131	gcacagagcccagcagcaag	49	104
167867	Codificação	11	215	ccctggccaccgcagctata	67	105
167868	Codificação	11	239	atctgaagtgattgtccatc	11	106
167869	Codificação	11	254	agtagcctttcaggaatctg	57	107
167870	Codificação	11	274	cttgtcagtaaacttgctcc	89	108
167871	Codificação	11	286	gaagccggtgaacttgtcag	55	109
167872	Codificação	11	294	gaatcccagaagccggtgaa	29	110
167873	Codificação	11	299	ggttagaatcccagaagccg	55	111
167874	Codificação	11	319	tggagttggttggtcctcag	79	112
167875	Códon de parada	11	334	tcacgactcaatagctggag	77	113
167877	3'UTR	11	421	cccttaaagcaaccttcagg	71	114
167878	3'UTR	11	441	agacatgagaacatactttc	81	115
167879	3'UTR	11	471	catgtttaggtgagatctag	87	116
167880	3'UTR	11	496	tcttatccagctttattagg	98	117

[001207] Como mostrado na tabela acima, SEQ ID NOs 97, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 107, 108, 109, 111, 112, 113, 114, 115, 116 e

117 demonstraram pelo menos 45% de inibição da expressão da apolipoproteína C-III em ratos nesse experimento e são, portanto, preferíveis. Os SEQ ID NOs mais preferíveis são 117, 116 e 100. As regiões alvo a que essas sequências preferíveis são complementares são referidos aqui como "segmentos alvo preferíveis" e são, portanto, preferíveis para o direcionamento pelos compostos da presente invenção. Esses segmentos preferíveis são mostrados na tabela abaixo. As sequências representam o complemento reverso dos compostos preferíveis do antissenso mostrados na tabela acima. Essas sequências são mostradas para conter timina (T), mas alguém versado na técnica perceberá que a timina (T) é geralmente substituída por uracil (U) nas sequências de RNA. O "local alvo" indica o primeiro número de nucleotídeo (mais extremo em 5') no ácido nucleico alvo a que o oligonucleotídeo se liga. Também apresenta-se na Tabela 3 a espécie em que cada um dos segmentos alvos preferíveis foi encontrado.

Tabela 123 - Sequência e posição dos segmentos alvo preferíveis identificados na apolipoproteína C-III.

ID DO LOCAL	SEQ ID NO ALVO	LOCAL ALVO	SEQUÊNCIA	COMP REV DA SEQ ID	ATIVO EM	SEQ ID NO
82975	3	414	cctagaggcagctgctccag	19	*H. sapiens*	118
82980	3	1292	cttctcagcttcatgcaggg	20	*H. sapiens*	119
82981	1	141	tgcagggttacatgaagcac	21	*H. sapiens*	120
82985	3	1369	ccaggtggcccagcaggcca	22	*H. sapiens*	121
82987	3	3278	cctgaaagactactggagca	23	*H. sapiens*	122
220510	3	401	tgctcagttcatccctagag	25	*H. sapiens*	123
220512	1	17	agaggcagctgctccaggaa	27	*H. sapiens*	124
220513	1	24	gctgctccaggaacagaggt	28	*H. sapiens*	125
220514	1	29	tccaggaacagaggtgccat	29	*H. sapiens*	126
220515	3	1065	acagaggtgccatgcagccc	30	*H. sapiens*	127
220516	3	1086	gggtactccttgttgttgcc	31	*H. sapiens*	128
220517	3	1090	actccttgttgttgccctcc	32	*H. sapiens*	129
220518	1	87	tcctggcctctgcccgagct	33	*H. sapiens*	130
220519	1	92	gcctctgcccgagcttcaga	34	*H. sapiens*	131
220521	3	1267	agcttcagaggccgaggatg	36	*H. sapiens*	132
220522	3	1273	agaggccgaggatgcctccc	37	*H. sapiens*	133
220523	3	1278	ccgaggatgcctcccttctc	38	*H. sapiens*	134
220524	3	1281	aggatgcctcccttctcagc	39	*H. sapiens*	135
220525	3	1289	tcccttctcagcttcatgca	40	*H. sapiens*	136
220526	1	143	cagggttacatgaagcacgc	41	*H. sapiens*	137
220527	3	1313	tacatgaagcacgccaccaa	42	*H. sapiens*	138
220528	3	1328	accaagaccgccaaggatgc	43	*H. sapiens*	139
220529	3	1334	accgccaaggatgcactgag	44	*H. sapiens*	140
220530	3	1336	cgccaaggatgcactgagca	45	*H. sapiens*	141
220531	3	1347	cactgagcagcgtgcaggag	46	*H. sapiens*	142
220532	3	1349	ctgagcagcgtgcaggagtc	47	*H. sapiens*	143
220533	3	1358	gtgcaggagtcccaggtggc	48	*H. sapiens*	144
220534	1	210	tggcccagcaggccaggggc	49	*H. sapiens*	145
220535	1	211	ggcccagcaggccaggggct	50	*H. sapiens*	146

220536	3	3253	gctgggtgaccgatggcttc	51	*H. sapiens*	147
220537	3	3255	tgggtgaccgatggcttcag	52	*H. sapiens*	148
220538	3	3265	atggcttcagttccctgaaa	53	*H. sapiens*	149
220540	3	3283	aagactactggagcaccgtt	55	*H. sapiens*	150
220541	3	3287	ctactggagcaccgttaagg	56	*H. sapiens*	151
220542	3	3295	gcaccgttaaggacaagttc	57	*H. sapiens*	152
220543	3	3301	ttaaggacaagttctctgag	58	*H. sapiens*	153
220544	3	3305	ggacaagttctctgagttct	59	*H. sapiens*	154
220546	3	3320	gttctgggatttggaccctg	61	*H. sapiens*	155
220547	3	3332	ggaccctgaggtcagaccaa	62	*H. sapiens*	156
220548	3	3333	gaccctgaggtcagaccaac	63	*H. sapiens*	157
220549	3	3339	gaggtcagaccaacttcagc	64	*H. sapiens*	158
220550	3	3347	accaacttcagccgtggctg	65	*H. sapiens*	159
220551	3	3351	acttcagccgtggctgcctg	66	*H. sapiens*	160
220552	3	3361	tggctgcctgagacctcaat	67	*H. sapiens*	161
220553	3	3385	caagtccacctgcctatcca	68	*H. sapiens*	162
220554	1	369	ctgcctatccatcctgcgag	69	*H. sapiens*	163
220555	1	374	tatccatcctgcgagctcct	70	*H. sapiens*	164
220556	1	380	tcctgcgagctccttgggtc	71	*H. sapiens*	165
220557	1	385	cgagctccttgggtcctgca	72	*H. sapiens*	166
220558	3	3417	cttgggtcctgcaatctcca	73	*H. sapiens*	167
220559	3	3422	gtcctgcaatctccagggct	74	*H. sapiens*	168
220560	3	3425	ctgcaatctccagggctgcc	75	*H. sapiens*	169
220561	3	3445	cctgtaggttgcttaaaagg	76	*H. sapiens*	170
220562	3	3450	aggttgcttaaaagggacag	77	*H. sapiens*	171
220563	3	3456	cttaaaagggacagtattct	78	*H. sapiens*	172
220564	3	3461	aagggacagtattctcagtg	79	*H. sapiens*	173
220565	3	3469	gtattctcagtgctctccta	80	*H. sapiens*	174
220566	3	3472	ttctcagtgctctcctaccc	81	*H. sapiens*	175
220567	3	3509	ccctccaggcatgctggcct	82	*H. sapiens*	176
220568	3	3514	caggcatgctggcctcccaa	83	*H. sapiens*	177
220569	3	3521	gctggcctcccaataaagct	84	*H. sapiens*	178
220570	3	3526	cctcccaataaagctggaca	85	*H. sapiens*	179
220571	3	3528	tcccaataaagctggacaag	86	*H. sapiens*	180
220572	3	3533	ataaagctggacaagaagct	87	*H. sapiens*	181
220573	3	3539	ctggacaagaagctgctatg	88	*H. sapiens*	182
220574	3	416	tagaggcagctgctccaggt	89	*H. sapiens*	183
220575	3	424	gctgctccaggtaatgccct	90	*H. sapiens*	184
220576	3	1053	ttccttgcaggaacagaggt	91	*H. sapiens*	185
220577	3	1121	gcctctgcccgtaagcactt	92	*H. sapiens*	186
220578	3	1380	agcaggccaggtacacccgc	93	*H. sapiens*	187
220579	3	2337	gtgcagttcacaacagggtt	94	*H. sapiens*	188
220580	3	2405	ctcaggcggtattgctcact	95	*H. sapiens*	189
220581	3	2542	cctgacctaattcaagcccg	96	*H. sapiens*	190
82997	11	1	cctgctcagttttatcccta	97	*M. musculus*	191
82999	11	41	gtacgtaggtgccatgcagc	99	*M. musculus*	192
83000	11	62	ccggacgctcctcactgtgg	100	*M. musculus*	193
83001	11	88	tggctctcctggcatctgcc	101	*M. musculus*	194
83002	11	104	tgcccgagctgaagaggtag	102	*M. musculus*	195
83003	11	121	tagagggatccttgctgctg	103	*M. musculus*	196
83004	11	131	cttgctgctgggctctgtgc	104	*M. musculus*	197
83006	11	215	tatagctgcggtggccaggg	105	*M. musculus*	198
83008	11	254	cagattcctgaaaggctact	107	*M. musculus*	199
83009	11	274	ggagcaagtttactgacaag	108	*M. musculus*	200
83010	11	286	ctgacaagttcaccggcttc	109	*M. musculus*	201
83012	11	299	cggcttctgggattctaacc	111	*M. musculus*	202
83013	11	319	ctgaggaccaaccaactcca	112	*M. musculus*	203
83014	11	334	ctccagctattgagtcgtga	113	*M. musculus*	204
83016	11	421	cctgaaggttgctttaaggg	114	*M. musculus*	205
83017	11	441	gaaagtatgttctcatgtct	115	*M. musculus*	206
83018	11	471	ctagatctcacctaaacatg	116	*M. musculus*	207
83019	11	496	cctaataaagctggataaga	117	*M. musculus*	208

[001208] Visto que esses "segmentos alvo preferíveis" foram encontrados por experimento para serem abertos a, e acessíveis para, hibridização com os compostos antissenso da presente invenção, alguém versado na técnica reconhecerá ou estará apto a verificar, utilizando

nada além do que experimentos rotineiros, outras modalidades da invenção que abarcam outros compostos que hibidrizam especificamente para esses segmentos alvos preferíveis e, consequentemente, inibem a expressão da apolipoproteína C-III.

[001209] De acordo com a presente invenção, os compostos antissenso incluem compostos oligoméricos antissenso, oligonucleotídeos antissenso, ribozimas, oligonucleotídeos de sequência de guia externa (EGS), dispositivos de colagem alternados, iniciadores, sondas e outros compostos oligoméricos curtos que hibridizem pelo menos uma porção do ácido nucleico alvo.

Exemplo 116: Inibição de antissenso de expressão da apolipoproteína C-III humana por oligonucleotídeos de fosforotioato quimérico com asas de 2'-MOE e um intervalo deóxi - compostos antissenso adicionais

[001210] De acordo com a presente invenção, uma série de compostos antissenso foram projetados para serem direcionados a diferentes regiões da apolipoproteína C-III RNA humana, utilizando sequências publicadas (nucleotídeos de 6238608 a 6242565 da sequência com número de acesso GenBank NT_035088,1, representando uma sequência genômica, incorporada aqui como SEQ ID NO: 3, e o número de acesso GenBank NM_000040,1, incorporado aqui como SEQ ID NO: 1). Os compostos são mostrados na Tabela 124. O "local alvo" indica o primeiro número de nucleotídeo (mais extremo em 5') na sequência alvo específica a que o composto se liga. Todos os compostos na Tabela 124 são oligonucleotídeos quiméricos (gapmers) com 20 nucleotídeos de extensão, compostos de uma região de "intervalo" central consistindo em dez 2'-deoxinucleotídeos, a qual é ladeada em ambos os lados (direções 5' e 3') por "asas" de cinco nucleotídeos. As asas são compostas de *2'-O-(2-metoxietil)nucleotídeos*, também conhecidos como (2'-

MOE)nucleotídeos. As ligações internucleosídeos (estrutura) são fosforotioato (P=S) ao longo de todo o oligonucleotídeo. Todos os resíduos da citidina são 5-metilcitidinas. Os compostos foram analisados quanto a seu efeito em níveis humanos de mRNA da apolipoproteína C-III por PCR quantitativo em tempo real, conforme descrito em outros exemplos aqui. Os dados representam médias de três experiências em que

[001211] Células HepG2 foram tratadas com oligonucleotídeos antissenso da presente invenção. Se presente, "N.D." indica "nenhum dado".

Tabela 124 - Inibição de níveis de mRNA da apolipoproteína C-III humana por oligonucleotídeos de fosforotioato quiméricos com asas de 2'-MOE e um intervalo deóxi.

ISIS #	SEQ ID NO ALVO	LOCAL ALVO	SEQUÊNCIA	% DE INIBIÇÃO	SEQ ID NO
167826	3	1063	gctgcatggcacctctgttc	0	209
167828	3	1110	ggcagaggccaggagcgcca	0	210
167830	1	91	ctgaagctcgggcagaggcc	9	211
167832	1	101	tcctcggcctctgaagctcg	0	212
167840	3	1315	tcttggtggcgtgcttcatg	0	213
167842	3	1335	gctcagtgcatccttggcgg	38	214
167844	3	1345	cctgcacgctgctcagtgca	28	215
167847	3	3256	actgaagccatcggtcaccc	0	216
167850	3	3306	cagaactcagagaacttgtc	0	217
167852	3	3336	gaagttggtctgacctcagg	0	218
167853	3	3420	ccctggagattgcaggaccc	0	219
167854	3	3426	gggcagccctggagattgca	22	220
167855	3	3446	ccctttaagcaacctacag	27	221

Exemplo 117: Inibição antissenso de expressão da apolipoproteína C-III humana por oligonucleotídeos de fosforotioato quimérico com asas de 2'-MOE e um intervalo deóxi: estudo de resposta à dose em células HepG2

[001212] De acordo com a presente invenção, um subconjunto dos oligonucleotídeos antissenso dos Exemplos 15 e 17 foi investigado adicionalmente em um estudo de resposta a dose. Doses do tratamento de ISIS 167842 (SEQ ID NO: 214), ISIS 167844 (SEQ ID NO: 215), ISIS 167846 (SEQ ID NO: 22), ISIS 167837 (SEQ ID NO: 21), ISIS 304789 (SEQ ID NO: 75), ISIS 304799 (SEQ ID NO: 85) e ISIS 304800 (SEQ ID: 86) eram de 50, 150 e 300 nM. Os compostos foram analisados

quanto a seu efeito em níveis humanos de mRNA da apolipoproteína C-III em células de HepG2 por PCR quantitativo em tempo real, conforme descrito em outros exemplos aqui. Os dados representam médias de duas experiências e são mostrados na tabela abaixo.

Tabela 125 - Inibição de níveis de mRNA da apolipoproteína C-III humana por oligonucleotídeos de fosforotioato quiméricos com asas de 2'-MOE e um intervalo deóxi.

		Dose do oligonucleotídeo		
ISIS #	SEQ ID NO	50 nM	150 nM	300 nM
		Inibição Percentual		
167842	214	88	77	92
167844	215	86	86	84
167846	22	79	80	79
167837	21	83	86	84
304789	75	81	91	92
304799	85	82	93	88
304800	86	80	86	91

[001213] Esses dados demonstram que a expressão da apolipoproteína C-III é inibida de uma maneira dependende de dose a partir do tratamento das células com os compostos antissenso direcionados à apolipoproteína C-III. Esses compostos foram analisados adicionalmente em células Hep3B quanto à sua capacidade de diminuir os níveis de mRNA em células Hep3B e foi determinado que ISIS167842 e 167837 inibiram a expressão da apolipoproteína C-III de uma maneira dependende de dose também nessa linha celular.

Exemplo 118: Inibição de antissenso da apolipoproteína C-III em hepatócitos primários de macaco Cynomolgus

[001214] Em outra modalidade, os compostos antissenso direcionados à apolipoproteína C-III humana foram testados para seus efeitos na expressão da apolipoproteína C-III em hepatócitos primários de macacos Cynomolgus. Os hepatócitos de macacos Cynomolgus primários p´re-plaqueados foram comprados da InVitro Technologies (Baltimore, MD). As células foram cultivadas em DMEM rica em glicose (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) complementada com 10% de soro bo-

vino fetal (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA), 100 unidades/mL e 100 µg/mL de estreptomicina (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA).

[001215] As células numa densidade de 80.000 células por poço numa placa de 24 poços foram tratadas com 10, 50, 150 e 300 nM de ISIS 304789 (SEQ ID NO: 75), ISIS 304799 (SEQ ID NO: 85) ou ISIS 304800 (SEQ ID NO: 86). ISIS 113529 (CTCTTACTGTGCTGTGGACA, SEQ ID NO: 17) serviu como do oligonucleotídeo controle. ISIS 113529 é um oligonucleotídeo quimérico ("gapmer") com 20 nucleotídeos de extensão, compostos de uma região de "lacuna" central consistindo em dez 2'-desoxinucleotídeos, a qual é flanqueada em ambos os lados (direções 5' e 3') por "asas" de cinco nucleotídeos. As asas são compostas de 2’-O-(2-metoxietil)nucleotídeos, também conhecidos como (2’-MOE)nucleotídeos. As ligações internucleosídeos (estrutura) são fosforotioato (P=S) ao longo de todo o oligonucleotídeo. Todos os resíduos da citidina são 5-metilcitidinas.

[001216] Após 24 horas de tratamento com os oligonucleotídeos antissenso, o mRNA da apolipoproteína C-III foi medido por PCR em tempo real, como descrito pelos outros exemplo aqui, usando os iniciadores e a sonda projetada para a sequência da apolipoproteína C-III humana (iniciador forward: TCAGCTTCATGCAGGGTTACAT (SEQ ID NO: 5) iniciador reverse: ACGCTGCTCAGTGCATCCT (SEQ ID NO: 6) e a sonda de PCR foi FAM-AAGCACGCCACCAAGACCGCC-TAMRA (SEQ ID NO: 7)) para medir o mRNA da apolipoproteína C-III de macaco Cynomolgous. Os iniciadores e a sonda projetados para o GAPDH humano (iniciador forward: GAAGGTGAAGGTCGGAGTC (SEQ ID NO: 8) iniciador reverse: GAAGATGGTGATGGGATTTC (SEQ ID NO: 9) e a sonda de PCR foi 5' JOE-CAAGCTTCCCGTTCTCAGCC- TAMRA 3' (SEQ ID NO: 10)) foram usados para medir a expressão de mRNA de

GAPDH de macacos Cynomolgus para fins de normalização da quantidades alvo do gene obtidas pelo PCR em tempo real. As células não tratadas serviram como o controle aos quais os dados foram normalizados. Os dados são a média dos três experimentos e são apresentados a tabela abaixo.

Tabela 126 - Inibição de antissenso da apolipoproteína C-III em hepatócitos primários de macaco Cynomolgus

		Dose do oligonucleotídeo			
ISIS #	SEQ ID NO	10 nM	50 nM	150 nM	300 nM
		% de inibição			
304789	75	0	7	1	55
304799	85	34	60	66	48
304800	86	9	53	59	57
113529	222	N.D.	N.D.	0	0

Exemplo 119: Sequência da apolipoproteína C-III de macaco Cynomolgus

[001217] Em outra modalidade, uma parte do gene da apolipoproteína C-III de macaco Cynomolgus foi sequenciada. As posições 8 a 476 da sequência de mRNA da apolipoproteína C-III humana (incorporada em sua totalidade aqui como SEQ ID NO: 1) contém o segmento alvo no qual ISIS 304789 se hibridiza. A região correspodente do mRNA da apolipoproteína C-III de macao Cynomolgus foi sequenciada. O RNA foi isolado e purificado a partir de hepatócitos de macaco Cynomolgus primários (InVitro Technologies, Gaithersburg, MD) e foi submetido a uma reação da transcriptase reversa (kit da Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). o cDNA resultante foi o substrato para 40 ciclos de amplificação por PCR, usando iniciadores 5' e 3' projetados para as posições 8 e 476, respectivamente, do mRNA da apolipoproteína C-III humana (Amplitaq PCR kit, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). Após a purificação em gel do fragmento de 468 bp resultante, as reações de sequenciamento forward e reverse para cada produto foram realizadas por Retrogen (San Diego, CA). Esta sequência de macaco Cynomolgus

está incorporada aqui como SEQ ID NO: 223 e é 92% idêntica às posições 8 a 476 do mRNA da apolipoproteína C-III humana.

Exemplo 120: Oligonucleotídeo de fosforotioato quimérico tendo asas de 2’-MOE e uma lacuna desóxi, direcionada à apolipoproteína C-III de macaco Cynomolgus

[001218] Em outra modalidade, a sequência da apoliproteína C-III de macaco Cynomolgus incorporada aqui como SEQ ID NO: 223 foi usada para projetar um oligonucleotídeo antissenso tendo 100% de complementariedade ao mRNA da apolipoproteína de Cynomolgus ISIS 340340 (GGCAGCCCTGGAGGCTGCAG; incorporada aqui como SEQ ID NO: 18) que se direciona ao nucleotídeo 397 da SEQ ID NO: 223, dentro de uma região correspondente à 3’ UTR da apolipoproteína C-III humana na qual ISIS 304789 se hibridiza. ISIS 340340 é um oligonucleotídeo quimérico ("gapmer") com 20 nucleotídeos de extensão, compostos de uma região de "lacuna" central consistindo em 2'-desoxinucleotídeos, a qual é flanqueada em ambos os lados (direções 5' e 3') por "asas" de 5 nucleotídeos. As asas são compostas de nucleotídeos 2’metoxietil (2'-MOE). As ligações internucleosídeos (estrutura principal) são o fosforotioato (P=S) ao longo de todo o oligonucleotídeo. Todos os resíduos da citidina são 5-metilcitidinas.

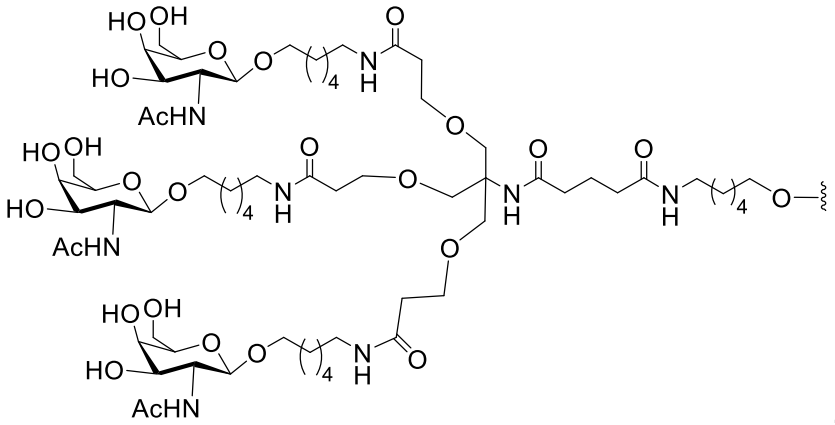
REIVINDICAÇÕES

1. Composto, caracterizado pelo fato de que compreende um oligonucleotídeo modificado e um grupo conjugado,

em que o oligonucleotídeo modificado consiste em 20 nucleosídeos ligados e possui uma sequência de nucleobase compreendendo 20 nucleobases contíguas complementares a uma parte do comprimento equivalente de nucleobases 3533 a 3552 de SEQ ID NO: 3,

em que a sequência de nucleobase do oligonucleotídeo modificado é 100% complementar à SEQ ID NO: 3, e

em que o grupo conjugado compreende:



.

2. Composto, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que:

(i) o oligonucleotídeo modificado compreende pelo menos um açúcar modificado, em que opcionalmente: (a) pelo menos um açúcar modificado é um açúcar bicíclico, opcionalmente uma etila restringida ou um açúcar bicíclico tendo uma ponte de 4'-$(CH_2)_n$-O-2', em que n é 1 ou 2, ou (b) pelo menos um açúcar modificado compreende uma 2'-O-metoxietila, ou (c) pelo menos um nucleosídeo no oligonucleotídeo modificado é um 3'-flúor-HNA,

(ii) pelo menos um nucleosídeo compreende uma nucleobase modificada, opcionalmente em que a nucleobase modificada é uma 5-metilcitosina, e/ou

(iii) o oligonucleotídeo modificado compreende pelo menos

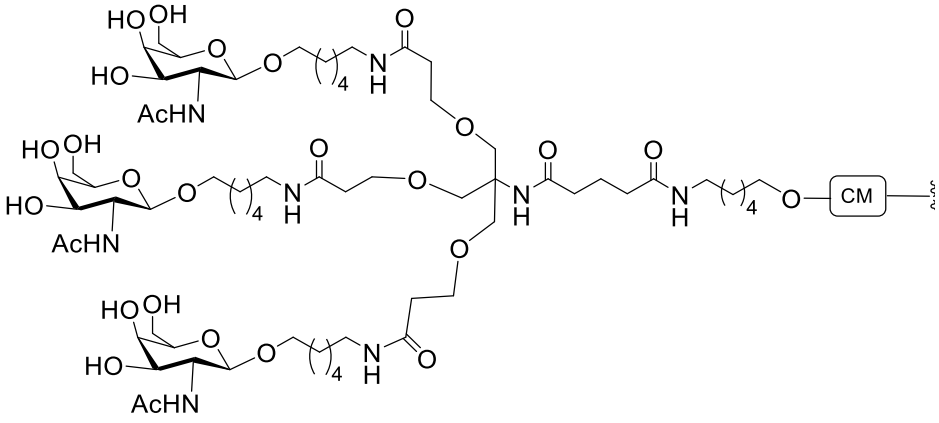
uma ligação de internucleosídeo modificado, em que opcionalmente a ligação de internucleosídeo modificado é uma ligação de internucleosídeo fosforotioato.

3. Composto, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o oligonucleotídeo modificado é de fita única.

4. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que o grupo conjugado está ligado ao oligonucleotídeo modificado na extremidade 5’ do oligonucleotídeo modificado.

5. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que o grupo conjugado está ligado ao oligonucleotídeo modificado na extremidade 3’ do oligonucleotídeo modificado.

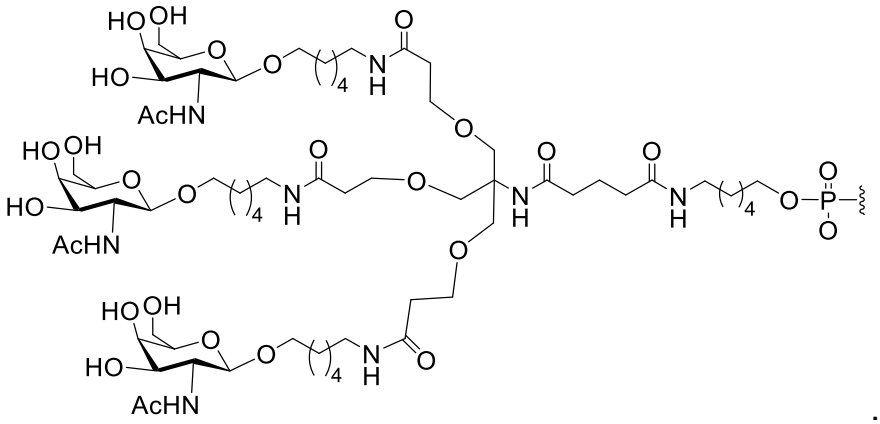
6. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que o grupo conjugado compreende:



;

em que a “porção clivável" (CM) é a uma ligação ou grupo que é capaz de ser quebrado em condições fisiológicas.

7. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que o grupo conjugado compreende:



8. Composto de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o oligonucleotídeo modificado compreende:

um segmento de intervalo consistindo em desoxinucleosídeos ligados;

um segmento de asa 5' consistindo em nucleosídeos ligados;

um segmento de asa 3' consistindo em nucleosídeos ligados;

em que o segmento de intervalo está posicionado entre o segmento de asa 5' e o segmento de asa 3' e em que cada nucleosídeo de cada segmento de asa compreende um açúcar modificado.

9. Composto, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o oligonucleotídeo modificado compreende:

um segmento de intervalo constituído por dez desoxinucleosídeos ligados;

um segmento de asa 5' constituído por cinco nucleosídeos ligados;

um segmento de asa 3' constituído por cinco nucleosídeos ligados;

em que o segmento de intervalo é posicionado entre o segmento de asa 5' e o segmento de asa 3', em que cada nucleosídeo de cada segmento de asa compreende um açúcar 2'-O-metoxietila, e em que cada resíduo de citosina é uma 5-metilcitosina.

10. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindica-

ções 1 a 9, caracterizado pelo fato de que cada ligação no internucleotídeo do oligonucleotídeo modificado é uma ligação de fosforotioato.

11. Composto, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o oligonucleotídeo modificado consiste em 20 nucleosídeos ligados com uma sequência de nucleobase de SEQ ID NO: 87, em que o oligonucleotídeo modificado compreende:

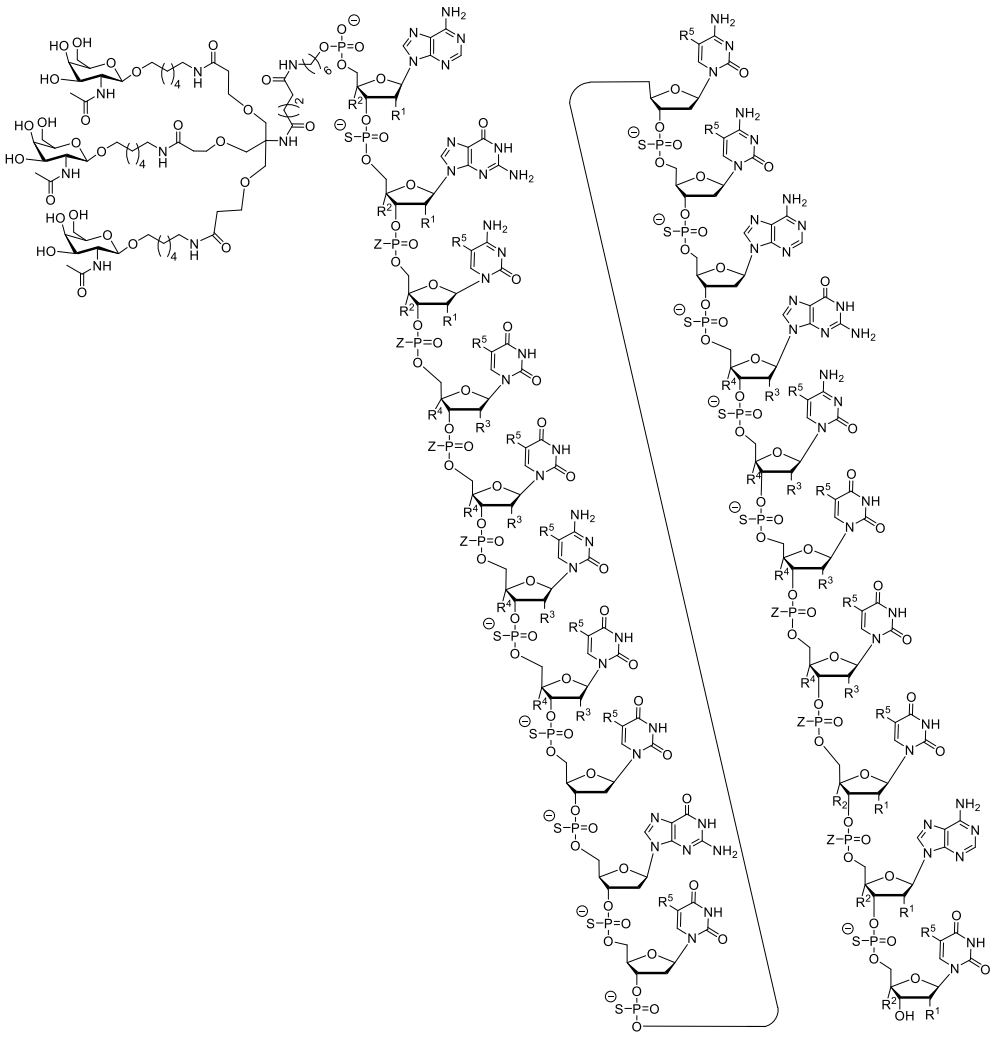
um segmento de intervalo constituído por dez desoxinucleosídeos ligados;

um segmento de asa 5' constituído por cinco nucleosídeos ligados;

um segmento de asa 3' constituído por cinco nucleosídeos ligados;

em que um segmento de intervalo é posicionado entre o segmento de asa 5' e o segmento de asa 3'; em que cada nucleosídeo de cada segmento de asa compreende um açúcar 2'-O-metoxietil, em que cada ligação internucleosídica é uma ligação de fosforotioato e em que cada resíduo de citosina é uma 5-metilcitosina.

12. Composto, caracterizado pelo fato de que apresenta a fórmula:



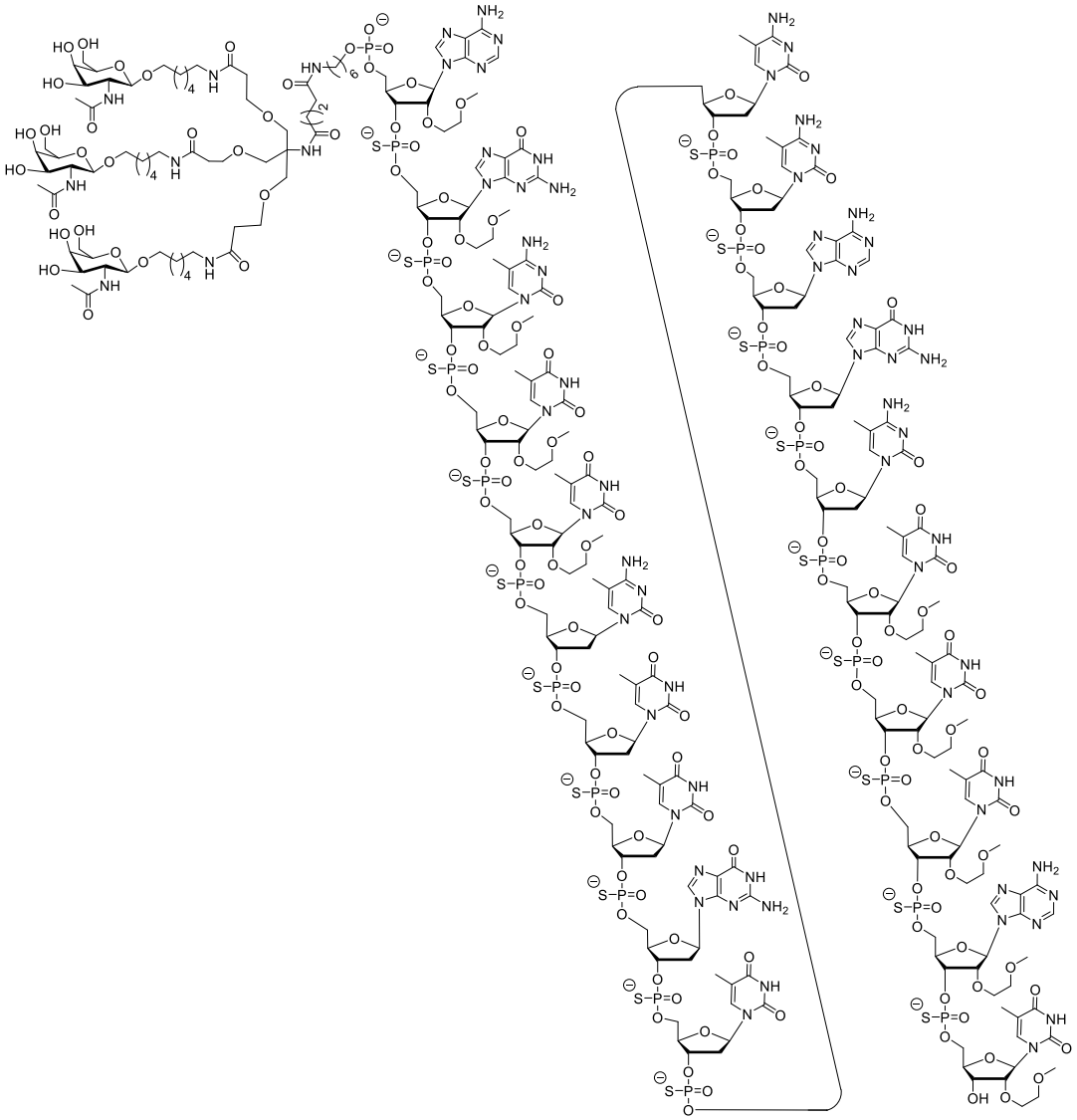
em que R^1 é $-OCH_2CH_2OCH_3$ (MOE) e R^2 é H; ou R^1 e R^2 juntos formam uma ponte, em que R^1 é -O- e R^2 é $-CH_2-$, $-CH(CH_3)-$, ou $-CH_2CH_2-$, e R^1 e R^2 estão diretamente conectados de modo que a ponte resultante seja selecionada a partir de: $-O-CH_2-$, $-O-CH(CH_3)-$, e $-O-CH_2CH_2-$;

e para cada par de R^3 e R^4 no mesmo anel, independentemente para cada anel: ou R^3 é selecionado de H e $-OCH_2CH_2OCH_3$ e R^4 é H; ou R^3 e R^4, juntos, formam uma ponte, em que R^3 é -O-, e R^4 é $-CH_2-$, $-CH(CH_3)-$, ou $-CH_2CH_2-$ e R^3 e R^4 estão diretamente conectados, tal que a ponte resultante é selecionada dentre: $-O-CH_2-$, $-O-CH(CH_3)-$, e $-O-CH_2CH_2-$; e

R^5 seja selecionado de H e $-CH_3$; e

Z seja selecionado de S^- e O^-.

13. Composto, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que tem a fórmula:



14. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, caracterizado pelo fato de que está em uma forma de sal, opcionalmente, em que o composto está na forma de um sal de sódio e/ou sal de potássio.

15. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende o composto, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 14, e um veículo ou diluente farmaceuticamente aceitável.

16. Uso de um composto, como definido em qualquer uma

das reivindicações 1 a 14, ou uma composição, como definida na reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que é na preparação de um medicamento para tratar, prevenir ou melhorar uma doença ou condição cardiovascular, metabólica e/ou inflamatória.

17. Uso de um composto, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 14, ou uma composição, como definida na reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que é na preparação de um medicamento para tratar, prevenir, ou melhorar a progressão de hipertrigliceridemia, FCS, pancreatite, diabetes ou dislipidemia.