



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

(21) BR 112019000061-5 A2



(22) Data do Depósito: 05/07/2017

(43) Data da Publicação Nacional: 26/11/2019

(54) **Título:** COMUTAÇÃO E MODULAÇÃO DE SPLICING DE PRÉ-MRNA COMPREENDENDO PORÇÕES DE ARCABOUÇO BICÍCLICO, COM CARACTERÍSTICAS MELHORADAS PARA O TRATAMENTO DE DISTÚRBIOS GENÉTICOS

(51) **Int. Cl.:** C12N 15/113; A61K 31/712; A61K 31/7125; A61P 21/00.

(30) **Prioridade Unionista:** 05/07/2016 EP 16177973.1.

(71) **Depositante(es):** BIOMARIN TECHNOLOGIES B.V..

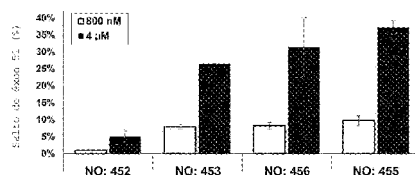
(72) **Inventor(es):** JUDITH CHRISTINA THEODORA VAN DEUTEKOM; PETER CHRISTIAN DE VISSER.

(86) **Pedido PCT:** PCT EP2017066845 de 05/07/2017

(87) **Publicação PCT:** WO 2018/007475 de 11/01/2018

(85) **Data da Fase Nacional:** 03/01/2019

(57) **Resumo:** A presente invenção fornece oligonucleotídeos de comutação de splicing antissentido com características melhoradas que intensificam a aplicabilidade clínica para tratamento, melhoria, prevenção e/ou atraso de distúrbios neuromusculares, tal como DMD.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para:
"COMUTAÇÃO E MODULAÇÃO DE SPLICING DE PRÉ-MRNA
COMPREENDENDO PORÇÕES DE ARCABOUÇO BICÍCLICO, COM
CARACTERÍSTICAS MELHORADAS PARA O TRATAMENTO DE DISTÚRBIOS
GENÉTICOS"

Campo

[001] A invenção refere-se ao campo de oligonucleotídeos antissentido, mais especificamente, oligonucleotídeos de comutação de splicing para o tratamento de distúrbios genéticos, mais especificamente distúrbios neuromusculares. A invenção refere-se, em particular, ao uso de oligonucleotídeos com características melhoradas que intensificam a aplicabilidade clínica, como aqui definido.

Fundamentos da invenção

[002] Os oligonucleotídeos antissentido (AONs) estão em desenvolvimento (pré)clínico para muitas doenças e condições, incluindo câncer, condições inflamatórias, doenças cardiovasculares e distúrbios neurodegenerativos e neuromusculares. Seu mecanismo de ação é direcionado a várias direções, tal como degradação mediada por RNaseH do RNA alvo no núcleo ou citoplasma, na modulação de splicing (inclusão ou salto de éxon) no núcleo, ou na inibição da translação por impedimento estérico da ligação da subunidade ribossômica no citoplasma. Os oligonucleotídeos

de modulação de splicing ou comutação de splicing (SSOs) foram primeiro descritos para correção de splicing aberrante em pré-mRNAs de β -globina humana (Dominski e Kole, 1993), e estão atualmente a ser estudados para uma variedade de distúrbios genéticos incluindo, mas não limitado a, fibrose cística (gene CFTR, Friedman *et al.*, 1999), câncer de mama (gene BRCA1, Uchikawa *et al.*, 2007), câncer de próstata (gene FOLH1, Williams *et al.*, 2006), doenças inflamatórias (genes IL-5R α e MyD88, Karras *et al.*, 2001, Vickers *et al.*, 2006), albinismo ocular tipo 1 (gene OA1, Vetrini *et al.*, 2006), ataxia telangiectasia (gene ATM, Du *et al.*, 2007), síndrome do carcinoma basocelular nevóide (gene PTCH1, Uchikawa *et al.*, 2007), acidemia metilmalônica (gene MUT, Rincon *et al.*, 2007), trabalho de parto prematuro (gene COX-2, Tyson-Capper *et al.*, 2006), aterosclerose (gene APOB, Khoo *et al.*, 2007), acidemia propiônica (genes PCCA, PCCB, Rincon *et al.*, 2007), leucemia (genes c-myc e WT1, Renshaw *et al.*, 2004, Giles *et al.*, 1999), epidermólise bolhosa distrófica (gene COL7A1, Goto *et al.*, 2006), hipercolesterolemia familiar (gene APOB, Disterer *et al.*, 2013), neovascularização coroidal induzida por laser e rejeição de enxerto de córnea (gene KDR, Uehara *et al.*, 2013), cardiomiopatia hipertrófica (gene MYBPC3, Gedicke-Hornung *et al.*, 2013), síndrome de Usher (gene USH1C, Lentz *et al.*, 2013),

distrofia muscular congênita tipo Fukuyama (gene FKTN, Taniguchi-Ikeda *et al.*, 2011), neovascularização coroidal induzida por laser (gene FLT1, Owen *et al.*, 2012), câncer (genes STAT3 e bcl-X, Zammarchi *et al.*, 2011, Mercatante *et al.*, 2002) e progéria de Hutchinson-Gilford (gene LMNA, Osorio *et al.*, 2011), miopatia de Miyoshi (gene DYSF, Wein *et al.*, 2010), ataxia espinocerebelar tipo 1 (gene ATXN1, Gao *et al.*, 2008), doença de Alzheimer/taupatias FTDP-17 (gene MAPT, Peacey *et al.*, 2012), distrofia miotônica (gene CLC1, Wheeler *et al.*, 2007) e doença de Huntington (Evers *et al.*, 2014). No entanto, os AONs com comutação de splicing progrediram o mais longe no tratamento dos distúrbios neuromusculares de distrofia muscular de Duchenne (DMD), uma distrofia muscular espinhal (tipo de atrofia muscular espinhal (SMA)).

[003] A distrofia muscular de Duchenne (DMD) e a distrofia muscular de Becker (BMD) são as formas mais comuns de distrofia muscular na infância. A DMD é um distúrbio neuromuscular severo e letal que resulta na dependência do arcabouço para cadeira de rodas antes dos 12 anos de idade, e os pacientes geralmente morrem antes dos 30 anos devido a insuficiência respiratória ou cardíaca. É causada pela leitura de eliminações de mudança de quadro (~67%) ou duplicações (~7%) de um ou mais éxons, ou por mutações pontuais (~25%) no gene de *DMD* de 2,24 Mb,

resultando na ausência de distrofina funcional. A BDM também é causada por mutações no gene de *DMD*, mas elas mantêm a fase de leitura aberta, produzem proteínas distrofinas semifuncionais, e resultam em um fenótipo tipicamente muito mais suave e um maior tempo de vida. Durante a última década, a modificação específica do splicing de modo a restaurar o fase de leitura rompido do transcrito surgiu como uma terapia promissora para a DMD (van Ommen *et al.*, 2008; Yokota *et al.*, 2007; van Deutekom *et al.*, 2007; Goemans *et al.*, 2011; Voit *et al.*, 2014; Cirak *et al.*, 2011). Usando oligonucleotídeos antissentido de comutação de splicing altamente específicos de sequências (AONs) que se ligam ao éxon flanqueando ou contendo a mutação e que interferem com os seus sinais de splicing, o salto desse éxon pode ser induzido durante o splicing do pré-mRNAs de DMD. Apesar do transcrito truncado resultante, a fase de leitura aberta é restaurada e uma proteína é produzida que é semelhante aos encontrados em pacientes com BMD. O salto do éxon induzido por AON fornece uma abordagem terapêutica específica para mutação e, portanto, personalizada para pacientes com DMD. Como a maioria das mutações se agrupa em torno dos éxons 45 a 55, o salto de um éxon específico pode ser terapêutico para muitos pacientes com mutações diferentes. O salto do éxon 51 se aplica ao maior subconjunto de pacientes (-13%),

incluindo aqueles com eliminações de éxons 45 a 50, 48 a 50, 50 ou 52. Os AONs aplicados são quimicamente modificados para resistir a endonucleases, exonucleases e RNaseH, e para promover a ligação do RNA e a estabilidade do duplex. Diferentes químicas da AON estão atualmente sendo exploradas para induzir o salto do éxon corretivo para DMD, incluindo RNA 2'-O-metil fosforotioato (20MePS; Voit *et al.*, 2014), morfolino fosforodiamidato (PMO; Cirak *et al.*, 2011), DNA triciclo (tcDNA; Goyenvalle *et al.*, 2015) e ácido nucleico peptídico (PNA; Gao *et al.*, 2015). Embora os AONs não sejam normalmente absorvidos por fibras musculares saudáveis, a deficiência de distrofina na DMD e a patologia resultante, caracterizadas por células satélites ativadas e membranas de fibras danificadas e, portanto, mais permeáveis, na verdade facilitam uma melhor captação. Em estudos no modelo de camundongo *mdx* deficiente em distrofina, os oligonucleotídeos de RNA 2'-O-metil fosforotioato realmente demonstraram uma captação até 10 vezes maior em diferentes grupos musculares quando comparados àqueles em camundongos tipo selvagens (Heemskerk *et al.*, 2010). Embora a recente fase I/II resulte em RNA com 2'-O-metil fosforotioato e AONs morfolino fosforodiamidato em pacientes com DMD confirmam a presença de AONs em biópsias musculares, as diferentes modificações químicas parecem resultar em uma captação e uma

distribuição diferenciais em todo músculo. Além disso, em ambos os estudos, os níveis de nova distrofina após o tratamento ainda eram limitados, o que desafia o campo a desenvolver oligonucleotídeos com características melhoradas, intensificando o índice terapêutico e a aplicabilidade clínica.

[004] Atrofia Muscular Espinhal (SMA) é uma doença autossômica recessiva que afeta 1 em 6.000 crianças recém-nascidas, e é causada por mutações na sobrevivência do gene do neurônio motor 1 (*SMN1*). Isso resulta em perda progressiva de neurônios motores na medula espinhal e subsequente atrofia dos músculos voluntários. A gravidade clínica depende dos níveis de inclusão do éxon 7 de ocorrência natural no gene *SMN2* quase idêntico e do número de cópias de *SMN2*. No *SMN2*, uma transição C>T em um sítio intensificador de splicing do éxon 7 normalmente resulta em uma isoforma do de salto do éxon 7 instável e níveis insuficientes de isoforma de comprimento total (Khoo e Krainer, 2009). Entretanto, a inclusão eficaz do éxon 7 de *SMN2* pode ser obtida pelo bloqueio de um silenciador de splicing intrônico na região 5' do íntron 7 (ISS-N1; Singh et al., 2006; Hua et al., 2008) com AONs com comutação de splicing. Com base em estudos de camundongo bem-sucedidos (Hua et al., 2010, 2011; Passini et al., 2011), o AON candidato (ISIS-SMN_{RX}, ISIS396443 ou nusinersen) está

atualmente em desenvolvimento clínico pela IONIS Pharmaceuticals (Carlsbad, CA). Em estudos de fase 1, a injeção direta de uma dose única de 9 mg de ISIS-SMN_{RX} no espaço intratecal resultou em ampla distribuição no sistema nervoso central e em algumas melhorias da função motora em crianças com SMA (Swoboda et al., 2014, Chiriboga et al. al., 2016). No entanto, a dispensação de SSO sistêmica pode ser necessária para aliviar a patologia cardíaca e aumentar a função do neurônio motor periférico e, conseqüentemente, a sobrevida.

[005] A eficácia clínica de AONs administrados sistemicamente, tais como AONs de comutação de splicing, depende de múltiplos fatores, tais como via de administração, bioestabilidade, biodistribuição, distribuição intra-tecidual, captação pelas células alvo, e encaminhamento para a localização intracelular desejada (núcleo). Estes fatores são, pelo menos em parte, determinados pela estrutura química dos AONs. Parte da invenção mostra que certas modificações químicas no arcabouço de AON podem conduzir a AONs que apresentam características melhoradas para possível tratamento de distúrbios genéticos.

[006] Em conclusão, para aumentar a aplicabilidade terapêutica de AONs, tais como AONs de troca de splicing para distúrbios genéticos, tais como DMD, BMD ou SMA, há

uma necessidade de AONs com características químicas otimizadas.

Descrição da invenção

Oligonucleotídeo

[007] Em um primeiro aspecto, a invenção fornece um oligonucleotídeo compreendendo um monômero 2'-substituído, de preferência um monômero de RNA 2'-substituído, e um esqueleto de fosforotioato ou consistindo em monômeros 2'-substituídos, de preferência, monômeros de RNA 2'-substituídos, ligados por ligações de esqueleto de fosforotioato e compreendendo uma modificação de arcabouço de ácido nucleico bicíclico (BNA), e compreendendo uma base de 5-metilpirimidina, de preferência, para uso como um medicamento para tratar uma doença ou condição através de modulação de splicing, tal como através do salto do éxon ou inclusão do éxon, ambos os quais são formas de comutação de splicing. As doenças preferidas neste contexto são a distrofia muscular de Duchenne, a distrofia muscular de Becker e a atrofia muscular espinal.

[008] Para oligonucleotídeos como descrito neste pedido, quando uma característica de um monômero não está definida e não é aparente do contexto, o recurso correspondente de um monômero de RNA é para ser assumido.

[009] Como tal, neste aspecto, a invenção fornece um oligonucleotídeo compreendendo:

i) 1a) pelo menos um monômero 2'-substituído e opcionalmente uma ligação de esqueleto de fosforotioato, ou

1b) apenas monômeros 2'-substituídos ligados por ligações de esqueleto de fosforotioato e/ou por ligações fosfodiéster,

ii) uma base de 5-metilcitosina e/ou um 5-metiluracila e

iii) pelo menos um monômero compreendendo uma modificação de arcabouço de ácido nucleico bicíclico (BNA).

[0010] De preferência, os referidos monômeros são monômeros de RNA, ou são derivados de monômeros de RNA. Tais oligonucleotídeos serão aqui referidos como oligonucleotídeos de acordo com a invenção. Como tal, um oligonucleotídeo preferido de acordo com a invenção compreende:

i) 1a) pelo menos um monômero 2'-substituído, de preferência, um monômero de RNA ou um monômero de RNA 2'-O-substituído, e opcionalmente uma ligação de esqueleto de fosforotioato, ou

1b) apenas monômeros 2'-substituídos, de preferência, monômeros de RNA ou monômeros de RNA 2'-O-substituídos, ligados por ligações de esqueleto de fosforotioato e/ou por ligações fosfodiéster,

ii) uma base de 5-metilcitosina e/ou um 5-metiluracila e

iii) pelo menos um monômero compreendendo uma modificação do arcabouço de ácido nucleico bicíclico (BNA),

[0011] Os oligonucleotídeos preferidos de acordo com a invenção possuem um comprimento menor que 34 oligonucleotídeos. O referido oligonucleotídeo pode ter 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32 ou 33 nucleotídeos. Esse oligonucleotídeo também pode ser identificado como um oligonucleotídeo tendo 10 a 33 nucleotídeos. Os oligonucleotídeos mais preferidos de acordo com a invenção possuem um comprimento de 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22 nucleotídeos, e podem ser identificados como um oligonucleotídeo tendo 16 a 22 nucleotídeos.

[0012] Em outra modalidade, o oligonucleotídeo de acordo com a invenção é de 16 a 25 nucleotídeos de comprimento. Em outra modalidade, o oligonucleotídeo de acordo com a invenção é de 16 a 24 nucleotídeos de comprimento. Em outra modalidade, o oligonucleotídeo é de 16 a 22 nucleotídeos de comprimento. Em outra modalidade, o oligonucleotídeo de acordo com a invenção é de 16, 18, 20 ou 22 nucleotídeos de comprimento. Em outra modalidade, o oligonucleotídeo de acordo com a invenção é de 21, 22, 24 ou 25 nucleotídeos de comprimento. Em outra modalidade, o oligonucleotídeo de acordo com a invenção é de 18, 22, 24 ou 25 nucleotídeos de comprimento.

[0013] Em outra modalidade, o oligonucleotídeo é de 16 a 25 nucleotídeos de comprimento e é para saltar os éxons 44, 45, 51 ou 53 de pré-mRNA de distrofina. Em outra modalidade, o oligonucleotídeo é de 16 a 24 nucleotídeos de comprimento e é para salto dos éxons 44, 51 ou 53 de pré-mRNA de distrofina. Em outra modalidade, o oligonucleotídeo tem 16 a 22 nucleotídeos de comprimento e é para salto do éxon 51 de pré-mRNA de distrofina. Em outra modalidade, o oligonucleotídeo é de 16, 18, 20 ou 22 nucleotídeos de comprimento e é para salto do éxon 51 de pré-mRNA de distrofina. Em outra modalidade, o oligonucleotídeo tem 20 ou 23 nucleotídeos de comprimento e é para salto do éxon 44 de pré-mRNA de distrofina. Em outra modalidade, o oligonucleotídeo é de 21, 22, 24 ou 25 nucleotídeos de comprimento e é para salto do éxon 45 de pré-mRNA de distrofina. Em outra modalidade, o oligonucleotídeo é de 18, 22, 24 ou 25 nucleotídeos de comprimento e é para salto do éxon 53 de pré-mRNA de distrofina. Ao longo deste pedido, a referência à distrofina é de preferência interpretada como referência à distrofina humana.

[0014] São abrangidos pelo ((i)(1a)) acima oligonucleotídeos que compreendem pelo menos um monômero 2'-substituído, de preferência um monômero de RNA 2'-substituído, e sem ligação de esqueleto de fosforotioato. Um tal oligonucleotídeo pode ter um esqueleto que

compreende apenas ligações fosfodiéster. De um modo semelhante são abrangidos oligonucleotídeos que compreendem pelo menos um monômero 2'-substituído, de preferência um monômero de RNA 2'-substituído, e uma ou mais ligações de esqueleto de fosforotioato.

[0015] São abrangidos pelo ((i)(1b)) acima oligonucleotídeos que não compreendem outros monômeros do que monômeros de RNA 2'-substituídos, e que compreendem apenas ligações de esqueleto que são ligações de esqueleto de fosforotioato. De um modo semelhante, englobam-se oligonucleotídeos que não compreendem outros monômeros do que monômeros de RNA 2'-substituídos, e que compreendem apenas ligações de esqueleto que são ligações de esqueleto de fosfodiéster.

[0016] Como é do conhecimento da pessoa habilitada, um oligonucleotídeo tal como um oligonucleotídeo de RNA consiste geralmente em repetir monômeros. Um tal monômero é mais frequentemente um nucleotídeo ou um análogo de nucleotídeo. Os nucleotídeos de ocorrência natural mais comuns no RNA são monofosfato de adenosina, monofosfato de citidina, monofosfato de guanosina, monofosfato de timidina e monofosfato de uridina. Estes consistem de um açúcar ribose pentose, um grupo fosfato ligado a 5' que está ligado através de um éster de fosfato, e uma base ligada a 1'. O açúcar conecta a base e o fosfato, e é, portanto,

frequentemente referido como o esqueleto do nucleotídeo. Uma modificação no açúcar pentose é, portanto, frequentemente referida como uma modificação de arcabouço. Para modificações severas, o açúcar pentose original pode ser substituído em sua totalidade por outra porção que conecta de forma semelhante a base e o fosfato. É, portanto, entendido que enquanto um açúcar pentose é frequentemente um arcabouço, um arcabouço não é necessariamente um açúcar pentose.

[0017] Uma base, às vezes chamada de nucleobase, é geralmente adenina, citosina, guanina, timina ou uracila, ou um derivado da mesma. A citosina, a timina e a uracila são bases de pirimidina e estão geralmente ligadas ao arcabouço através do seu 1-nitrogênio. A adenina e a guanina são bases purinas e estão geralmente ligadas ao arcabouço através do seu 9-nitrogênio.

[0018] Um nucleotídeo é geralmente conectado a nucleotídeos vizinhos através da condensação da sua porção 5'-fosfato à porção 3'-hidroxila do monômero nucleotídico vizinho. Similarmente, a sua porção 3'-hidroxila é geralmente conectada ao 5'-fosfato de um monômero nucleotídico vizinho. Isso forma ligações fosfodiéster. Os fosfodiésteres e o arcabouço formam um copolímero alternado. As bases são enxertadas neste copolímero, ou seja, nas porções de arcabouço. Devido a esta

característica, o copolímero alternado formado por monômeros ligados de um oligonucleotídeo é frequentemente chamado de esqueleto do oligonucleotídeo. Devido às ligações fosfodiéster conectarem os monômeros vizinhos, elas são frequentemente chamadas de ligações de esqueleto. Entende-se que quando um grupo fosfato é modificado de modo que seja, em vez disso, uma porção análoga, tal como um fosforotioato, tal porção é ainda referida como a ligação de esqueleto do monômero. Isso é chamado de modificação de ligação de esqueleto. Em termos gerais, o esqueleto de um oligonucleotídeo é assim compreendido de arcabouços alternados e ligações de esqueleto.

[0019] Em outra modalidade, a nucleobase é adenina, citosina, guanina, timina ou uracila. Em outra modalidade, a nucleobase é adenina, citosina, guanina ou uracila. Em outra modalidade, a nucleobase é uma forma modificada de adenina, citosina, guanina, timina ou uracila. Em outra modalidade, a nucleobase modificada é hipoxantina, pseudouracila, pseudocitosina, 1-metilpseudouracila, ácido orótico, agmatidina, lisidina, 2-tiouracila, 2-tiotimina, 5-halouracila, 5-halometiluracila, 5-trifluorometiluracila, 5-propiniluracila, 5-propiletilcitosina, 5-aminometiluracila, 5-hidroximetiluracila, 5-aminometilcitosina, 5-hidroximetilcitosina, 7-desazaguanina, 7-deaza-adenina, 7-aza-2,6-diaminopurina, 8-

aza-7-desazaguanina, 8-aza-7-deaza-adenina, 8-aza-7-deaza-2,6-diaminopurina, pseudoisocitidina, N⁴-etilcitosina, N²-ciclopentilguanina (cPent-G), N²-ciclopentil-2-aminopurina (cPent-AP) ou N²-propil-2-aminopurina (Pr-AP). Em outra modalidade, a nucleobase modificada é hipoxantina, pseudouracila, pseudocitosina, 1-metilpseudouracila, ácido orótico, agmatidina, lisidina, 2-tiouracila, 2-tiotimina, 5-halouracila, 5-halometiluracila, 5-trifluorometiluracila, 5-propiniluracila, 5-propiletilcitosina, 5-aminometiluracila, 5-hidroximetiluracila, 5-aminometilcitosina ou 5-hidroximetilcitosina.

[0020] Um oligonucleotídeo da invenção compreende ou consiste em monômero de fosforotioato 2'-substituído, de preferência, um monômero de RNA fosforotioato 2'-substituído, monômero de RNA fosfato 2'-substituído ou monômeros mistos de RNA fosfato/fosforotioato 2'-substituído. Tal oligonucleotídeo compreende um monômero de RNA 2'-substituído conectado através de ou ligado por uma ligação de esqueleto de fosforotioato ou fosfato, ou uma mistura dos mesmos, ou consiste em RNA fosforotioato 2'-substituído, RNA fosfato 2'-substituído ou uma mistura dos mesmos. De preferência, esse oligonucleotídeo consiste em monômeros de RNA fosforotioato 2'-substituído, monômeros de RNA fosfato 2'-substituído, ou uma mistura dos mesmos. O RNA 2'-substituído é, de preferência, 2'-F, 2'-O-metila ou

2'-O-(2-metoxietila). A porção 2'-O-(2-metoxietila) é frequentemente referida como 2'-MOE. Mais de preferência, o monômero de RNA 2'-substituído é um monômero de RNA 2'-O-metila. Tais químicas são conhecidas da pessoa habilitada. Em uma modalidade preferida deste aspecto é fornecido um oligonucleotídeo de acordo com a invenção, em que o referido monômero 2'-substituído é um monômero de RNA 2'-substituído, um monômero 2'-F, um monômero 2'-amino, um 2'-O-substituído, um monômero 2'-O-metila, ou um monômero 2'-O-(2-metoxietila), de preferência, um monômero 2'-O-metila. De preferência, o referido monômero 2'-substituído é um monômero de RNA 2'-substituído, tal como um monômero de RNA 2'-O-metila.

[0021] Ao longo da aplicação, um oligonucleotídeo compreendendo um monômero 2'-O-metila, ou um monômero de RNA 2'-O-metila e uma ligação de esqueleto de fosforotioato, fosfato ou ligação mista fosfato/fosforotioato, pode ser substituído, respectivamente, por um oligonucleotídeo compreendendo um RNA 2'-O-metil fosforotioato, RNA 2'-O-metil fosfato ou RNA 2'-O-metil fosfato/fosforotioato. Ao longo do pedido, um oligonucleotídeo consistindo em monômeros de RNA 2'-O-metila ligados por ou conectados através de ligações de esqueleto de fosforotioato, fosfato ou ligações mistas fosfato/fosforotioato, pode ser substituído por um

oligonucleotídeo consistindo em RNA 2'-O-metil fosforotioato, RNA 2'-O-metil-fosfato ou RNA 2'-O-metil fosfato/fosforotioato.

[0022] Além disso, um oligonucleotídeo da invenção compreende uma modificação de base que aumenta a afinidade de ligação a cadeias alvo, aumenta a temperatura de fusão do duplex resultante do referido oligonucleotídeo com o seu alvo, e/ou diminui os efeitos imunoestimuladores e/ou aumenta a bioestabilidade e/ou melhora a biodistribuição e/ou a distribuição intratecidual e/ou a captação e tráfico celular. Em uma modalidade mais preferida, um oligonucleotídeo da invenção compreende uma 5-metilpirimidina. Uma 5-metilpirimidina é selecionada de uma 5-metilcitosina e/ou um 5-metiluracila e/ou uma timina, em que a timina é idêntica a 5-metiluracila. 'Timina' e '5-metiluracila' podem ser trocados ao longo do documento. De preferência, os oligonucleotídeos da invenção compreendem pelo menos um de uma base de uma base de 5-metilcitosina ou 5-metiluracila. Em uma modalidade preferida da invenção, por conseguinte, é fornecido o oligonucleotídeo como descrito acima, em que todas as bases de citosina são bases de 5-metilcitosina e/ou em que todas as bases de uracila são bases de 5-metiluracila. Isto refere-se a oligonucleotídeos que compreendem 5-metilcitosina, mas não citosina ou uracila não substituídos, a oligonucleotídeos

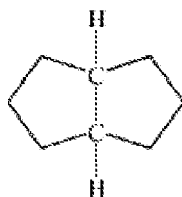
que compreendem 5-metiluracila, mas não citosina ou uracila não substituídos, e a oligonucleotídeos que compreendem 5-metilcitosina e 5-metiluracila, mas não citosina ou uracila não substituído. Também se refere a oligonucleotídeos que compreendem 5-metilcitosina, mas não citosina não substituída ainda que compreendem uracila não substituída, ou a oligonucleotídeos que compreendem 5-metiluracila mas nenhuma uracila não substituída, ainda que compreenda citosina não substituída.

[0023] Um oligonucleotídeo da invenção compreende uma modificação de arcabouço que aumenta a afinidade de ligação a cadeias alvo, aumenta a temperatura de fusão do duplex resultante do referido oligonucleotídeo com o seu alvo e/ou diminui os efeitos imunoestimuladores e/ou aumenta a bioestabilidade e/ou melhora a biodistribuição e/ou distribuição intra-tecidual e/ou captação e tráfico celular. São abrangidas pela invenção aquelas modificações de arcabouço que resultam em um monômero de ácido nucleico bicíclico (BNA). Um arcabouço bicíclico é geralmente um arcabouço derivado de pentose que foi quimicamente alterado para restringir conformacionalmente o arcabouço, levando aos efeitos melhorados acima. Exemplos de arcabouços bicíclicos são arcabouços onde um primeiro ciclo, tal como ciclo de pentose, forma um espirano com uma porção cíclica adicional, de modo que ambos os ciclos compartilhem apenas

um átomo, arcabouços onde um primeiro ciclo, tal como ciclo de pentose é fundido a uma porção cíclica de modo ambos os ciclos compartilhem dois átomos adjacentes, e arcabouços onde um primeiro ciclo, tal como um ciclo de pentose, forma um composto ligado em ponte através de uma porção que está ligada à primeira porção cíclica em dois átomos não adjacentes. Tais átomos não adjacentes são referidos como átomos de cabeça de ponte. Os compostos ligados em ponte incluem múltiplos ciclos, cada um dos quais se sobrepõe pelo menos três átomos. Um composto com dois ciclos em que esses ciclos se sobrepõem apenas a dois átomos é um composto fundido. Em alguns compostos ligados em ponte, a menor ligação entre dois átomos de cabeça de ponte é referida como a porção de ligação em ponte, ou como a porção de ponte. Em outros compostos ligados em ponte, quando um ciclo é um ciclo característico, tal como o ciclo de pentose de um nucleotídeo, a porção que não é constitutiva desse ciclo característico é referida como a porção de ligação em ponte. Segue-se que a nomenclatura de compostos bicíclicos ligados em ponte é dependente do contexto.



Composto espirano



Composto fundido



Composto ligado em ponte

[0024] Compostos espirano podem compreender ciclos adicionais. Um composto bicíclico de acordo com a invenção é pelo menos bicíclico, e os referidos dois ciclos constituem um espirano, um sistema fundido ou um sistema ligado em ponte, ou uma combinação dos mesmos. A invenção não abrange modificações de esqueleto, em que dois ciclos independentes são ligados através de um ligante não cíclico, de modo a não formar um espirano, composto fundido ou composto ligado em ponte. Compostos bicíclicos preferidos são compostos fundidos e em ligados ponte. Em modalidades mais preferidas, um monômero de ácido nucleico bicíclico (BNA) é um monômero de ácido nucleico ligado em ponte. Como aqui descrito, um monômero de ácido nucleico "ligado em ponte" ou um "bicíclico" refere-se a um nucleotídeo com um arcabouço modificado que intensifica a temperatura de fusão de um oligonucleotídeo contra um alvo de RNA em comparação com um oligonucleotídeo de controle não contendo nucleotídeo de BNA.

[0025] Em uma modalidade preferida é fornecido um oligonucleotídeo de acordo com a invenção, em que cada

ocorrência da referida modificação de arcabouço de ácido nucleico (BNA) bicíclico resulta em um monômero que é independentemente selecionado do grupo consistindo em um monômero de nucleotídeo restrito conformacionalmente (CRN), um monômero de ácido nucleico bloqueado (LNA), um monômero xilo-LNA, um monômero α -LNA, um monômero α -L-LNA, um monômero β -D-LNA, um monômero 2'-amino-LNA, um monômero 2'-(alquilamino)-LNA, um monômero 2'-(acilamino)-LNA, um monômero 2'-N-substituído-2'-amino-LNA, um monômero 2'-tio-LNA, um monômero de etila restrito (cEt)-BNA (2'-O,4'-C), monômero de metoxietila restrito (cMOE)-BNA (2'-O,4'-C), monômero 2',4'-BNA^{NC}(NH), um monômero 2',4'-BNA^{NC}(N-Bn), um monômero de ácido nucleico ligado a etileno (ENA), um monômero de carba LNA (cLNA), um monômero de ácido nucleico 3,4-di-hidro-2H-pirano (DpNA), um monômero de nucleotídeo bicíclico ligado em ponte a 2'-C (CBBN), um monômero de BNA ligado em ponte a heterocíclico (tal como ligado a triazolila ou tetrazolila), um monômero de BNA ligado a amido, um monômero de BNA ligado a ureia, um monômero de BNA ligado em ponte a sulfonamida, um monômero de nucleotídeo carbocíclico bicíclico, um monômero de TriNA, um monômero de α -L-TriNA, um monômero de DNA biciclo (bcDNA) um monômero F-bcDNA, um monômero de DNA triciclo (tcDNA), um monômero F-tcDNA, um monômero de nucleotídeo de

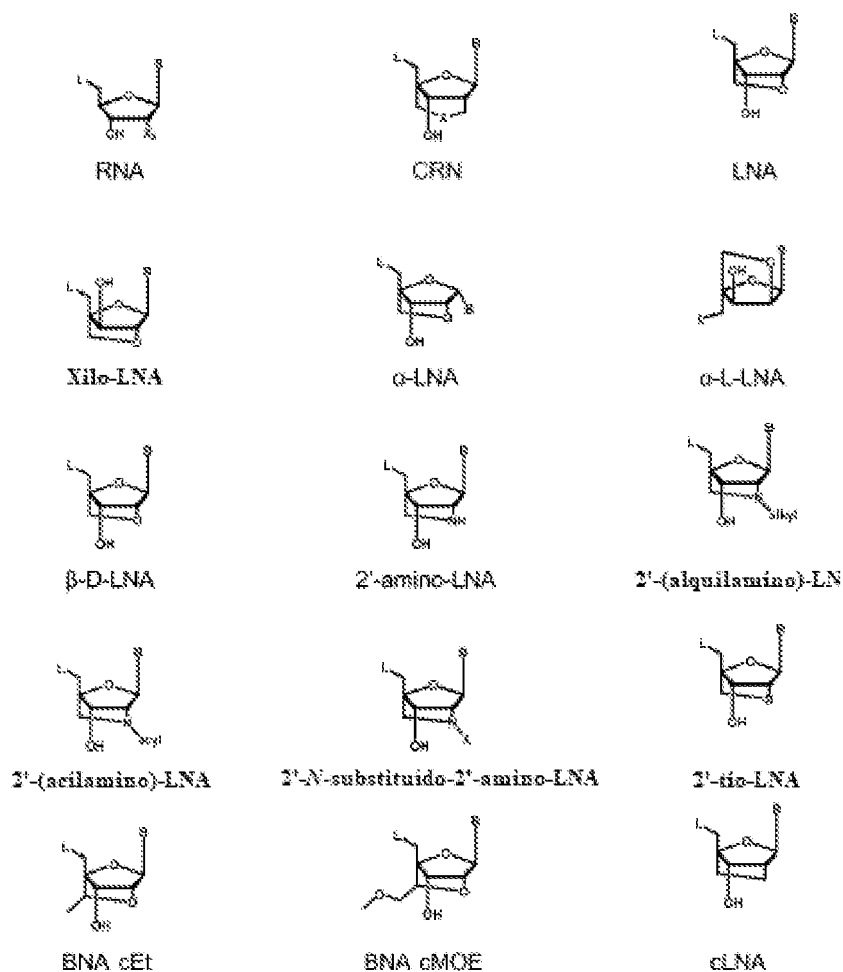
oxetano, um monômero de PMO bloqueado derivado de 2'-amino-LNA, um monômero de ácido nucleico ligado a guanidina (GuNA), um monômero de ácido nucleico ligado em ponte a espirociclopropileno (scpBNA) e derivados dos mesmos. É também abrangido pela invenção introduzir mais do que uma modificação de BNA de arcabouço distinto no referido oligonucleotídeo. Mais de preferência, cada ocorrência da referida modificação de arcabouço de BNA resulta em um monômero que é independentemente selecionado do grupo consistindo em um monômero de nucleotídeo conformacionalmente restrito (CRN), um monômero de ácido nucleico bloqueado (LNA), um monômero xilo-LNA, um monômero α -L-LNA, um monômero β -D-LNA, um monômero 2'-amino-LNA, um monômero 2'-(alquilamino)-LNA, um monômero 2'-(acilamino)-LNA, um monômero 2'-N-substituído-2'-amino-LNA, um monômero de etila restrito (cEt)-LNA (2'-O,4'-C), um monômero de metoxietila restrito-BNA (cMOE) (2'-O,4'-C), um monômero de 2',4'-BNA^{NC}(NH), um monômero 2',4'-BNA^{NC}(N-Me), um monômero de ácido nucleico ligado em ponte a etileno (ENA), um monômero de nucleotídeo bicíclico ligado em ponte a 2'-C (CBBN) e derivados dos mesmos. Em modalidades preferidas, a modificação de arcabouço de BNA resulta em um monômero de LNA, um monômero de ENA, um monômero de BNA de cEt, um monômero de oxo-CBBN, um monômero de 2'-amino-LNA ou um monômero de BNA de cMOE. Em modalidades altamente

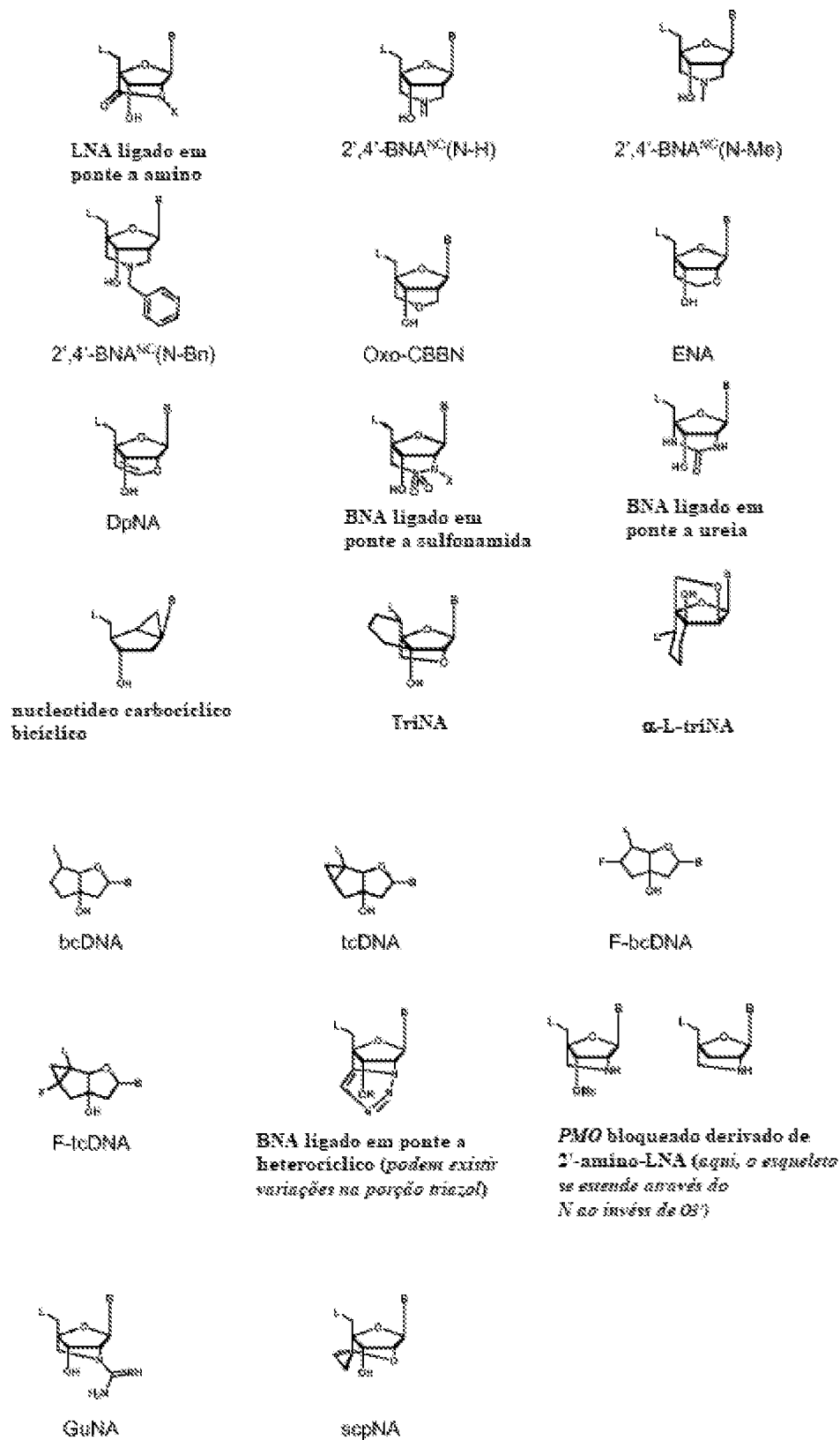
preferidas, a modificação de arcabouço de BNA resulta em um monômero de LNA, em um monômero de ENA, em um monômero de BNA cEt ou em um monômero de BNA cMOE. Mais de preferência, a modificação de arcabouço de BNA resulta em um monômero de LNA.

[0026] Ao longo deste pedido, qualquer monômero compreendendo uma modificação de arcabouço de BNA pode ser substituído por qualquer outro monômero compreendendo uma modificação de BNA, de preferência, preservando a nucleobase ou a nucleobase modificada do mesmo. Em outras palavras, as modificações de arcabouço podem ser trocadas, preservando a sequência do oligonucleotídeo. Como um exemplo não limitativo, um monômero de LNA compreendendo uma adenina pode ser substituído por um monômero de ENA compreendendo uma adenina.

[0027] Exemplos estruturais de monômeros compreendendo estas modificações de arcabouço de BNA são mostrados abaixo, em que B é uma base como aqui definido anteriormente, X uma variável tal como um heteroátomo ou uma porção metileno, X₂ é uma porção hidroxila ou outra substituição em 2' como definido anteriormente aqui, e L é uma ligação de esqueleto como descrito anteriormente neste documento. Na literatura, a nomeação de tais modificações é muitas vezes arbitrária e não segue uma convenção uniforme - neste pedido, os nomes como fornecidos abaixo se referem

às estruturas fornecidas abaixo. Para comparação, o arcabouço cíclico de um monômero de RNA convencional é mostrado em primeiro lugar. Nas estruturas mostradas abaixo, os monômeros são tipicamente representados como monômeros 3'-terminais. Quando a quiralidade não é indicada, cada enantiômero é individualmente referenciado. A invenção não está limitada a este tipo de monômeros que são fornecidos para fins ilustrativos. Os heteroátomos compreendidos em uma porção cíclica podem ser substituídos por outros heteroátomos.





[0028] O que se segue é uma visão geral não exaustiva das referências bibliográficas para as

modificações de arcabouço do BNA mostradas acima: LNA de (etila restrito 2'-O,4'-C) (doi: 10.1021/ja710342q), (metoxietila restrito 2'-O,4'-C)cMOE-LNA (Seth et al., J. Org. Chem. 2010, 75, 1569-1581), 2',4'-BNA^{NC}(NH), 2',4'-BNA^{NC}(N-Me), ácido nucleico ligado em ponte a etileno (ENA) (doi: 10.1093/nass/1.1.241), carba LNA (cLNA) (doi: 10.1021/jo100170g), DpNA (Osawa et al., J. Org. Chem., 2015, 80 (21), págs. 10474-10481), nucleotídeo bicíclico ligado em ponte 2'-C (CBBN, como, por exemplo, WO 2014/145356 (MiRagen Therapeutics)), LNA ligado em ponte a heterocíclico (como em, por exemplo, WO 2014/126229 (Mitsuoka Y et al.)), LNA ligado em amido (como por exemplo, Yamamoto et al. Org. Biomol. Chem., 2015, 13, 3757), LNA ligado em ponte a ureia (como, por exemplo, Nishida et al. Chem. Commun. **2010**, 46, 5283), LNA ligado em ponte a sulfonamida (como, por exemplo, WO 2014/112463 (Obika S et al.)), nucleosídeos carbocíclicos bicíclicos (como em, por exemplo, WO 2015/142910 (lonis Pharmaceuticals)), TriNA (Hanessian et al. J. Org. Chem., 2013, 78 (18), págs. 9064-9075), α -L-TriNA, DNA biciclo (bcdDNA) (Bolli et al., Chem Biol. 1996 Mar; 3(3): 197-206), F-bcdDNA (DOI: 10.1021/jo402690j), DNA triciclo (tcDNA) (Murray et al., Nucl. Acids Res., 2012, Vol. 40, N° 13 6135-6143), F-tcDNA (doi: 10.1021/acs.joc 5b00184), um

monômero de nucleotídeo de oxetano (Nucleic Acids Res. 2004, 32, 5791-5799), scpNA (Horiba et al., J. Org. Chem. 2016, doi: 10.1021/acs.joc.6b02036, GuNA (Shrestha). et al., Chem. Commun. 2014, doi: 10.1039/C3CC46017G) Para aqueles não mencionados acima, é feita referência a WO2011/097641 (ISIS/Ionis Pharmaceuticals) e WO2016/017422 (Universidade de Osaka), que são incorporados na sua totalidade por referência.

[0029] Um oligonucleotídeo da invenção compreendendo um BNA e uma base de 5-metilcitosina e/ou 5-metiluracila significa que pelo menos um dos arca-bouços do referido oligonucleotídeo foi modificado por substituição com um BNA, em combinação com pelo menos uma das nucleobases citosinas do referido oligonucleotídeo sendo modificadas por substituição do hidrogênio na posição 5 do anel de pirimidina com um grupo metila, isto é, uma citosina 5-substituída, e/ou pelo menos uma das nucleobases uracila do referido oligonucleotídeo foi modificada por substituição do próton na posição 5 do anel de pirimidina com um grupo metila (isto é, um 5-metiluracila), respectivamente. Dentro do contexto da invenção, a expressão "a substituição de um hidrogênio por um grupo metila na posição 5 do anel de pirimidina" pode ser substituída pela expressão "a substituição de uma pirimidina com uma 5-metilpirimidina", com pirimidina se

referindo a apenas uracila, apenas citosina ou ambos. Se o referido oligonucleotídeo compreender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou mais citosinas e/ou uracilas, pelo menos um, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 9 ou mais citosinas e/ou uracilas, respectivamente, foram modificados dessa maneira. De preferência, todas as citosinas e/ou uracilas foram modificadas desta forma ou substituídas por 5-metilcitosina e/ou 5-metiluracila, respectivamente. Desnecessário dizer que a invenção poderia, portanto, ser aplicada apenas a oligonucleotídeos compreendendo pelo menos uma citosina ou uracila, respectivamente, na sua sequência.

[0030] De preferência, um oligonucleotídeo de acordo com a invenção compreende monômeros de RNA, dado que os duplexos RNA/RNA são muito estáveis. É preferido que um oligonucleotídeo de RNA compreenda uma modificação fornecendo ao RNA uma propriedade adicional, por exemplo, resistência a endonucleases, exonucleases e RNaseH, resistência a hibridização adicional, estabilidade aumentada (por exemplo, em um fluido corporal), flexibilidade aumentada ou diminuída, atividade aumentada, toxicidade reduzida, transporte intracelular aumentado, captação celular aumentada, especificidade de tecido, etc. Além disso, o mRNA complexado com o oligonucleotídeo da invenção, de preferência, não é susceptível à clivagem de RNaseH. Modificações preferidas foram identificadas acima.

[0031] Consequentemente, a invenção fornece um oligonucleotídeo compreendendo um monômero de RNA 2'-O-metil-fosforotioato ou consistindo em RNA 2'-O-metil-fosforotioato e compreendendo um BNA com ou sem uma base de 5-metilpirimidina. Mais de preferência, este oligonucleotídeo consiste em monômeros de RNA 2'-O-metil conectados através de um esqueleto de fosforotioato ou fosfato e todas as suas citosinas e/ou todos as suas uracilas, independentemente, foram substituídos por 5-metilcitosina e/ou 5-metiluracila, respectivamente, e pelo menos um arcabouço de 2'-O-metila foi substituído por um BNA. Assim, um oligonucleotídeo da invenção pode ter, na adição de pelo menos uma modificação de arcabouço de BNA:

- pelo menos uma, e de preferência todas, as citosinas substituídas com 5-metilcitosinas,

- pelo menos uma, e de preferência todas, as citosinas substituídas com 5-metilcitosinas e pelo menos uma uracila substituída com 5-metiluracila,

- pelo menos uma uracila substituída com 5-metiluracila.

[0032] Em modalidades preferidas deste aspecto, é fornecido o oligonucleotídeo como descrito acima, em que o referido oligonucleotídeo compreende 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 monômeros que compreendem uma modificação de arcabouço de ácido nucleico bicíclico (BNA), de preferência, uma

modificação de arcabouço de ácido nucleico ligado em ponte.

[0033] Nestas modalidades, é preferido que pelo menos uma modificação de arcabouço de BNA esteja compreendida em um monômero terminal do oligonucleotídeo, de preferência, no monômero 5'-terminal. É mais preferido que ambos os monômeros terminais compreendam um arcabouço de BNA. Como tal, uma modalidade mais preferida deste aspecto fornece o oligonucleotídeo de acordo com a invenção, em que pelo menos uma modificação de arcabouço de ácido nucleico bicíclico (BNA) está compreendida em um monômero terminal do referido oligonucleotídeo, de preferência, no monômero 5'-terminal do referido oligonucleotídeo, mais de preferência em ambos os monômeros terminais do referido oligonucleotídeo. Outras modalidades preferidas implicam que um monômero terminal e o seu monômero vizinho compreendem, cada um, um arcabouço de BNA. Nesse caso, cada um dos primeiros dois monômeros ou dos últimos dois monômeros de um oligonucleotídeo compreende um arcabouço de BNA. Isto pode ser combinado de qualquer maneira, de modo que, por exemplo, os primeiros e os últimos dois monômeros, ou os primeiros dois monômeros e o último monômero, todos compreendam um arcabouço de BNA. Quando um oligonucleotídeo de acordo com a invenção compreende um monômero terminal compreendendo um arcabouço de BNA, os monômeros adicionais com um arcabouço de BNA

estão de preferência no outro terminal, ou adjacentes a monômeros terminais com um arcabouço de BNA.

[0034] Uma modalidade preferida deste aspecto fornece o oligonucleotídeo da invenção, em que o referido oligonucleotídeo compreende modificações de BNA selecionadas do conjunto consistindo em:

- uma única modificação de arcabouço BNA no monômero 5'-terminal,

- uma única modificação de arcabouço BNA no monômero 3'-terminal,

- duas modificações de arcabouço de BNA, em que uma está no monômero na terminação 5' e a outra no monômero na terminação 3',

- duas modificações de arcabouço de BNA, uma em cada um dos dois monômeros que são mais próximos à terminação 5',

- duas modificações de arcabouço do BNA, uma em cada um dos dois monômeros que são mais próximos à terminação 3',

- três a sete modificações de arcabouço de BNA, em que uma está no monômero na terminação 5', onde uma está no monômero na terminação 3', e as 1-5 modificações de arcabouço de BNA estão nos resíduos não terminais,

- três a seis modificações de arcabouço de BNA, em que uma está no monômero na terminação 5', uma está no monômero

na terminação 3', e as 1-4 modificações de arcabouço de BNA estão em resíduos não terminais,

- três a cinco modificações de arcabouço de BNA, em que uma está no monômero na terminação 5', uma está no monômero na terminação 3', e 1-3 modificações de arcabouço de BNA estão em resíduos não terminais,

- três ou quatro modificações de arcabouço de BNA, em que uma está no monômero na terminação 5', uma está no monômero na terminação 3' e uma ou duas modificações de arcabouço de BNA está/ão em resíduos não terminais,

- três modificações de arcabouço de BNA, em que uma está no monômero na terminação 5', uma está no monômero na terminação 3', e uma modificação de arcabouço de BNA está em um resíduo não terminal,

- quatro a seis modificações de arcabouço de BNA, em que uma está no monômero na terminação 5', uma está no monômero na terminação 3' e as modificações 2-4 no arcabouço de BNA estão nos resíduos não terminais, e

- quatro ou cinco modificações de arcabouço de BNA, em que uma está no monômero na terminação 5', uma está no monômero na terminação 3', e 2-3 modificações de arcabouço de BNA estão nos resíduos não terminais.

[0035] Quando um oligonucleotídeo de acordo com a invenção compreende ou consiste em uma sequência representada pelas SEQ ID NOS: 8, 14, 20, 26, 32, 38, 44,

50, 56, 62, 68, 74, 80, 86, 92, 98, 104, 110, 116, 122, 128, 134, 140, 146, 152, 158, 164, 170, 176, 182, 188, 194, 200, 206, 212, 218, 224, 230, 236, 242, 248, 254, 260, 266, 272, 278, 284, 290, 296, 302, 308, 314, 320, 326, 332, 338, 344, 350, 356, 362, 368, 374, 380, 386, 392, 398, 404, 410, 416, 422, 428, 434, 440, 446, 452, 458, 464, 470, 476, 482, 488, 494, 500, 506, 512, 518, 524, 530, 536, 542, 548, 554, 560, 566, 572, 578, 584, 590, 596, 602, 608, 614, 620, 626, 632, 638, 644, 650, 656, 662, 668, 674, 680, 686, 692, 698, 704, 710, 716, 722, 728, 734, 740, 746, 752, 758, 764, 770, 776, 782, 788, 794, 800, 806, 812, 818, 824, 830, 836, 842, 848, 854, 860, 866, 872, 878, 884, 890, 896, 902, 908, 914, 920, 926, 932, 938, 944, 950, 956, 962, 968, 974, 980, 986, 992, 998, 1004, 1010, 1016, 1022, 1028, 1034, 1040, 1046, 1052, 1058, 1064, 1070, 1076, 1082, 1088, 1094, 1100, 1106, 1112, 1118, 1124, 1130, 1136, 1142, 1148, 1154, 1160, 1166, 1172, 1178, 1184, 1190, 1196, 1202, 1208 1214, 1220, 1226, 1232, 1238, 1244, 1250, 1256, 1262, 1268, 1274, 1280, 1286, 1292, 1298, 1304, 1310, 1316, 1322, 1328, 1334, 1340, 1346, 1352, 1358. 1364, 1370, 1376, 1382, 1388, 1394, 1400, 1406, 1412, 1418, 1424, 1430, 1436, 1442, 1448, 1454, 1460, 1466, 1472, 1478, 1484, 1490, 1496, 1502, 1508. 1514, 1520, 1526, 1532, 1538, 1544, 1550, 1556, 1562, 1568, 1574, ou 1580, de preferência, pelo menos uma modificação de arcabouço de BNA está compreendida no referido oligonucleotídeo.

[0036] Quando um oligonucleotídeo de acordo com a invenção compreende ou consiste em uma sequência representada pelas SEQ ID NOs: 9, 15, 21, 27, 33, 39, 45, 51, 57, 63, 69, 75, 81, 87, 93, 99, 105, 111, 117, 123, 129, 135, 141, 147, 153, 159, 165, 171, 177, 183, 189, 195, 201, 207, 213, 219, 225, 231, 237. 243, 249, 255, 261, 267, 273, 279, 285, 291, 297, 303, 309, 315, 321, 327, 333, 339, 345, 351, 357, 363, 369, 375, 381, 387, 393, 399, 405, 411, 417, 423, 429, 435, 441, 447, 453, 459, 465, 471, 477, 483, 489, 495, 501, 507, 513, 519, 525, 531, 537, 543, 549, 555, 561, 567, 573, 579, 585, 591, 597, 603, 609, 615, 621, 627, 633, 639, 645, 651, 657, 663, 669, 675, 681, 687, 693, 699, 705, 711, 717, 723, 729, 735, 741, 747, 753, 759, 765, 771, 777, 783, 789, 795, 801, 807, 813. 819, 825, 831, 837, 843, 849, 855, 861, 867, 873, 879, 885, 891, 897, 903, 909, 915, 921, 927, 933, 939, 945, 951, 957, 963, 969, 975, 981, 987, 993, 999, 1005, 1011, 1017, 1023, 1029, 1035, 1041, 1047, 1053, 1059, 1065, 1071, 1077, 1083, 1089, 1095, 1101, 1107, 1113, 1119, 1125, 1131, 1137, 1143, 1149, 1155, 1161, 1167, 1173, 1179, 1185, 1191, 1197, 1203, 1209, 1215, 1221, 1227, 1233, 1239, 1245, 1251, 1257, 1263, 1269, 1275, 1281, 1287, 1293, 1299, 1305, 1311, 1317, 1323, 1329, 1335, 1341, 1347, 1353, 1359, 1365, 1371, 1377, 1383, 1389, 1395, 1401, 1407, 1413, 1419, 1425, 1431, 1437, 1443, 1449, 1455, 1461, 1467, 1473, 1479, 1485, 1491, 1497, 1503, 1509, 1515, 1521, 1527,

1533, 1539, 1545, 1551, 1557, 1563, 1569, ou 1575, de preferência, apenas o monômero 5'-terminal do referido oligonucleotídeo compreende uma modificação de arcabouço de BNA.

[0037] Quando um oligonucleotídeo de acordo com a invenção compreende ou consiste em uma sequência representada pelas SEQ ID NOs: 10, 16, 22, 28, 34, 40, 46, 52, 58, 64, 70, 76, 82, 88, 94, 100, 106, 112, 118, 124, 130, 136, 142, 148, 154, 160, 166, 172, 178, 184, 190, 196, 202, 208, 214, 220, 226, 232, 238, 244, 250, 256, 262, 268, 274, 280, 286, 292, 298, 304, 310, 316, 322, 328, 334, 340, 346, 352, 358, 364, 370, 376, 382, 388, 394, 400, 406, 412, 418, 424, 430, 436, 442, 448, 454, 460, 466, 472, 478, 484, 490, 496, 502, 508, 514, 520, 526, 532, 538, 544, 550, 556, 562, 568, 574, 580, 586, 592, 598, 604, 610, 616, 622, 628, 634, 640, 646, 652, 658, 664, 670, 676, 682, 688, 694, 700, 706, 712, 718, 724, 730, 736, 742, 748, 754, 760, 766, 772, 778, 784, 790, 796, 802, 808, 814, 820, 826, 832, 838, 844, 850, 856, 862, 868, 874, 880, 886, 892, 898, 904, 910, 916, 922, 928, 934, 940, 946, 952, 958, 964, 970, 976, 982, 988, 994, 1000, 1006, 1012, 1018, 1024, 1030, 1036, 1042, 1048, 1054, 1060, 1066, 1072, 1078, 1084, 1090, 1096, 1102, 1108, 1114, 1120, 1126, 1132, 1138, 1144, 1150, 1156, 1162, 1168, 1174, 1180, 1186, 1192, 1198, 1204, 1210, 1216, 1222, 1228, 1234, 1240, 1246, 1252, 1258, 1264, 1270, 1276, 1282, 1288,

1294, 1300, 1306, 1312, 1318, 1324, 1330, 1336, 1342, 1348, 1354, 1360, 1366, 1372, 1378, 1384, 1390, 1396, 1402, 1408, 1414, 1420, 1426, 1432, 1438, 1444, 1450, 1456, 1462, 1468, 1474, 1480, 1486, 1492, 1498, 1504, 1510, 1516, 1522, 1528, 1534, 1540, 1546, 1552, 1558, 1564, 1570, ou 1576, de preferência, apenas o monômero 3'-terminal do referido oligonucleotídeo compreende uma modificação de arcabouço de BNA.

[0038] Quando um oligonucleotídeo de acordo com a invenção compreende ou consiste em uma sequência representada pelas SEQ ID NOs: 11, 17, 23, 29, 35, 41, 47, 53, 59, 65, 71, 77, 83, 89, 95, 101, 107, 113, 119, 125, 131, 137, 143, 149, 155, 161, 167, 173, 179, 185, 191, 197, 203, 209, 215, 221, 227, 233, 239, 245, 251, 257, 263, 269, 275, 281, 287, 293, 299, 305, 311, 317, 323, 329, 335, 341, 347, 353, 359, 365, 371, 377, 383, 389, 395, 401, 407, 413, 419, 425, 431, 437, 443, 449, 455, 461, 467, 473, 479, 485, 491, 497, 503, 509, 515, 521, 527, 533, 539, 545, 551, 557, 563, 569, 575, 581, 587, 593, 599, 605, 611, 617, 623, 629, 635, 641, 647, 653, 659, 665, 671, 677, 683, 689, 695, 701, 707, 713, 719, 725, 731, 737, 743, 749, 755, 761, 767, 773, 779, 785, 791, 797, 803, 809, 815, 821, 827, 833, 839, 845, 851, 857, 863, 869, 875, 881, 887, 893, 899, 905, 911, 917, 923, 929, 935, 941, 947, 953, 959, 965, 971, 977, 983, 989, 995, 1001, 1007, 1013, 1019, 1025, 1031, 1037, 1043, 1049,

1055, 1061, 1067, 1073, 1079, 1085, 1091, 1097, 1103, 1109, 1115, 1121, 1127, 1133, 1139, 1145, 1151, 1157, 1163, 1169, 1175, 1181, 1187, 1193, 1199, 1205, 1211, 1217, 1223, 1229, 1235, 1241, 1247, 1253, 1259, 1265, 1271, 1277, 1283, 1289, 1295, 1301, 1307, 1313, 1319, 1325, 1331, 1337, 1343, 1349, 1355, 1361, 1367, 1373, 1379, 1385, 1391, 1397, 1403, 1409, 1415, 1421, 1427, 1433, 1439, 1445, 1451, 1457, 1463, 1469, 1475, 1481, 1487, 1493, 1499, 1505, 1511, 1517, 1523, 1529, 1535, 1541, 1547, 1553, 1559, 1565, 1571, ou 1577, de preferência, apenas o monômero 5'-terminal e o monômero 3'-terminal do referido oligonucleotídeo compreendem uma modificação de arcabouço de BNA.

[0039] Quando um oligonucleotídeo de acordo com a invenção compreende ou consiste em uma sequência representada pelas SEQ ID NOs: 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 66, 72, 78, 84, 90, 96, 102, 108, 114, 120, 126, 132, 138, 144, 150, 156, 162, 168, 174, 180, 186, 192, 198, 204, 210, 216, 222, 228, 234, 240, 246, 252, 258, 264, 270, 276, 282, 288, 294, 300, 306, 312, 318, 324, 330, 336, 342, 348, 354, 360, 366, 372, 378, 384, 390, 396, 402, 408, 414, 420, 426, 432, 438, 444, 450, 456, 462, 468, 474, 480, 486, 492, 498, 504, 510, 516, 522, 528, 534, 540, 546, 552, 558, 564, 570, 576, 582, 588, 594, 600, 606, 612, 618, 624, 630, 636, 642, 648, 654, 660, 666, 672, 678, 684, 690, 696, 702, 708, 714, 720, 726, 732, 738, 744, 750, 756, 762, 768, 774,

780, 786, 792, 798, 804, 810, 816, 822, 828, 834, 840, 846, 852, 858, 864, 870, 876, 882, 888, 894, 900, 906, 912, 918, 924, 930, 936, 942, 948, 954, 960, 966, 972, 978, 984, 990, 996, 1002, 1008, 1014, 1020, 1026, 1032, 1038, 1044, 1050, 1056, 1062, 1068, 1074, 1080, 1086, 1092, 1098, 1104, 1110, 1116, 1122, 1128, 1134, 1140, 1146, 1152, 1158, 1164, 1170, 1176, 1182, 1188, 1194, 1200, 1206, 1212, 1218, 1224, 1230, 1236, 1242, 1248, 1254, 1260, 1266, 1272, 1278, 1284, 1290, 1296, 1302, 1308, 1314, 1320, 1326, 1332, 1338, 1344, 1350, 1356, 1362, 1368, 1374, 1380, 1386, 1392, 1398, 1404, 1410, 1416, 1422, 1428, 1434, 1440, 1446, 1452, 1458, 1464, 1470, 1476, 1482, 1488, 1494, 1500, 1506, 1512, 1518, 1524, 1530, 1536, 1542, 1548, 1554, 1560, 1566, 1572, ou 1578, de preferência, apenas os dois monômeros mais 5'-terminais do referido oligonucleotídeo compreendem ambos uma modificação de arcabouço de BNA.

[0040] Quando um oligonucleotídeo de acordo com a invenção compreende ou consiste em uma sequência representada pelas SEQ ID NOs: 13, 19, 25, 31, 37, 43, 49, 55, 61, 67, 73, 79, 85, 91, 97, 103, 109, 115, 121, 127, 133, 139, 145, 151, 157, 163, 169, 175, 181, 187, 193, 199, 205, 211, 217, 223, 229, 235, 241, 247, 253, 259, 265, 271, 277, 283, 289, 295, 301, 307, 313, 319, 325, 331, 337, 343, 349, 355, 361, 367, 373, 379, 385, 391, 397, 403, 409, 415, 421, 427, 433, 439, 445, 451, 457, 463, 469, 475, 481, 487,

493, 499, 505, 511, 517, 523, 529, 535, 541, 547, 553, 559, 565, 571, 577, 583, 589, 595, 601, 607, 613, 619, 625, 631, 637, 643, 649, 655, 661, 667, 673, 679, 685, 691, 697, 703, 709, 715, 721, 727, 733, 739, 745, 751, 757, 763, 769, 775, 781, 787, 793, 799, 805, 811, 817, 823, 829, 835, 841, 847, 853, 859, 865, 871, 877, 883, 889, 895, 901, 907, 913, 919, 925, 931, 937, 943, 949, 955, 961, 967, 973, 979, 985, 991, 997, 1003, 1009, 1015, 1021, 1027, 1033, 1039, 1045, 1051, 1057, 1063, 1069, 1075, 1081, 1087, 1093, 1099, 1105, 1111, 1117, 1123, 1129, 1135, 1141, 1147, 1153, 1159, 1165, 1171, 1177, 1183, 1189, 1195, 1201, 1207, 1213, 1219, 1225, 1231, 1237, 1243, 1249, 1255, 1261, 1267, 1273, 1279, 1285, 1291, 1297, 1303, 1309, 1315, 1321, 1327, 1333, 1339, 1345, 1351, 1357, 1363, 1369, 1375, 1381, 1387, 1393, 1399, 1405, 1411, 1417, 1423, 1429, 1435, 1441, 1447, 1453, 1459, 1465, 1471, 1477, 1483, 1489, 1495, 1501, 1507, 1513, 1519, 1525, 1531, 1537, 1543, 1549, 1555, 1561, 1567, 1573, ou 1579, de preferência, apenas os dois monômeros mais 3'-terminais do referido oligonucleotídeo compreendem ambos uma modificação de arcabouço de BNA.

[0041] Quando um oligonucleotídeo de acordo com a invenção compreende ou consiste em uma sequência representada por uma SEQ ID NO que não é SEQ ID NO: 1580, o referido oligonucleotídeo compreende, de preferência, 5-metilcitosinas em vez de citosinas, e o referido

oligonucleotídeo compreende, de preferência, pelo menos um monômero de 2'-O-metil fosforotioato, mais de preferência, compreende apenas monômeros de 2'-O-metil fosforotioato. Quando um oligonucleotídeo de acordo com a invenção compreende ou consiste em uma sequência representada por SEQ ID NO: 1580, o referido oligonucleotídeo compreende, de preferência, citosinas em vez de 5-metilcitosinas, e o referido oligonucleotídeo compreende, de preferência, pelo menos um monômero de 2'-O-metil fosforotioato, mais de preferência, compreende apenas monômeros de 2'-O-metil-fosforotioato. Sempre que uma SEQ ID NO fizer referência a T ou U e o referido monômero compreende uma modificação de arcabouço de BNA, o referido monômero (isto é, a referida referência) pode opcionalmente ser substituído por U ou T, respectivamente. Sempre que uma SEQ ID NO fizer referência a C ou 5-metil-C, e o referido monômero compreende uma modificação de arcabouço de BNA, a referida referência pode opcionalmente ser substituída por 5-metil-C ou C, respectivamente.

[0042] Ao longo deste pedido, uma modificação de arcabouço de BNA pode estar sempre compreendida em um oligonucleotídeo, a menos que explicitamente indicado em contrário. No entanto, por uma questão de legibilidade, isso nem sempre é explicitamente explicitado. Isto significa que sempre que se diz que um oligonucleotídeo

compreende ou consiste apenas em um tipo particular de monômero, isto não exclui a presença de modificações de arcabouço de BNA nos casos em que uma modificação de arcabouço de BNA é mencionada como estando presente. Por exemplo, um oligonucleotídeo que consiste apenas em monômeros de RNA 2'-O-metil pode, no entanto, compreender um monômero com uma modificação de arcabouço de BNA. Isso será aparente a partir do contexto (por exemplo, quando se diz que um AON consiste exclusivamente de um monômero, mas ainda compreende também uma modificação de arcabouço de BNA).

[0043] Em modalidades preferidas deste aspecto, é fornecido o oligonucleotídeo de acordo com a invenção, em que o referido oligonucleotídeo é complementar, de preferência, inversamente complementar a, ou se liga a, ou se direciona a, ou se hibridiza com, pelo menos uma parte de um região exônica e/ou não exônica, de preferência, em que o referido oligonucleotídeo compreende ou consiste em uma sequência que é complementar a, ou se liga a, ou se direciona a, ou se hibridiza com, pelo menos uma parte de uma sequência de reconhecimento de éxon (ERS), um silenciador de splicing exônico (ESS), um silenciador de splicing intrônico (ISS), um sítio de ligação de proteína SR, ou outro(a) elemento, sinal ou estrutura de splicing. Quando um tal oligonucleotídeo é complementar, entende-se

que também pode ser complementar inverso. Neste pedido, o termo "complementar" abrange ambas as sequências complementares diretas e complementarmente inversas, como será evidente para uma pessoa habilitada a partir do contexto.

[0044] Neste contexto, as sequências preferidas às quais o oligonucleotídeo de acordo com a invenção é complementar, ou às quais se liga, ou às quais se direciona, ou com as quais se hibridiza, são os éxons da distrofina, tais como, os éxons de pré-mRNA de distrofina 2 a 78. Os éxons da distrofina preferidos são os éxons 2 a 78, mais de preferência, os éxons 10 a 60, mais de preferência, os éxons 44 a 55, e as regiões não exônicas preferidas são os íntrons 1 a 78. Éxons mais preferidos, aos quais o oligonucleotídeo é complementar, ou ao qual se liga, ou ao qual se direciona, ou com os quais se hibridiza, são éxons de pré-mRNA de distrofina 44, 45, 51, 52, 53 e 55. Éxons preferidos aos quais o oligonucleotídeo é complementar, ou ao qual se liga, ou ao qual se direciona, ou com os quais se hibridiza, são os éxons de pré-mRNA de distrofina 44, 45, 51, 52, 53 e 55. Mais de preferência, um tal oligonucleotídeo hibridiza com pelo menos uma parte de um éxon de pré-mRNA de distrofina selecionado dos éxons 44, 45, 51, 52, 53 e 55, e tem um comprimento de 10 a 33 nucleotídeos, mais de preferência,

de 16 a 22 nucleotídeos. Consequentemente, em uma modalidade preferida, é fornecido um oligonucleotídeo de acordo com a invenção, em que o referido oligonucleotídeo é complementar, de preferência complementar inverso a pelo menos parte de uma região exônica e/ou não exônica, em que a referida pelo menos parte de uma região exônica e/ou não exônica tem um comprimento de 10 a 33 nucleotídeos, de preferência, de 16 a 22 nucleotídeos. Mais de preferência, a referida pelo menos parte de uma região exônica e/ou não exônica tem um comprimento de pelo menos 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32 ou 33 nucleotídeos. Por conseguinte, prefere-se que a referida pelo menos parte de uma região exônica e/ou não exônica tenha um comprimento de no máximo 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11 ou 10 nucleotídeos. Os comprimentos mais preferidos são 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22 nucleotídeos.

[0045] Adicionalmente, neste contexto, outras sequências preferidas às quais o oligonucleotídeo de acordo com a invenção é complementar, ou às quais se liga, ou às quais se direciona, ou com as quais se hibridiza, são elementos reguladores de splicing de *SMN2*, de preferência, tais como, nos íntrons 6 e 7, mais de preferência, tal como o silenciador de splicing ISS-N1 no íntron 7.

[0046] Consequentemente, em uma modalidade preferida é fornecido um oligonucleotídeo de acordo com a invenção, em que a referida região exônica e/ou não exônica está em um gene de DMD ou em um gene SMN. Um gene SMN pode ser um gene SMN1 ou um gene SMN2, de preferência, um gene SMN2.

[0047] De preferência, um oligonucleotídeo da invenção é representado por uma sequência de nucleotídeos compreendendo ou consistindo em uma sequência que é capaz de se ligar, se direcionar ou ser complementar, a uma parte de um éxon de pré-mRNA de distrofina. A referida parte de ligação ou direcionada pode ser pelo menos 50% do comprimento do oligonucleotídeo da invenção, ou pelo menos 60%, ou pelo menos 70%, ou pelo menos 80%, ou pelo menos 90% ou pelo menos 95%, ou 98% e até 100%. Um oligonucleotídeo pode ser representado por uma sequência de nucleotídeos, a referida sequência de nucleotídeos compreendendo uma sequência que se liga, se direciona ou é complementar, a pelo menos uma parte de pré-mRNA de distrofina como aqui definido e sequências flanqueadoras adicionais. Em uma modalidade mais preferida, o comprimento da referida parte de ligação ou direcionada do referido oligonucleotídeo é de pelo menos 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32 ou 33 nucleotídeos. Podem ser usados vários tipos de

sequências flanqueadoras. De preferência, as sequências de flanqueamento são usadas para modificar a ligação de uma proteína ao referido oligonucleotídeo, ou para modificar uma propriedade termodinâmica do referido oligonucleotídeo, mais de preferência, para modificar a afinidade de ligação a RNA alvo. Em outra modalidade preferida, sequências flanqueadoras adicionais são complementares a sequências de pré-mRNA de distrofina que não estão presentes no referido éxon. Tais sequências de flanqueamento são, de preferência, capazes de se ligar a sequências de direcionamento ou compreendendo ou consistindo no ponto de ramificação e/ou do aceitador do sítio de splicing ou sequências de consenso doadores do referido éxon. Em uma modalidade preferida, tais sequências flanqueadoras são capazes de se ligarem ou se direcionarem a sequências compreendendo ou consistindo em sequências de um íntron de pré-mRNA de distrofina que é adjacente ao referido éxon.

[0048] Oligonucleotídeos preferidos de acordo com a invenção são aqueles em que o referido oligonucleotídeo é representado por uma sequência de nucleotídeos compreendendo ou consistindo em SEQ ID NO: 8-1580 ou SEQ ID NO: 1592-1607, ou por uma sequência de nucleotídeos compreendendo ou consistindo em um fragmento de SEQ ID NO: 8-1580 ou SEQ ID NO: 1592-1607, de preferência, em que o referido oligonucleotídeo é representado por uma sequência

de nuclotídeos compreendendo ou consistindo em SEQ ID NO: 453-613 ou SEQ ID NO: 1592-1605 ou SEQ ID NO: 1607, ou por uma sequência de nucleotídeos compreendendo ou consistindo em um fragmento da SEQ ID NO: 1592-1605 453-613 ou SEQ ID NO: 1592-1605 ou SEQ ID NO: 1607, mais de preferência, em que o referido oligonucleotídeo é representado por uma sequência de nucleotídeos compreendendo ou consistindo em SEQ ID NO: 453, 455, 456, 459, 461, 462, 465, 467, 468, 471, 473, 474, 486, 483, 1592, 1593, 1594, 1595, 1596, 1597, 1598, 1599, 1600, 1601, 1602, 1603, 1604, 1605, ou 1607, ou por uma sequência de nucleotídeos compreendendo ou consistindo em um fragmento de SEQ ID NO: 453, 455, 4 56, 459, 461, 462, 465, 467, 468, 471, 473, 474, 486, 483 1592, 1593, 1594, 1595, 1596, 1597, 1598, 1599, 1600, 1601, 1602, 1603, 1604, 1605 ou 1607. No contexto da invenção, um fragmento de uma SEQ ID NO, de preferência, significa uma sequência de nuclotídeos compreendendo ou consistindo em pelo menos 10 nucleotídeos contíguos da referida SEQ ID NO.

[0049] Oligonucleotídeos mais preferidos de acordo com a invenção são aqueles em que o referido oligonucleotídeo é representado por uma sequência de nucleotídeos compreendendo ou consistindo em SEQ ID NO: 8-1580 ou SEQ ID NO: 1592-2099 ou SEQ ID NO: 3000-6048, ou por um nucleotídeo compreendendo ou consistindo em um fragmento de SEQ ID NO: 8-1580 ou SEQ ID NO: 1592-2099 ou

SEQ ID NO: 3000-6048, mais de preferência, em que o referido oligonucleotídeo é representado por uma sequência de nuclotídeos compreendendo ou consistindo em SEQ ID NOs: 455, 459, 4528, 4531, 4532, 4533, 4535, 4542, 4548 ou 4568, ou por uma sequência de nucleotídeos compreendendo ou consistindo em um fragmento de SEQ ID NOs: 455, 459, 4528, 4531, 4532, 4533, 4535, 4542, 4548 ou 4568.

[0050] Oligonucleotídeos mais preferidos de acordo com a invenção são aqueles em que o referido oligonucleotídeo é representado por uma sequência de nucleotídeos compreendendo ou consistindo em SEQ ID NO: 8-1580 ou SEQ ID NO: 1592-2099 ou SEQ ID NO: 3000-6048, ou por um nucleotídeo compreendendo ou consistindo em um fragmento de SEQ ID NO: 8-1580 ou SEQ ID NO: 1592-2099 ou SEQ ID NO: 3000-6048, de preferência, em que o referido oligonucleotídeo é representado por uma sequência de nuclotídeos compreendendo ou consistindo em SEQ ID NO: 453, 455, 456, 459, 461, 462, 465, 467, 468, 471, 473, 474, 483 ou 486, ou por uma sequência de nucleotídeos compreendendo ou consistindo em um fragmento de SEQ ID NO: 453, 455, 456, 459, 461, 462, 465, 467, 468, 471, 473, 474, 483 ou 486, mais de preferência, em que o referido oligonucleotídeo é representado por uma sequência de nuclotídeos compreendendo ou consistindo na SEQ ID NO: 452-613, 4528-4572, ou por uma sequência de nucleotídeos compreendendo ou consistindo em

um fragmento de SEQ ID NO: 452-613, 4528-4572, mais de preferência, em que o referido oligonucleotídeo é representado por uma sequência de nucleotídeos compreendendo ou consistindo em SEQ ID NO: 455, 459, 4528, 4531, 4532, 4533, 4535, 4542, 4548 ou 4568, ou por uma sequência de nucleotídeos compreendendo ou consistindo em um fragmento de SEQ ID NO: 455, 459, 4528, 4531, 4532, 4533, 4535, 4542, 4548 ou 4568.

[0051] Os AONs preferidos são aqueles em que o referido oligonucleotídeo induz modulação de splicing de pré-mRNA, de preferência, a referida modulação de splicing de pré-mRNA altera a produção ou a composição de proteína, que compreende, de preferência, salto de éxon ou inclusão de éxon, em que a referida modulação de splicing de pré-mRNA compreende, mais de preferência, o salto do éxon. Esta modulação de splicing de pré-mRNA é, de preferência, usada no contexto de uma aplicação terapêutica como aqui posteriormente definido.

[0052] O objetivo da modulação de splicing de pré-mRNA pode ser alterar a produção de proteína, mais frequentemente a proteína que o RNA codifica. Esta produção pode ser alterada através do aumento ou da diminuição do nível da referida produção. Esta produção pode também ser alterada através da alteração da composição da proteína que é realmente produzida, por exemplo, quando a modulação de

splicing de pré-mRNA resulta na inclusão ou na exclusão de um ou mais éxons, e em uma proteína que possui uma sequência de aminoácidos diferente. De preferência, uma tal proteína com uma sequência de aminoácidos diferente tem mais funcionalidade, ou tem uma funcionalidade melhor, ou tem pelo menos uma propriedade alterada, do que a proteína que é produzida como resultado da doença ou condição.

[0053] No caso da DMD, a modulação de splicing de pré-mRNA pode ser aplicada para salto de um ou mais éxons específicos no pré-mRNA de distrofina de modo a restaurar a fase de leitura aberta do transcrito e para induzir a expressão de uma proteína distrofina mais curta mas (mais) funcional, com o objetivo final de ser capaz de interferir com o curso da doença. Estratégias semelhantes permitem interferências no curso da BMD. No caso da modulação de splicing de pré-mRNA de SMA, pode ser aplicada para intensificar a inclusão do éxon 7 no gene SMN2 e aumentar os níveis de sobrevivência da proteína do neurônio motor, o que diminui a perda de neurônios motores na medula espinhal e subsequente atrofia de músculos voluntários. Como tal, em uma modalidade preferida, é fornecido um oligonucleotídeo de acordo com a invenção, em que o referido oligonucleotídeo induz a modulação de splicing de pré-mRNA, em que a referida modulação de splicing de pré-mRNA altera a produção de proteína que está relacionada com uma doença

ou condição, de preferência, em que a doença ou condição é Distrofia Muscular de Duchenne (DMD), Distrofia Muscular de Becker (BMD), ou Atrofia Muscular Espinhal (SMA).

[0054] De preferência, um AON é para uso na modulação de splicing de um pré-mRNA terapêutico. Um AON é, de preferência, um oligonucleotídeo que é complementar a uma sequência específica de pré-mRNA de distrofina ou SMN2 derivada da cadeia codificante de um DNA de um indivíduo. Este oligonucleotídeo se liga-se ou é direcionado à referida sequência do referido pré-mRNA. No contexto da invenção, um pré-mRNA terapêutico pode ser chamado de pré-mRNA com doença de um gene envolvido em uma doença genética. A modulação do splicing de um pré-mRNA terapêutico permite, por conseguinte, o tratamento da referida doença genética.

[0055] No caso de DMD ou de BMD, a modulação de splicing de pré-mRNA pode ser aplicada para salto de um ou mais éxons específicos no pré-mRNA de distrofina a fim de restaurar a fase de leitura aberta do transcrito e para induzir a expressão de uma proteína distrofina mais curta, mas (mais) funcional, com o objetivo final de ser capaz de retardar ou até parar a progressão da doença.

[0056] Em uma modalidade preferida, um oligonucleotídeo da invenção é usado para induzir o salto de éxons no pré-mRNA de distrofina em uma célula, em um

órgão, em um tecido e/ou em um indivíduo. O salto de éxons resulta em um mRNA de distrofina maduro que não contém um éxon saltado e assim, quando o referido éxon codifica aminoácidos, pode conduzir a expressão de um produto de proteína mais curto. O salto de pelo menos um éxon é, de preferência, induzido pela ligação de um AON a sequências internas a éxon específicas compreendendo elementos reguladores de splicing, os sítios de splicing e/ou sequências de ponto de ramificação intrônicos.

[0057] Em uma modalidade preferida, a invenção também abrange oligonucleotídeos, como descrito acima, que são adequados para o salto de múltiplos éxons, por vezes referido como multi-saltos. Um tal oligonucleotídeo, de acordo com a invenção, é capaz de se ligar a uma região de um primeiro éxon e a uma região de um segundo éxon no mesmo pré-mRNA, em que a referida região do referido segundo éxon tem pelo menos 50% de identidade com a referida região do referido primeiro éxon. Estes oligonucleotídeos são, de preferência, capazes de induzir o salto do referido primeiro éxon e do referido segundo éxon do referido pré-mRNA. De preferência, o salto de éxon(s) adicional(ais) é também induzido, em que o(s) éxon(s) adicional(ais) é/são, de preferência, localizado/s entre o referido primeiro e o referido segundo éxons. O transcrito resultante do referido pré-mRNAs, em que os referidos éxons são saltados, é

enquadrado. Mais detalhes de tais oligonucleotídeos são fornecidos em WO2014007620.

[0058] Como aqui definido, um pré-mRNA de DMD significa, de preferência, um pré-mRNA de um gene de DMD que codifica uma proteína distrofina. Um pré-mRNA de DMD mutado corresponde a um pré-mRNA de um paciente com DMD ou DMD com uma mutação quando comparado a um pré-mRNA de DMD de tipo selvagem de uma pessoa não afetada, resultando em (níveis reduzidos de) uma proteína aberrante (BMD), ou na ausência de distrofina funcional (DMD). Um pré-mRNA de DMD é também denominado pré-mRNA de distrofina. Um gene de DMD também pode ser denominado gene da distrofina. A distrofina e a DMD podem ser usadas de forma intercambiável ao longo do pedido.

[0059] Um paciente é, de preferência, destinado a significar um paciente tendo DMD ou BMD, como aqui posteriormente definido, ou um paciente susceptível de desenvolver DMD ou BMD devido à sua base genética. No caso de um paciente com DMD, um oligonucleotídeo usado irá, de preferência, corrigir uma mutação como presente no gene de DMD do referido paciente e criar uma proteína que se pareça com uma proteína de BMD: a referida proteína será, de preferência, uma distrofina funcional ou semifuncional como mais tarde definido aqui. No caso de um paciente com BMD, um oligonucleotídeo, como usado, irá, de preferência,

corrigir uma mutação como presente no gene de BMD do referido paciente e criar uma distrofina que será mais funcional do que a distrofina que estava originalmente presente no referido paciente com BMD.

[0060] Como aqui definido, uma distrofina funcional é, de preferência, uma distrofina do tipo selvagem correspondendo a uma proteína tendo a sequência de aminoácidos como identificada na SEQ ID NO: 1. Como aqui definido, uma distrofina semifuncional é, de preferência, uma distrofina como BMD correspondente a uma proteína tendo um domínio de ligação atuante na sua parte terminal N (primeiros 240 aminoácidos na terminação N), um domínio rico em cisteína (aminoácido 3361 até 3685) e um domínio terminal C (últimos 325 aminoácidos no terminal C), cada destes domínios estar presente em distrofina tipo selvagem como conhecida da pessoa habilitada. Os aminoácidos aqui indicados correspondem a aminoácidos da distrofina do tipo selvagem sendo representados pela SEQ ID NO: 1. Em outras palavras, uma distrofina funcional ou semifuncional é uma distrofina que exibe pelo menos em certa medida uma atividade de uma distrofina do tipo selvagem. "Pelo menos até certo ponto" significa, de preferência, pelo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% ou 100% de uma atividade correspondente de um distrofina funcional do tipo selvagem. Neste contexto, uma atividade de uma distrofina

funcional é, de preferência, se ligando à actina e ao complexo de glicoproteína associado à distrofina (DGC ou DAPC) (Ehmsen J et al, 2002).

[0061] A ligação da distrofina à actina e ao complexo DGC ou DAPC pode ser visualizada por co-imunoprecipitação usando extratos de proteína totais ou análise de imunofluorescência de seções transversais usando vários anticorpos reagindo com os diferentes membros do complexo, a partir de uma biópsia de controle (não-DMD) de um músculo suspeito de ser distrófico, pré e/ou pós-tratamento, como é do conhecimento da pessoa habilitada.

[0062] Indivíduos ou pacientes que sofrem de distrofia muscular de Duchenne têm tipicamente uma mutação no gene que codifica a distrofina (o gene de DMD ou distrofina) que impede a síntese da proteína completa, isto é, um códon de parada prematuro previne a síntese da terminação C. Na distrofia muscular de Becker, o gene da distrofina também compreende uma mutação em comparação com o tipo selvagem, mas a mutação não resulta tipicamente em um códon de parada prematuro e a terminação C é tipicamente sintetizada. Como resultado, sintetiza-se uma proteína distrofina funcional ou semifuncional que tem pelo menos a mesma atividade em espécie que a proteína do tipo selvagem, embora não necessariamente a mesma quantidade de atividade. O genoma de um paciente com BMD codifica tipicamente uma

proteína distrofina compreendendo a parte N terminal (primeiros 240 aminoácidos na terminação N), um domínio rico em cisteína (aminoácido 3361 até 3685) e um domínio C-terminal (últimos 325 aminoácidos no terminal C), mas na maioria dos casos o seu domínio em forma de bastonete central mais curto do que o de uma distrofina do tipo selvagem (Monaco et al., 1988). O salto de éxons induzido por oligonucleotídeos antissentido para o tratamento de DMD é tipicamente direcionado para ultrapassar uma parada prematura no pré-mRNA através do salto de um éxon, de preferência, no domínio em forma de bastonete central, para corrigir a fase de leitura aberta e permitir a síntese do restante da proteína distrofina incluindo a terminação C, embora a proteína seja um pouco menor como um resultado de um domínio de bastão menor. Em uma modalidade preferida, a um indivíduo tendo DMD e sendo tratado por um oligonucleotídeo tal como aqui definido, será fornecida uma distrofina que exhibe pelo menos, em certa medida, uma atividade de uma distrofina de tipo selvagem. Mais de preferência, se o referido indivíduo for um paciente de Duchenne ou se suspeitar que ele seja um paciente de Duchenne, uma distrofina funcional ou semifuncional é uma distrofina de um indivíduo tendo BMD: tipicamente, a distrofina é capaz de interagir com a actina e com a DGC ou DAPC, mas o seu domínio central em forma de bastão pode ser

mais curto do que o de uma distrofina do tipo selvagem (Monaco et al., 1988). O domínio de bastão central da distrofina do tipo selvagem compreende 24 repetições tipo espectrina. Por exemplo, um domínio em forma de haste central de uma distrofina, como aqui fornecido, pode compreender 5 a 23, 10 a 22 ou 12 a 18 repetições tipo espectrina, desde que possa se ligar à actina e à DGC.

[0063] Aliviando um ou mais sintoma(s) da Distrofia Muscular de Duchenne ou Distrofia Muscular de Becker em um indivíduo usando um oligonucleotídeo da invenção pode ser avaliado por qualquer um dos seguintes ensaios: prolongamento do tempo até à perda da marcha, melhoria da força muscular, melhoria da capacidade de levantar peso, a melhoria do tempo necessário para subir do solo, a melhoria do tempo de caminhada de nove metros, a melhoria no tempo de subida de quatro degraus, a melhoria do grau funcional da perna, a melhoria da função pulmonar, melhora da função cardíaca, melhora da qualidade de vida. Cada um destes ensaios é conhecido do perito. Como exemplo, a publicação de Manzur et al. (2008), dá uma explicação extensiva de cada um desses ensaios. Para cada um destes ensaios, logo que seja detectada uma melhoria ou um prolongamento detectável de um parâmetro medido em um ensaio, significa, de preferência, que um ou mais sintomas da Distrofia Muscular de Duchenne ou da Distrofia Muscular de Becker

tenham sido aliviados em um indivíduo usando um oligonucleotídeo da invenção. Melhoria ou prolongamento detectável é, de preferência, uma melhoria ou um prolongamento estatisticamente significativa/o, como descrito em Hodgetts et al. (2006). Alternativamente, o alívio de um ou mais sintoma/s da Distrofia Muscular de Duchenne ou da Distrofia Muscular de Becker pode ser avaliado medindo-se uma melhoria de uma função, integridade e/ou sobrevivência da fibra muscular. Em um método preferido, um ou mais sintoma(s) de um paciente com DMD ou BMD é/são aliviado/s e/ou uma ou mais característica(s) de uma ou mais células musculares de paciente com DMD ou BMD é/são melhorada/s. Tais sintomas ou características podem ser avaliados no nível celular, do tecido ou no próprio paciente.

[0064] Um alívio de uma ou mais características de uma célula muscular de um paciente pode ser avaliado por qualquer um dos seguintes ensaios em uma célula miogênica ou célula muscular de um paciente: redução da captação de cálcio pelas células musculares, síntese de colágeno diminuída, morfologia alterada, biossíntese de lipídeo alterado, estresse oxidativo diminuído e/ou função, integridade e/ou sobrevivência da fibra muscular melhorada/s. Esses parâmetros são geralmente avaliados por imunofluorescência e/ou análises histoquímicas de seções

transversais de biópsias musculares.

[0065] A melhoria da função, integridade e/ou sobrevivência da fibra muscular pode ser avaliada usando pelo menos um dos seguintes ensaios: uma diminuição detectável de creatina quinase no sangue, uma diminuição detectável da necrose das fibras musculares em uma seção transversal da biópsia de um músculo suspeito de ser distrófico, e/ou um aumento detectável da homogeneidade do diâmetro das fibras musculares em uma seção transversal da biópsia de um músculo suspeito de ser distrófico. Cada um destes ensaios é conhecido pela pessoa habilitada.

[0066] A creatina quinase pode ser detectada no sangue como descrito em Hodgetts et al. (2006). Uma diminuição detectável da creatina quinase pode significar uma diminuição de 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ou mais em comparação com a concentração de creatina quinase em um mesmo paciente com DMD ou BMD antes do tratamento.

[0067] Uma diminuição detectável de necrose de fibras musculares é, de preferência, avaliada em uma biópsia muscular, mais de preferência, como descrito em Hodgetts et al. (2006), usando seções transversais de biópsia. Uma diminuição detectável da necrose pode ser uma diminuição de 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ou mais da área, em que a necrose foi identificada

usando seções transversais da biópsia. A diminuição é medida por comparação com a necrose avaliada em um mesmo paciente com DMD ou BMD antes do tratamento.

[0068] Um aumento detectável da homogeneidade do diâmetro de uma fibra muscular é, de preferência, avaliado em uma seção transversal de biópsia muscular, mais de preferência como descrito em Hodgetts et al. (2006). O aumento é medido pela comparação com a homogeneidade do diâmetro de uma fibra muscular em um mesmo paciente com DMD ou BMD antes do tratamento.

[0069] Mais de preferência, um oligonucleotídeo da invenção fornece ao referido indivíduo uma proteína distrofina funcional ou semifuncional (tipicamente no caso de DMD) e é capaz de, pelo menos em parte, diminuir a produção de uma proteína distrofina aberrante no referido indivíduo (tipicamente no caso da BMD).

[0070] Diminuir a produção de um mRNA de distrofina aberrante, ou proteína distrofina aberrante, de preferência, significa que 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5% ou menos da quantidade inicial de mRNA aberrante de distrofina, ou proteína distrofina aberrante, ainda é detectável por RT-PCR (mRNA) ou imunofluorescência ou análise de western blot (proteína). Uma mRNA ou proteína aberrante da distrofina é também aqui referida como menos funcional (comparado com uma proteína distrofina funcional

de tipo selvagem como aqui anteriormente definida) ou um mRNA ou proteína de distrofina não funcional. Uma proteína distrofina não funcional é, de preferência, uma proteína distrofina que não é capaz de ligar actina e/ou membros do complexo proteico de DGC. Uma proteína distrofina não funcional ou mRNA de distrofina tipicamente não possui, ou não codifica uma proteína distrofina com uma terminação C intacta da proteína. A detecção de um mRNA ou uma proteína de distrofina funcional ou semifuncional pode ser feita como para um mRNA ou uma proteína aberrante da distrofina.

[0071] Uma vez que um paciente com DMD é fornecido com uma proteína distrofina funcional ou semifuncional, pelo menos parte da causa da DMD é retirada. Assim, seria de se esperar que os sintomas de DMD fossem pelo menos parcialmente aliviados, ou que a taxa com a qual os sintomas piorassem diminuísse, resultando em um declínio mais lento. A frequência de salto intensificada também aumenta o nível de proteína distrofina funcional ou semifuncional produzida em uma célula muscular de um indivíduo com DMD ou BMD.

[0072] A atrofia muscular espinhal (SMA) é um distúrbio genético, frequentemente fatal, que resulta da perda da proteína de SMN codificada pelo gene SMN de neurônio motor sobrevivente. Os genes SMN, SMN1 e SMN2, estão localizados no cromossomo 5 e a SMA é causada pela

perda de SMN1 de ambos os cromossomos. O SMN2, embora seja quase idêntico ao SMN1, é menos eficaz no fornecimento da proteína de SMN. O SMN1 codifica uma proteína de SMN de 38 kDa, ubiquamente expressada, que é necessária para a montagem do snRNP, um processo essencial para a sobrevivência da célula. SMN1 e SMN2 diferem por uma mutação crítica de C para T na posição 6 do éxon 7 (C6U no transcrito de SMN2). C6U não altera a sequência de codificação, mas é suficiente para causar o salto do éxon 7 no SMN2. Isto leva a uma proteína truncada instável, SMN Δ 7. A gravidade do SMA é afetada pela eficiência com a qual o SMN2, do qual existem várias cópias, produz sua proteína de SMN. Em pacientes com SMA, o SMN2 geralmente falha em compensar a perda de SMN1 devido ao salto do éxon 7, produzindo a proteína truncada instável, SMN Δ 7, que não pode garantir a sobrevivência da célula. Atualmente, o tratamento disponível para SMA consiste na prevenção e no controle do efeito secundário da perda crônica da unidade motora. Não há terapias farmacológicas disponíveis para o tratamento ou a prevenção da SMA. A tecnologia antissentido para comutação de splicing pode ser usada para fornecer novas terapias para o tratamento de SMA. Os agentes eficazes podem alterar o splicing dos pré-mRNAs de SMN2 e são provavelmente terapeuticamente úteis. Outra base

molecular da SMA pode ser a mutação pontual (E134K).

[0073] Os AONs preferidos intensificam o nível de mRNA de SMN2 contendo o éxon 7 em relação ao mRNA de SMN2 com eliminação do éxon 7 em uma célula. Os AONs são, de preferência, de comprimento e complementaridade adequados (mais de preferência, como definido mais adiante) de modo que os AONs especificamente hibridizem com uma região dentro do gene SMN2, de modo que o nível de mRNA de SMN2 contendo éxon 7 em relação ao mRNA de SMN2 eliminado por éxon na célula seja intensificado. Os AONs preferidos compreendem ou consistem em SEQ ID NO: 1400-1579. Um AON mais preferido compreende ou consiste na SEQ ID NO: 1490. No caso de SMA, a modulação de splicing de pré-mRNA pode ser aplicada para incluir um ou mais éxons, de preferência o éxon 7, no pré-mRNA de SMN2 de modo a aumentar os Níveis de SMN2 funcionais aumentando a expressão de mRNA ou proteína de SMN2 contendo éxon 7. Isso tem o objetivo final de ser capaz de retardar ou até parar a progressão da doença.

[0074] Em uma modalidade preferida, AON é usado para induzir a inclusão do éxon 7 em um pré-mRNA de SMN, de preferência, o pré-mRNAs de SMN2, em uma célula, em um órgão, em um tecido e/ou em um indivíduo. A inclusão de éxons resulta, de preferência, em um mRNA de SMN maduro que contém um éxon 7 saltado de outro modo e pode, assim,

conduzir a expressão de um produto de proteína mais funcional. A inclusão de pelo menos um éxon, de preferência o éxon 7, é de preferência induzida pela ligação de um AON a sequências específicas, de preferência, sequências internas de íntron, compreendendo elementos reguladores de splicing, sítios de splicing e/ou sequências de pontos de ramificação intrônicos.

[0075] Como aqui definido, um pré-mRNA de SMN1 significa, de preferência, um pré-mRNA de um gene SMN1 que codifica uma proteína de SMN. Como aqui definido, um pré-mRNA de SMN2 significa, de preferência, um pré-mRNA de um gene SMN2 que codifica para uma proteína de SMN. Nos casos em que o pré-mRNA de indivíduos que sofrem de SMA é discutido, um pré-mRNA de SMN2 é, por vezes, também designado por um pré-mRNA de SMN; isso ocorre porque em pacientes com SMA não está presente o gene SMN1 e, portanto, todo o pré-mRNA de SMN é pré-mRNA de SMN2. Um gene SMN2 também pode ser denominado gene SMN em tal caso.

[0076] Um paciente é, de preferência, destinado a significar um paciente tendo SMA, como aqui definido, ou um paciente suscetível de desenvolver SMA, devido à sua base genética. No caso de um doente com SMA, um oligonucleotídeo usado irá, de preferência, promover a inclusão do éxon 7 como presente no gene SMN2 do referido paciente e criar uma proteína de SMN funcional e não uma proteína de SMN Δ 7: a

referida proteína será, de preferência, uma proteína funcional ou semifuncional. SMN como posteriormente definido aqui. No caso de um paciente com SMA, um oligonucleotídeo como usado suprime, de preferência, ou reduz o efeito de uma mutação como presente no gene SMN2 do referido paciente e cria níveis aumentados de uma proteína de SMN que será mais funcional do que a proteína de SMN, frequentemente a proteína de SMN Δ 7, que estava originalmente presente no referido paciente com SMA. De preferência, a razão da proteína de SMN para a proteína SMN Δ 7 muda em favor da proteína de SMN funcional. As razões molares preferidas da proteína de SMN para a proteína de SMN Δ 7 que são detectadas após o tratamento são 5:4, 5:3, 5:2, 5:1 ou 10:1. Mais de preferência, a proteína de SMN Δ 7 não pode mais ser detectada, ou apenas em quantidades traço.

[0077] Como aqui definido, uma proteína de SMN funcional é, de preferência, um SMN de tipo selvagem correspondente a uma proteína tendo a sequência de aminoácidos identificada na SEQ ID NO:1581. De preferência, uma proteína de SMN funcional compreende o éxon 7. Este éxon 7 é identificado em SEQ ID NO: 1584. Em outras palavras, uma proteína de SMN funcional ou semifuncional é uma proteína de SMN que apresenta pelo menos em certa

medida uma atividade de uma proteína de SMN do tipo selvagem. "Pelo menos até certo ponto" significa, de preferência, pelo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% ou 100% de uma atividade correspondente de uma proteína de SMN funcional tipo selvagem. Neste contexto, as atividades preferidas de uma proteína de SMN funcional relacionam-se com a regeneração da telomerase, com a regulação da transcrição e com o tráfico celular, como é do conhecimento de uma pessoa habilitada. As atividades mais preferidas de uma proteína de SMN funcional são a formação de montagens funcionais de snRNP, e a interação com proteínas Sm (proteínas Smith).

[0078] O SMN funcional liga-se às caudas C-terminais ricas em Arg e Gly das proteínas Sm D1 e D3 (Selenko et al., 2001). Ensaio de ligação in vitro podem ser realizados para estudar esta interação, por exemplo, através da expressão de caudas C-terminais de Sm D1 e Sm D3 como proteínas de fusão glutathione-S-transferase (GST) e subsequentes experimentos

[0079] De imunoprecipitação com proteína de SMN isolada. SMN menos funcional mostrará menos ou nenhuma interação. Tais ensaios podem ser realizados usando extratos de proteína totais. Alternativamente, o SMN incluído no éxon 7 pode ser detectado através da análise de imunofluorescência de seções transversais de biópsia usando

vários anticorpos interagindo com a região codificada pelo éxon 7, ou com parte daquela região, ou com dobras presentes apenas no SMN que compreende o éxon 7. Comparação com biópsias sem SMA (controle) podem ser apropriadas, como é do conhecimento de uma pessoa habilitada.

[0080] Em uma modalidade preferida, um indivíduo tendo SMA e sendo tratado por uma AON como aqui definido será provido de uma proteína de SMN que exibe pelo menos, em certa medida, uma atividade de uma proteína de SMN do tipo selvagem, como tipicamente codificada pelo gene SMN1. Mais de preferência, se o referido indivíduo for um paciente com SMA ou se suspeitar que ele é um paciente com SMA, uma proteína de SMN funcional é uma proteína de SMN com o éxon 7 incluído, como tipicamente codificado pelo gene SMN1.

[0081] O alívio de um ou mais sintomas de SMA em um indivíduo usando um AON pode ser avaliado por qualquer um dos seguintes ensaios: melhoria no ganho de peso de um indivíduo, melhoria na atividade motora de um indivíduo, e aumento do tempo de sobrevivência, seja de um indivíduo, ou de células de neurônios motores, e aumento da produção de SMN funcional. Cada um destes parâmetros é conhecido da pessoa habilitada e pode ser ensaiado rotineiramente. Para cada um destes ensaios, logo que se tenha verificado uma melhoria ou um prolongamento detectável de um parâmetro

medido em um ensaio, significa, de preferência, que um ou mais sintomas de SMA foram aliviados em um indivíduo usando um oligonucleotídeo de acordo com a invenção. Melhoria detectável ou prolongamento é, de preferência, uma melhoria ou um prolongamento estatisticamente significativa/o. Alternativamente, o alívio de um ou mais sintoma/s de SMA pode ser avaliado medindo-se uma melhoria da função muscular, integridade e/ou sobrevivência. Em um método preferido, um ou mais sintoma/s de um paciente com SMA é/são aliviado/s e/ou uma ou mais característica/s de uma ou mais célula/s muscular/es de um paciente com SMA é/são melhorada/s. Tais sintomas ou características podem ser avaliado(a)s no nível celular, do tecido ou no próprio paciente.

[0082] Um alívio de uma ou mais características de uma célula de neurônio motor de um paciente pode ser avaliado por qualquer um dos seguintes ensaios em uma célula de um paciente: redução da captação de cálcio, diminuição da produção de snRNP, diminuição da síntese de colágeno, morfologia alterada, biossíntese alterada de lipídeos, diminuição do estresse oxidativo e/ou melhora da função, integridade e/ou sobrevivência muscular. Esses parâmetros são geralmente avaliados por análises por imunofluorescência e/ou histoquímicas de seções transversais de biópsias, tais como biópsias musculares.

[0083] Um aumento detectável na sobrevivência do neurônio motor é, de preferência, avaliado em uma biópsia muscular, usando seções transversais de biópsia. Um aumento detectável da sobrevivência pode ser um aumento de 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ou mais, em comparação com amostras de controle não tratadas, ou taxas conhecidas ou anteriores de sobrevivência. O aumento é medido por comparação com a sobrevivência avaliada em um mesmo paciente com SMA antes do tratamento.

[0084] Um aumento detectável na sobrevivência de neurônios motores pode ser avaliado como conhecido da pessoa habilitada, por exemplo, usando métodos como descrito em Lunn et al., 2004.

[0085] De preferência, um AON fornece ao referido indivíduo uma proteína de SMN funcional ou semifuncional e capaz de, pelo menos em parte, diminuir a produção de uma proteína de SMN aberrante, tal como SMN Δ 7 no referido indivíduo.

[0086] Diminuir a produção de um mRNAs de SMN aberrante, ou proteína de SMN aberrante significa, de preferência, que 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5% ou menos da quantidade inicial A de mRNA de SMN aberrante, ou proteína de SMN aberrante, ainda é detectável por RT-PCR (mRNA) ou análise por imunofluorescência ou Western blot (proteína). Um mRNA ou proteína de SMN

aberrante também é referido aqui como uma menos funcional (comparada com uma proteína de SMN funcional do tipo selvagem como aqui anteriormente definido) ou um mRNA ou proteína de SMN não funcional. Uma proteína de SMN não funcional é, de preferência, uma proteína de SMN que não é capaz de ligar proteínas Sm e/ou que não promove, ou que dificulta, a montagem snRNP. Uma proteína de SMN não funcional ou um mRNA de SMN tipicamente não tem, ou não codifica, a sequência de aminoácidos codificada pelo éxon 7. A detecção de um mRNA ou uma proteína de SMN funcional ou semifuncional pode ser feita como para um mRNA ou uma proteína de SMN aberrante.

[0087] Uma vez que um paciente com SMA é proporcionado com uma proteína de SMN funcional ou semifuncional, pelo menos parte da causa da SMA é retirada. Assim, seria de esperar que os sintomas da SMA fossem pelo menos parcialmente aliviados, ou que a taxa com que os sintomas piorassem fosse reduzida, resultando em um declínio mais lento. A frequência de inclusão intensificada também aumenta o nível de proteína de SMN funcional ou semifuncional produzida em uma célula de um indivíduo com SMA.

[0088] Os éxons e íntrons contêm uma ou mais sequências específicas compreendendo elementos reguladores de splicing que mostraram ser alvos eficazes para

oligonucleotídeos antissentido. Uma modalidade fornece, portanto, um oligonucleotídeo para proporcionar ao referido indivíduo uma distrofina funcional ou semifuncional ou proteína de SMN, em que o referido oligonucleotídeo compreende uma sequência que se liga especificamente e/ou bloqueia estes elementos reguladores de splicing em uma distrofina ou éxon ou íntron de pré-mRNA de SMN2. Além disso, uma vez que um éxon só será incluído no mRNA resultante quando ambos os sítios de splicing são reconhecidos pelo complexo de spliceossoma, os sítios de splicing são outros alvos para um oligonucleotídeo da invenção. Uma modalidade fornece, portanto, um oligonucleotídeo para proporcionar ao referido indivíduo uma distrofina funcional ou semifuncional, ou proteína de SMN, em que o referido oligonucleotídeo compreende uma sequência que se liga especificamente e/ou bloqueia um ou ambos os sítios de splicing de um éxon de uma distrofina ou pré-mRNA de SMN2. Usualmente, um sítio de splicing de um éxon compreende 1, 2, 3 ou mais nucleotídeos presentes no referido éxon e 1, 2, 3 ou mais nucleotídeos presentes em um íntron adjacente ou vizinho. Em uma modalidade, um oligonucleotídeo é usado que se liga apenas a uma região intrônica de uma distrofina ou pré-mRNA de SMN2. No entanto, isto não é necessário: também é possível usar um oligonucleotídeo que se direciona, ou se liga, a uma

sequência específica do íntron, bem como a uma sequência específica do éxon. Evidentemente, um oligonucleotídeo não é necessariamente ligado a toda a sequência de uma distrofina ou éxon ou íntron de SMN2. Os oligonucleotídeos que são especificamente parte de ligação desse éxon ou íntron são preferidos. Um oligonucleotídeo é usado, o referido oligonucleotídeo é, de preferência, complementar a, liga-se a, ou é direcionada a, pelo menos parte de um éxon e/ou íntron, a referida tendo parte pelo menos 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32 ou 33 nucleotídeos.

[0089] O splicing de um pré-mRNA ocorre por meio de duas reações de transesterificação sequenciais envolvendo um ponto de ramificação intrônico e um sítio de splicing de um íntron adjacente. Assim, um oligonucleotídeo é, de preferência, usado para salto do éxon, em que o referido oligonucleotídeo compreende uma sequência que se liga a esse ponto de ramificação e/ou sítio de splicing. De preferência, o referido sítio de splicing e/ou ponto de ramificação está presente em um pré-mRNA de distrofina.

[0090] Uma vez que os sítios de splicing contêm sequências de consenso, o uso de uma parte de oligonucleotídeo ou um equivalente funcional do mesmo compreendendo uma sequência que é capaz de se ligar a um sítio de splicing envolve o risco de hibridização

promíscua. A hibridização do referido oligonucleotídeo com outros sítios de splicing diferentes dos sítios do éxon a ser saltado pode facilmente interferir com a precisão do processo de splicing. Para ultrapassar estes outros problemas potenciais relacionados ao uso de um oligonucleotídeo que se liga a um sítio de splicing, a modalidade mais preferida fornece um oligonucleotídeo para proporcionar o referido indivíduo com uma distrofina funcional ou semifuncional ou proteína de SMN, em que o referido oligonucleotídeo ou um equivalente funcional do mesmo, ligando-se a uma parte específica de um éxon de pré-mRNA de distrofina ou de um éxon ou íntron de mRNAs de SMN2. Os éxons contêm sequências de codificação que são tipicamente mais específicas que as sequências de íntron não codificantes. De preferência, a referida ligação de oligonucleotídeos a uma parte específica de um éxon de pré-mRNA de distrofina capaz de especificamente bloquear, interferir e/ou inibir uma sequência e/ou estrutura reguladora de splicing do/s éxon/s antecipado/s na referida distrofina ou no pré-mRNA de SMN2. Interferir com tal sequência e/ou estrutura reguladora de splicing tem a vantagem de tais elementos estarem localizados dentro do éxon. O risco de efeitos fora do alvo relacionados à sequência é, portanto, limitado. No caso do salto de éxon, proporcionando um oligonucleotídeo para o interior do éxon

a ser saltado, é possível mascarar o éxon do aparelho de splicing. A falha do aparelho de splicing em reconhecer o éxon a ser saltado, leva, assim, à exclusão do éxon do mRNA final. No caso da inclusão de éxon, proporcionando um oligonucleotídeo para bloquear, por exemplo, um silenciador de splicing intrônico (ISS), é conseguido um aumento na inclusão de éxon. A hibridização de AONs para a região de ISS pode deslocar repressores negativos transatruante e/ou pode desenrolar um enovelamento em hastes de RNA de atuação cis que interfere com a ligação de RNA nuclear pequeno U1 no sítio de splicing 5' do éxon para ser incluído. Estas modalidades não interferem diretamente com o processo enzimático do mecanismo de splicing (splicing dos éxons). Acredita-se que isso permita que o método seja mais específico e/ou confiável.

[0091] Dentro do contexto da invenção, um oligonucleotídeo da invenção pode compreender um equivalente funcional de um oligonucleotídeo. Um equivalente funcional de um oligonucleotídeo significa, de preferência, um oligonucleotídeo como aqui definido, em que um ou mais nucleotídeos foram substituídos e em que uma atividade do referido equivalente funcional é retida, pelo menos em certa medida. De preferência, uma atividade do referido oligonucleotídeo compreendendo um equivalente funcional de um oligonucleotídeo proporciona uma distrofina

funcional ou semifuncional ou uma proteína de SMN. A referida atividade do referido oligonucleotídeo compreendendo um equivalente funcional de um oligonucleotídeo é assim, de preferência, avaliada por quantificação da quantidade de uma distrofina funcional ou semifuncional ou de uma proteína de SMN. Uma distrofina funcional ou semifuncional é aqui, de preferência, definida como sendo uma distrofina capaz de se ligar a actina e membros do complexo proteico DGC (ou DAPC). A avaliação da referida atividade do referido equivalente funcional de um oligonucleotídeo é, de preferência, realizada por RT-PCR e sequenciação (ao nível de RNA; para detecção de salto de éxons específicos (DMD) ou inclusão (SMA)) ou por imunofluorescência e análises de Western blot (no nível de proteína: para detecção de restauração proteica). A referida atividade é, de preferência, retida até, pelo menos parcialmente, quando representa pelo menos 50%, ou pelo menos 60%, ou pelo menos 70% ou pelo menos 80% ou pelo menos 90% ou pelo menos 95% ou mais da atividade correspondente do referido oligonucleotídeo deriva o equivalente funcional. Ao longo deste pedido, quando a palavra oligonucleotídeo é utilizada, pode ser substituída por um equivalente funcional do mesmo, como aqui definido. Ao longo deste pedido, quando a palavra oligonucleotídeo é usada, pode ser substituído por um oligonucleotídeo

antissentido, como aqui definido, a menos que indicado de outro modo.

[0092] Assim, o uso de um oligonucleotídeo de acordo com a invenção ou um equivalente funcional do mesmo, compreendendo um monômero 2'-O-metila, de preferência, um monômero de RNA 2'-O-metila, ou consistindo em RNA 2'-O-metila e opcionalmente compreendendo fosforotioato, e compreendendo pelo menos uma modificação de arcabouço de BNA com ou sem uma base de 5-metilpirimidina (isto é, uma 5-metilcitosina e/ou um 5-metiluracila) e sendo representada por uma sequência de nucleotídeos compreendendo ou consistindo em uma sequência que é complementar a, se liga a ou se direciona a, ou se hibridiza com uma distrofina ou um éxon ou íntron de pré-mRNA de SMN2 assumindo-se que tem um efeito positivo em pelo menos um dos parâmetros do referido oligonucleotídeo, como já aqui definido, quando comparado com os seus homólogos compreendem qualquer modificação de arcabouço de BNA com/ou sem 5-metilcitosina e/ou 5-metiluracila como aqui indicado anteriormente, e assume-se portanto que apresenta um resultado terapêutico melhorado em uma DMD ou em uma BMD ou em uma célula de SMA de um paciente e/ou em DMD ou BMD ou paciente com SMA. Tal resultado terapêutico pode ser caracterizado por aliviar um ou mais sintomas de DMD ou BMD ou SMA. Tal resultado terapêutico pode também ou

alternadamente ser caracterizado por:

- reduzir a taxa de aumento ou agravamento de um ou mais dos referidos sintomas, e/ou
- aliviar uma ou mais características de uma célula muscular de um paciente e/ou
- fornecer ao referido indivíduo uma distrofina funcional ou semifuncional ou proteína de SMN e/ou
- diminuir a perda de neurônios motores na medula espinhal e/ou
- diminuir a atrofia dos músculos voluntários e/ou - pelo menos em parte, diminuir a produção de uma proteína distrofina aberrante no referido indivíduo.

[0093] Cada um desses recursos já foi definido aqui.

[0094] De preferência, um oligonucleotídeo representado por uma sequência de nucleotídeos que compreende ou consiste em uma sequência que se liga a, é direcionada a, ou sendo complementar a, pelo menos uma parte de distrofina ou pré-mRNA de SMN2, o referido oligonucleotídeo tendo um comprimento de pelo menos 10 nucleotídeos. No entanto, o comprimento do referido oligonucleotídeo pode ser de pelo menos 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32 ou 33 nucleotídeos.

[0095] Uma modalidade preferida fornece um

oligonucleotídeo para proporcionar ao referido indivíduo uma distrofina funcional ou semifuncional ou uma proteína de SMN, o referido oligonucleotídeo ou um equivalente funcional do mesmo, sendo representado por uma sequência que compreende:

- uma sequência que se liga a, se direciona a, se hibridiza com, ou é complementar a, uma região de um distrofina ou pré-mRNA de SMN2 que é hibridizado com outra parte de uma distrofina ou de éxon de pré-mRNA SMN2 (estrutura fechada), e

- uma sequência que se liga a, se direciona a, se hibridiza ou é complementar a uma região de um éxon de pré-mRNA de SMN2 ou de distrofina que não seja hibridizado na referida distrofina ou no pré-mRNA de SMN2 (estrutura aberta).

[0096] Para esta modalidade, é feita referência ao pedido de patente WO 2004/083446. As moléculas de RNA exibem fortes estruturas secundárias, principalmente devido ao pareamento de bases de segmentos complementares ou parcialmente complementares dentro do mesmo RNA. Há muito se pensava que as estruturas do RNA desempenham um papel na função do RNA. Sem estar limitado pela teoria, acredita-se que a estrutura secundária do RNA de um éxon desempenha um papel na estruturação do processo de splicing. Através de sua estrutura, um éxon é reconhecido como uma parte que

precisa ser incluída no mRNA. Em uma modalidade, um oligonucleotídeo é capaz de interferir com a estrutura do éxon e, por conseguinte, capaz de interferir com o aparelho de splicing do referido éxon, mascarando o éxon do aparelho de splicing e induzindo desse modo o salto do referido éxon. Verificou-se que muitos oligonucleotídeos compreendem, de fato, esta capacidade, alguns mais eficientes do que outros. Sem estar limitado pela teoria, pensa-se que a sobreposição com uma estrutura aberta melhora a eficiência de invasão do oligonucleotídeo (isto é, aumenta a eficiência com a qual o oligonucleotídeo pode entrar na estrutura), enquanto a sobreposição com a estrutura fechada aumenta subsequentemente a eficiência de interferência com a estrutura secundária do RNA do éxon. Verificou-se que a duração da complementaridade parcial com a estrutura fechada e aberta não é extremamente restrita. Foram observadas eficiências altas com compostos compreendendo oligonucleotídeos com comprimentos variáveis de complementaridade em qualquer estrutura. O termo complementaridade (inversa) é aqui usado para referir um segmento de ácidos nucleicos que pode hibridizar com outro segmento de ácidos nucleicos sob condições fisiológicas. De um modo geral, diz-se que uma cadeia antissentido é complementar a uma cadeia de sentido correspondente. Neste contexto, um oligonucleotídeo antissentido é complementar

ao seu alvo. As condições de hibridização são posteriormente definidas aqui. Assim, não é absolutamente necessário que todas as bases na região de complementaridade sejam capazes de emparelhar com bases na cadeia oposta. Por exemplo, quando se desenha um oligonucleotídeo antissentido, pode-se querer incorporar, por exemplo, um resíduo que não seja par de bases com a base na cadeia complementar. As incompatibilidades podem, até certo ponto, ser permitidas, se nas circunstâncias da célula, o segmento de nucleotídeos for capaz de hibridizar com a parte complementar.

[0097] Em uma modalidade preferida, uma parte complementar de um oligonucleotídeo antissentido (para a referida estrutura aberta ou para a referida estrutura fechada) compreende pelo menos 3 e, mais de preferência, pelo menos 4 nucleotídeos consecutivos. As regiões complementares são, de preferência, concebidas de modo que, quando combinadas, sejam específicas para um éxon em um pré-mRNA. Tal especificidade pode ser criada com vários comprimentos de regiões complementares, pois isso depende das sequências reais em outro (pré)mRNA no sistema. O risco de que também um ou mais outros pré-mRNAs sejam capazes de hibridizar com um oligonucleotídeo diminui com o aumento do tamanho do referido oligonucleotídeo. É claro que um oligonucleotídeo antissentido compreendendo

incompatibilidades na região de complementaridade, mas que retém a capacidade de hibridizar com a(s) região(ões) direcionada(s) no pré-mRNA, pode ser usado na presente invenção. No entanto, de preferência, pelo menos, as partes complementares não compreendem tais incompatibilidades, uma vez que estes tipicamente têm uma eficiência mais elevada e uma especificidade mais elevada do que o oligonucleotídeo que apresenta tais incompatibilidades em uma ou mais regiões complementares. Pensa-se que forças de hibridização mais altas (isto é, um número crescente de interações com a cadeia oposta) são favoráveis no aumento da eficiência do processo de interferência com o mecanismo de splicing do sistema.

[0098] De preferência, para os AONs que são adequados para induzir um único salto de éxon, a complementaridade é de 90 a 100%. Em geral, isto permite 1 ou 2 incompatibilidade/s em um oligonucleotídeo de 20 nucleotídeos ou 1 a 4 incompatibilidades em um oligonucleotídeo de 40 nucleotídeos. Portanto, podemos ter 1, 2, 3, 4, 5 incompatibilidades em um oligonucleotídeo de 10 a 50 nucleotídeos. De preferência, 0, 1 ou 2 incompatibilidades estão presentes em um oligonucleotídeo de 10 a 50 nucleotídeos.

[0099] Para os chamados AONs de multi-saltos (AONs que são capazes de se ligarem a uma região de um primeiro

éxon e a uma região de outro éxon (isto é, um segundo éxon) dentro do mesmo pré-mRNA, em que referida região do referido segundo éxon tem pelo menos 50% de identidade com a referida região do referido primeiro éxon) é, de preferência, pelo menos 80% complementar à referida região do referido primeiro éxon e pelo menos 45% complementar à referida região do referido segundo éxon. Mais de preferência, o referido oligonucleotídeo antissentido é pelo menos 85%, 90%, 95% ou 100% complementar à referida região do referido primeiro e pelo menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% complementares à referida região do referido segundo éxon. A complementaridade é, de preferência, mas não necessariamente avaliada ao longo de todo o comprimento do oligonucleotídeo.

[00100] Para os chamados AONs de multi-saltos, uma região de um primeiro éxon pode ser de pelo menos 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, ou até 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200 ou mais nucleotídeos. Uma região de um primeiro éxon também pode ser definida como sendo pelo menos 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%,

80%, 90% ou 100% do comprimento do referido éxon. Uma região de um primeiro éxon pode ser chamada de região de identidade.

[00101] Para os chamados AONs de multi-saltos, uma região de um segundo éxon pode ser pelo menos 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80 ou até 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200 ou mais nucleotídeos. Uma região de um segundo éxon pode ser definida como sendo pelo menos 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ou 100% do comprimento do referido éxon. Uma região de um segundo éxon pode ser chamada de região de identidade. As características adicionais preferidas dos chamados AONs de multi-saltos são descritas em WO2014007620.

[00102] A estrutura (isto é, estruturas abertas e fechadas) é melhor analisada no contexto do pré-mRNA em que o éxon reside. Tal estrutura pode ser analisada no RNA real. No entanto, é atualmente possível prever a estrutura secundária de uma molécula de RNA (com menores custos de energia) usando programas de modelagem de estrutura. Exemplos não limitantes de um programa adequado são a RNA structure versão 4.5 ou a RNA mfold versão 3.5 (Zuker et

al., 2003). Uma pessoa habilitada na técnica será capaz de prever, com reprodutibilidade adequada, uma estrutura provável de um éxon, dada uma sequência de nucleotídeos. As melhores previsões são obtidas ao fornecer tais programas de modelagem com o éxon e com as sequências de íntron flanqueadoras. Tipicamente, não é necessário modelar a estrutura de todo o pré-mRNA.

[00103] As estruturas aberta e fechada para as quais o oligonucleotídeo de um oligonucleotídeo é direcionado, são de preferência adjacentes uma a outra. Pensa-se que deste modo o anelamento do oligonucleotídeo com a estrutura aberta induz a abertura da estrutura fechada após a qual que o anelamento progride para dentro desta estrutura fechada. Através desta ação, a estrutura anteriormente fechada assume uma conformação diferente. No entanto, quando as sequências aceitadoras e/ou doadoras potenciais (ocultas) estão presentes no éxon direcionado, ocasionalmente um novo sinal de inclusão de éxons é gerado definindo um (neo)éxon diferente, isto é, com uma extremidade 5' diferente, uma extremidade 3' diferente, ou ambos. Este tipo de atividade está dentro do escopo da presente invenção, uma vez que o éxon direcionado é excluído do mRNA. A presença de um novo éxon, contendo parte do éxon direcionado, no mRNA, não altera o fato de que o éxon direcionado, como tal, é excluído. A inclusão de

um neo-éxon pode ser vista como um efeito colateral que ocorre apenas ocasionalmente. Existem duas possibilidades quando o salto do éxon é usado para restaurar (parte de) uma fase de leitura aberta da distrofina que é interrompido como um resultado de uma mutação. Uma delas é que o neo-éxon é funcional na restauração da fase de leitura, enquanto no outro caso a fase de leitura não é restaurada. Quando se seleciona um composto compreendendo um oligonucleotídeo para restabelecer fases de leitura aberta por meio de salto de éxon, evidentemente claro que sob estas condições são selecionados aqueles compostos compreendendo esses oligonucleotídeos que de fato resultam em salto de éxons que restaura a fase de leitura aberta de distrofina; com ou sem um neo-éxon.

[00104] É ainda fornecido um oligonucleotídeo para proporcionar ao referido indivíduo uma proteína distrofina funcional ou semifuncional, em que o referido oligonucleotídeo ou um equivalente funcional do mesmo é um oligonucleotídeo como descrito acima, isto é, compreende um monômero 2'-O-metila ou consiste em monômeros de 2'-O-metila, de preferência monômeros de RNA 2'-O-metila, e opcionalmente compreende fosforotioato, e compreende ainda um arcabouço de BNA com ou sem uma 5-metilpirimidina (isto é, uma 5-metilcitosina e/ou um 5-metiluracila) e é representado por uma sequência de nuclotídeos compreendendo

uma sequência que é complementar ou se liga a, ou se direciona a, ou se hibridiza com, um sítio de ligação para uma proteína serina-arginina (SR) em RNA de um éxon de um pré-mRNA de distrofina. No pedido de patente de WO 2006/112705, foi descrita a presença de uma correlação entre a eficácia de um oligonucleotídeo antissentido interno ao éxon na indução do salto do éxon e na presença de um (por exemplo, pelo ESEfinder) sítio de ligação SR previsto no sítio de pré-mRNA alvo do referido AON. Por conseguinte, em uma modalidade, um oligonucleotídeo é gerado compreendendo a determinação de um sítio de ligação (putativo) para uma proteína SR (Ser-Arg) no RNA de um éxon de distrofina e a produção de um composto correspondente compreendendo oligonucleotídeo que é complementar ao, se liga a ou é direcionada ao, ou hibridiza com o, referido RNA e que, pelo menos parcialmente, se sobrepõe ao referido sítio de ligação (putativo). O termo "pelo menos parcialmente sobrepõe-se" é aqui definido como compreendendo uma sobreposição de apenas um único nucleotídeo de um sítio de ligação SR, bem como múltiplos nucleotídeos do referido sítio de ligação, bem como uma sobreposição completa do referido sítio de ligação. Esta modalidade compreende ainda, de preferência, a determinação de uma estrutura secundária do referido RNA, uma região que é hibridizada com outra parte do referido RNA (estrutura

fechada) e uma região que não é hibridizada na referida estrutura (estrutura aberta), e subsequentemente gerando um oligonucleotídeo que pelo menos parcialmente sobrepõe o referido sítio de ligação (putativo) e isso sobrepõe pelo menos parte da referida estrutura fechada e sobrepõe-se a pelo menos parte da referida estrutura aberta. Desta forma, aumentamos a chance de obter um oligonucleotídeo que é capaz de interferir na inclusão do éxon do pré-mRNA para mRNA. É possível que uma primeira região de ligação a SR selecionada não tenha a estrutura fechada-aberta solicitada, caso em que é selecionado outro (segundo) sítio de ligação da proteína SR, que é subsequentemente testado quanto à presença de uma estrutura aberta-fechada. Este processo é continuado até que seja identificada uma sequência que contenha um sítio de ligação da proteína SR bem como uma estrutura aberta-fechada (parcialmente sobreposta). Esta sequência é então usada para desenhar um oligonucleotídeo que é complementar à referida sequência.

[00105] Um tal método para gerar um oligonucleotídeo antissentido é também realizado invertendo a ordem descrita, isto é, primeiro gerando um oligonucleotídeo compreendendo a determinação, a partir de uma estrutura secundária de RNA de um éxon de distrofina, uma região que assume uma estrutura que é hibridizada com outra parte do referido RNA (estrutura fechada) e uma região que não é

hibridizada na referida estrutura (estrutura aberta), e subsequentemente gerando um oligonucleotídeo, das quais pelo menos uma parte do referido oligonucleotídeo é complementar à referida estrutura fechada e em que pelo menos uma outra parte do referido oligonucleotídeo é complementar à referida estrutura aberta. Isto é então seguido determinando se um sítio de ligação da proteína SR, pelo menos, se sobrepõe à referida estrutura aberta/fechada. Desta forma, o método do WO 2004/083446 é melhorado. Ainda em outra modalidade, as seleções são realizadas simultaneamente.

[00106] Sem querer estar vinculado por qualquer teoria, pensa-se atualmente que o uso de um oligonucleotídeo dirigido ou direcionado para um sítio de ligação da proteína SR resulta (pelo menos parcialmente) no comprometimento da ligação de uma proteína SR ao sítio de ligação de uma proteína SR que resulta em splicing interrompido ou comprometido.

[00107] De preferência, uma estrutura aberta/fechada e um sítio de ligação da proteína SR parcialmente sobrepostos, e ainda mais de preferência, uma estrutura aberta/fechada sobrepõe completamente um sítio de ligação da proteína SR ou um sítio de ligação da proteína SR se sobrepõe completamente a uma estrutura aberta/fechada. Isso permite uma melhor interrupção da inclusão do éxon.

[00108] Além do sítio de splicing de consenso e sequências intrônicas de ponto de ramificação de consenso, muitos (se não todos) éxons contêm sequências reguladoras de splicing, tais como, mas não se limitando a, sequências intensificadoras de splicing exônico (ESE) para facilitar o reconhecimento de sítios reguladores de splicing genuínos pelo spliceossoma (Cartegni et al., 2002 e Cartegni et al., 2003). Um subgrupo de fatores de splicing, chamado de proteínas SR, pode se ligar a essas ESEs e recrutar outros fatores de splicing, tais como U1 e U2AF para sítios de splicing (fracamente definidos). Os sítios de ligação das quatro proteínas SR mais abundantes (SF2/ASF, SC35, SRp40 e SRp55) foram analisados em detalhes e esses resultados são implementados no ESEfinder, uma fonte da web que prevê potenciais sítios de ligação para estas proteínas SR (Cartegni et al., 2002, e Cartegni et al., 2003). Em modalidades em que o AON para o salto do éxon, existe uma correlação entre a eficácia de um AON e a presença/ausência de um sítio de ligação SF2/ASF, SC35 e SRp40 no sítio direcionado do referido AON. Em uma modalidade preferida, a invenção fornece assim um oligonucleotídeo como descrito acima, que é complementar a, ou direcionado a, ou se liga a, um sítio de ligação para uma proteína SR. De preferência, a referida proteína SR é SF2/ASF ou SC35 ou SRp40. Em modalidades onde o AON é para a inclusão de éxon,

existe uma correlação entre a eficácia de um AON e a presença de um sítio de ligação de RNA nuclear pequeno U1 ou um sítio de ligação de RNA nuclear heterogêneo (hnRNP) ou uma ribonucleoproteína nuclear pequena (snRNP) no sítio direcionado pelo AON. Em uma modalidade preferida, a invenção fornece um oligonucleotídeo como descrito acima, que é complementar a, ou é direcionada a, ou se liga a, um sítio de ligação para um snRNA, tal como RNA nuclear pequeno U1, um snRNP ou um hnRNP.

[00109] Em uma modalidade, um paciente com DMD é fornecido com uma proteína distrofina funcional ou semifuncional usando um oligonucleotídeo como descrito acima, ou um equivalente funcional do mesmo, isto é, um oligonucleotídeo compreendendo um monômero 2'-O-metila, de preferência, um monômero de RNA 2'-O-metila, ou consistindo em RNA 2'-O-metila e compreendendo pelo menos um arcabouço de BNA com ou sem uma base de 5-metilpirimidina (isto é, uma 5-metilcitosina e/ou um 5-metiluracila) e sendo capaz de especificamente se ligar a ou se direcionar a uma sequência de RNA reguladora que é necessária para o splicing correto de um éxon de distrofina em um transcrito. Várias sequências de RNA de ação cis são necessárias para o splicing correto de éxons em um transcrito. Em particular, elementos, tais como, um intensificador de splicing exônico (ESE), uma sequência de reconhecimento de éxon (ERS) e/ou

um silenciador de splicing exônico (ESS) e/ou um silenciador de splicing intrônico (ISS) são identificados para regular o splicing específico e eficiente de éxons constitutivos e alternativos. Usando um oligonucleotídeo antissentido específico de sequência (AON) que se liga, se direciona ou é complementar aos elementos, a sua função reguladora é perturbada de modo que o éxon seja saltado ou incluído, como mostrado para DMD ou SMA. Assim, em uma modalidade preferida, um oligonucleotídeo ou um equivalente funcional do mesmo é usado que é complementar, se liga ou é direcionado a um intensificador de splicing exônico (ESE), uma sequência de reconhecimento de éxon (ERS) e/ou um silenciador de splicing exônico (ESS) e/ou um silenciador de splicing intrônico (ISS).

[00110] Em uma modalidade preferida, um oligonucleotídeo da invenção que é adequado para induzir o salto de um único éxon compreende ou consiste em uma sequência que é complementar a ou se liga a ou é direcionada a ou hibridiza com pelo menos uma parte dos éxons do mRNAs da distrofina 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 ou 55, a referida parte tendo pelo menos 10 nucleotídeos. No entanto, essa parte também pode ter pelo menos 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32 ou 33 nucleotídeos. Para os éxons de distrofina acima identificados, fornecemos um

segmento de nucleotídeos (SEQ ID NO: 2 a 7) do referido éxon ao qual um oligonucleotídeo, de preferência, se liga a ou é complementar, ou se direciona a ou hibridiza com.

[00111] Em uma modalidade preferida, um oligonucleotídeo da invenção que é adequado para o chamado multi-saltos como aqui definido anteriormente induz o salto dos seguintes éxons de distrofina: éxons 8 a 19, éxons 9 a 22, éxons 9 a 30, éxons 10 a 18, éxons 10 a 30, éxons 10 a 42, éxons 10 a 47, éxons 10 a 57, éxons 10 a 60, éxons 11 a 23, éxons 13 a 30, éxons 23 a 42, éxons 34 a 53, éxons 40 a 53, éxons 44 a 56, éxons 45 a 51, éxons 45 a 53, éxons 45 a 55, éxons 45 a 60 ou éxons 56 a 60. De preferência, um tal oligonucleotídeo de multi-saltos de acordo com a invenção compreende ou consiste em uma sequência que é capaz de se ligar a, se direcionar a, se hibridizar com, e/ou é complementar inversamente a, uma região de um primeiro éxon de pré-mRNA de distrofina de modo que a parte complementarmente inversa de pelo menos 30% do comprimento do referido oligonucleotídeo da invenção, mais de preferência pelo menos 40%, ainda mais de preferência pelo menos 50%, ainda mais de preferência pelo menos 60%, ainda mais de preferência pelo menos 70%, ainda mais de preferência pelo menos 80%, ainda mais de preferência pelo menos 90% ou ainda mais de preferência pelo menos 95%, ou ainda mais de preferência 98% e mais de preferência até

100%. Neste contexto, um primeiro éxon é, de preferência, o éxon 8, 9, 10, 11, 13, 23, 34, 40, 44, 45 ou 56 de pré-mRNA de distrofina, como aqui definido. O referido oligonucleotídeo pode compreender sequências flanqueadoras adicionais. Em uma modalidade mais preferida, o comprimento da referida parte complementarmente inversa do referido oligonucleotídeo é de pelo menos 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 ou 40 nucleotídeos. Podem ser usados vários tipos de sequências flanqueadoras. De preferência, as sequências flanqueadoras são usadas para modificar a ligação de uma proteína ao referido oligonucleotídeo, ou para modificar uma propriedade termodinâmica do referido oligonucleotídeo, mais de preferência, para modificar a afinidade de ligação a RNA alvo. Em outra modalidade preferida, sequências flanqueadoras adicionais são complementarmente inversas das sequências de pré-mRNA de distrofina que não estão presentes no referido éxon.

[00112] Um oligonucleotídeo preferido compreende:

i) ia) pelo menos um monômero 2'-substituído, de preferência, um monômero de RNA ou um monômero de RNA 2'-O-substituído, e opcionalmente uma ligação de esqueleto de fosforotioato, ou

ib) apenas monômeros 2'-substituídos, de preferência

monômeros de RNA ou monômeros de RNA 2'-O-substituídos, ligados por ligações de esqueleto de fosforotioato e/ou por ligações fosfodiéster,

ii) uma base de 5-metilcitosina e/ou um 5-metiluracila e

iii) pelo menos um monômero compreendendo uma modificação do arcabouço de ácido nucleico bicíclico (BNA), e se liga ou é complementar a ou é direcionado a ou se hibridiza com um segmento contínuo de pelo menos 10 e até 33 nucleotídeos dentro de pelo menos uma das seguintes sequências de nucleotídeos do éxon selecionadas da SEQ ID NO: 2 a 7, mais de preferência de:

5' -

GCGAUUUGACAGAUUCUGUUGAGAAAUGGCGGCGUUUUCAUUAUGAUUAAAAGAUUUU
UAAUCAGUGGCUAACAGAAGCUGAACAGUUUCUCAGAAAGACACAAAUCCUGAGAAU
UGGGAACAUGCUAAAUACAAAUGGUAUCUUAAG-3' (SEQ ID NO: 2) para
salto ou pelo menos salto do éxon 44;

5' -

GAACUCCAGGAUGGCAUUGGGCAGCGGCAAACUGUUGUCAGAACAUUGAAUGCAACU
GGGGAAGAAAUAUUUCAGCAAUCCUCAAAAACAGAUGCCAGUAUUCUACAGGAAAAAU
UGGGAAGCCUGAAUCUGCGGUGGCAGGAGGUCUGCAAACAGCUGUCAGACAGAAAAA
AGAG-3' (SEQ ID NO: 3) para salto ou pelo menos salto do
éxon 45;

5' -

CUCCUACUCAGACUGUUACUCUGGUGACACAACCUGUGGUUACUAAGGAAACUGCCA

UCUCCAAACUAGAAAUGCCAUCUCCUUGAUGUUGGAGGUACCUGCUCUGGCAGAUU
UCAACCGGGCUUGGACAGAACUUACCGACUGGCUUUCUCUGCUUGAUCAAGUUUAUA
AAUCACAGAGGGUGAUGGUGGGUGACCUUGAGGAUAUCAACGAGAUGAUCAUCAAGC
AGAAG-3' (SEQ ID NO: 4) para salto ou pelo menos salto do
éxon 51;

5' -

GCAACAAUGCAGGAUUUGGAACAGAGGCGUCCCCAGUUGGAAGAACUCAUUACCGCU
GCCCAAAAUUUGAAAAACAAGACCAGCAAUCAAGAGGCUAGAACAUAUUACGGAUC
GAA-3' (SEQ ID NO: 5) para salto ou pelo menos salto do
éxon 52;

5' -

UUGAAAGAAUUCAGAAUCAGUGGGAUGAAGUACAAGAACACCUUCAGAACCGGAGGCA
ACAGUUGAAUGAAAUGUUAAAGGAUUAACACAAUGGCUGGAAGCUAAGGAAGAAGCU
GAGCAGGUCUUAGGACAGGCCAGAGCCAAGCUUGAGUCAUGGAAGGAGGGUCCCUAU
ACAGUAGAUGCAAUCCAAAAGAAAAUCACAGAAACCAAG-3' (SEQ ID NO: 6)
para salto ou pelo menos salto do éxon 53;

5' -

GGUGAGUGAGCGAGAGGCUGCUUUGGAAGAAACUCAUAGAUUACUGCAACAGUUCCC
CCUGGACCUGGAAAAGUUUCUUGCCUGGCUUACAGAAGCUGAAACAACUGCCAAUGU
CCUACAGGAUGCUACCCGUAAGGAAAGGCUCCUAGAAGACUCCAAGGGAGUAAAAGA
GCUGAUGAAACAAUGGCAA-3' (SEQ ID NO: 7) para salto ou pelo
menos salto do éxon 55.

[00113] Outro oligonucleotídeo preferido compreende:

i) 1a) pelo menos um monômero 2'-substituído, de
preferência, um monômero de RNA ou um monômero de RNA 2'-O-

substituído, e opcionalmente uma ligação de esqueleto de fosforotioato, ou

1b) apenas monômeros 2'-substituídos, de preferência, monômeros de RNA ou monômeros de RNA 2'-O-substituídos, ligados por ligações de esqueleto de fosforotioato e/ou por ligações fosfodiéster,

ii) uma base de 5-metilcitosina e/ou um 5-metiluracila e

iii) pelo menos um monômero compreendendo uma modificação do arcabouço de ácido nucleico bicíclico (BNA),

e compreende um segmento contínuo de pelo menos 10 e até 33 nucleotídeos de pelo menos uma das seguintes sequências de nucleotídeos selecionadas de SEQ ID NO: 6065 a 6070, mais de preferência de:

5' -

CUUAAGAUACCAUUUGUAUUUAGCAUGUCCCAUUCUCAGGAAUUUGUGUCUUUCU
GAGAAACUGUUCAGCUUCUGUUAGCCACUGAUUAAUAUCUUUAUAUCAUAAUGAAAA
CGCCGCCAUUUCUCAACAGAUUCUGUCAAAUCGC-3' (SEQ ID NO: 6065) para
salto pelo menos do éxon 44,

CUCUUUUUUCUGUCUGACAGCUGUUUGCAGACCUCUGCCACCGCAGAUUCAGGCUU
CCCAAUUUUUCCUGUAGAAUACUGGCAUCUGUUUUUGAGGAUUGCUGAAUUAUUUCU
UCCCCAGUUGCAUUCAAUGUUCUGACAACAGUUUGCCGCUGCCCAAUGCCAUCUGG
AGUUC-3' (SEQ ID NO: 6066) para salto pelo menos do éxon 45

5' -

CUUCUGCUUGAUGAUCAUCUCGUUGAUAUCCUCAAGGUCACCCACCAUCACCCUCUG

UGAUUUUAUAACUUGAUCAAGCAGAGAAAGCCAGUCGGUAAGUUCUGUCCAAGCCCCG
 GUUGAAAUCUGCCAGAGCAGGUACCUCCAACAUCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAGUUU
 GGAGAUGGCAGUUUCCUUAGUAACCACAGGUUGUGUCACCAGAGUAAACAGUCUGAGU
 AGGAG-3' (SEQ ID NO: 6067) para salto pelo menos do éxon
 51,
 5' -

UUCGAUCCGUAAUGAUUGUUCUAGCCUCUUGAUUGCUGGUCUUGUUUUUCAAUUUU
 GGGCAGCGGUAAUGAGUUCUCCAACUGGGGACGCCUCUGUCCAAAUCCUGCAUUG
 UUGC-3' (SEQ ID NO: 6068) para salto pelo menos do éxon 52,
 5' -

CUUGGUUUCUGUGAUUUUCUUUUGGAUUGCAUCUACUGUAUAGGGACCCUCCUCCA
 UGACUCAAGCUUGGCUCUGGCCUGUCCUAAGACCUGCUCAGCUUCUCCUUAGCUUC
 CAGCCAUUGUGUUGAAUCCUUUAACAUUUCAUUAACUGUUGCCUCCGGUUCUGAAG
 GUGUUCUUGUACUUCAUCCACUGAUUCUGAAUUCUUUCA-3' (SEQ ID NO:
 6069) para salto pelo menos do éxon 53,
 5' -

UUGCCAUUGUUUCAUCAGCUCUUUUACUCCCUUGGAGUCUUCUAGGAGCCUUUCCUU
 ACGGGUAGCAUCCUGUAGGACAUUGGCAGUUGUUUCAGCUUCUGUAAGCCAGGCAAG
 AAACUUUUCCAGGUCCAGGGGGAACUGUUGCAGUAAUCUAUGAGUUUCUCCAAAGC
 AGCCUCUCGCUCACUCACC-3' (SEQ ID NO: 6070) para salto pelo
 menos do éxon 55.

[00114] Em modalidades preferidas, o
 oligonucleotídeo de acordo com a invenção compreende ou
 consiste em uma sequência de nuclotídeos representada pelas
 SEQ ID NOS: 8-271 ou SEQ ID NOS: 1608-2099 ou SEQ ID NOS:

3000-3184. Estes oligonucleotídeos são, de preferência, para salto do éxon 44 de mRNA de distrofina.

[00115] Em modalidades preferidas, o oligonucleotídeo de acordo com a invenção compreende ou consiste em uma sequência de nuclotídeos representada pelas SEQ ID NOs: 272-451 ou SEQ ID NOs: 3185-4527. Estes oligonucleotídeos são, de preferência, para salto do éxon de pré-mRNA de distrofina 45.

[00116] Em modalidades preferidas, o oligonucleotídeo de acordo com a invenção compreende ou consiste em uma sequência de nuclotídeos representada pelas SEQ ID NOs: 452-613 ou SEQ ID NOs: 4528-4572. Em modalidades mais preferidas, o oligonucleotídeo de acordo com a invenção compreende ou consiste em uma sequência de nuclotídeos representada pelas SEQ ID NOs: 455, 459, 4528, 4531, 4532, 4533, 4535, 4542, 4548 ou 4568. Estes oligonucleotídeos são, de preferência, para salto do éxon de pré-mRNA de distrofina 51.

[00117] Em modalidades preferidas, o oligonucleotídeo de acordo com a invenção compreende ou consiste em uma sequência de nuclotídeos representada pelas SEQ ID NOs: 842-1159 ou SEQ ID NOs: 4573-6048. Estes oligonucleotídeos são, de preferência, para salto do éxon de pré-mRNA de distrofina 53.

[00118] Em modalidades preferidas, o

oligonucleotídeo de acordo com a invenção compreende ou consiste em uma sequência de nucleotídeos representada pela SEQ ID NO: 614-841. Estes oligonucleotídeos são, de preferência, para salto do éxon de pré-mRNA de distrofina 52.

[00119] Em modalidades preferidas, o oligonucleotídeo de acordo com a invenção compreende ou consiste em uma sequência de nucleotídeos representada pela SEQ ID NO: 1160-1399. Estes oligonucleotídeos são, de preferência, para salto do éxon de pré-mRNA de distrofina 55.

[00120] SEQ ID NOS: 6065-6070 representam sequências complementarmente inversas às SEQ ID NOS: 2-7. Em uma modalidade mais preferida, o oligonucleotídeo de acordo com a invenção tem um comprimento de 10 a 33 nucleotídeos e compreende:

i) apenas monômeros 2'-substituídos, de preferência, monômeros de RNA ou monômeros de RNA 2'-O-substituídos, ligados por ligações de esqueleto de fosforotioato e/ou por ligações fosfodiéster,

ii) uma base de 5-metilcitosina, e

iii) pelo menos um monômero compreendendo uma modificação do arcabouço de ácido nucleico bicíclico (BNA),

e compreende um segmento contínuo de pelo menos 10 e até 33 nucleotídeos de pelo menos uma das sequências de

nucleotídeos selecionadas de SEQ ID NO: 6065 a 6070, de preferência SEQ ID NO: 6067.

[00121] Em uma modalidade ainda mais preferida, o oligonucleotídeo de acordo com a invenção tem um comprimento de 10 a 33 nucleotídeos e compreende:

i) apenas monômeros 2'-substituídos, de preferência, monômeros de RNA 2'-O-substituídos, ligados por ligações de esqueleto de fosforotioato,

ii) uma base de 5-metilcitosina, e

iii) pelo menos um monômero compreendendo uma modificação do arcabouço de ácido nucleico bicíclico (BNA),

e compreende um segmento contínuo de pelo menos 10 e até 33 nucleotídeos de pelo menos uma das sequências de nucleotídeos selecionadas de SEQ ID NO: 6065 a 6070, de preferência SEQ ID NO: 6067. Em modalidades mais preferidas, tal oligonucleotídeo tem pelo menos dois monômeros compreendendo uma modificação de arcabouço de BNA.

[00122] Nestas modalidades, é preferido que o referido segmento contínuo seja de pelo menos 16 a 26 nucleotídeos, ou de 16 a 25 nucleotídeos de comprimento. Em outra modalidade, o referido segmento contínuo é de 16 a 24 nucleotídeos de comprimento. Em outra modalidade, o referido segmento contínuo é de 16 a 22 nucleotídeos de comprimento. Em outra modalidade, o referido segmento

contínuo é de 16, 18, 20 ou 22 nucleotídeos de comprimento. Em outra modalidade, o referido segmento contínuo é de 21, 22, 24 ou 25 nucleotídeos de comprimento. Em outra modalidade, o referido segmento contínuo é de 18, 22, 24 ou 25 nucleotídeos de comprimento. O oligonucleotídeo da invenção consiste, de preferência, no referido segmento contínuo.

[00123] Oligonucleotídeos mais preferidos compreendem pelo menos um monômero 2'-substituído e opcionalmente uma ligação de esqueleto de fosforotioato, ou apenas monômeros 2'-substituídos ligados por ligações de esqueleto de fosforotioato e/ou por ligações fosfodiéster, compreendem uma base de 5-metilcitosina e/ou um 5-metiluracila e compreendem pelo menos um monômero compreendendo uma modificação de arcabouço de ácido nucleico bicíclico (BNA), e são representados por uma sequência de nuclotídeos compreendendo ou consistindo em SEQ ID NO: 8-1580 ou SEQ ID NO: 1592-1607, ou por uma sequência de nuclotídeos compreendendo ou consistindo em um fragmento de SEQ ID NO: 8-1580 ou SEQ ID NO: 1592-1607. Mais oligonucleotídeos preferidos compreendem pelo menos um monômero 2'-substituído e opcionalmente uma ligação de esqueleto de fosforotioato, ou apenas monômeros 2'-substituídos ligados por ligações de esqueleto de fosforotioato e/ou por ligações fosfodiéster, compreendem

uma base de 5-metilcitosina e/ou 5-metiluracila e compreendem pelo menos um monômero compreendendo uma modificação de arcabouço de ácido nucleico bicíclico (BNA) e são representados por uma sequência de nuclotídeos compreendendo ou consistindo em SEQ ID NO: 8-1580 ou SEQ ID NO: 1592-2099 ou SEQ ID NO: 3000- 6048, ou por uma sequência de nuclotídeos compreendendo ou consistindo em um fragmento de SEQ ID NO: 8-1580 ou SEQ ID NO: 1592-2099 ou SEQ ID NO: 3000-6048. Tais oligonucleotídeos têm, de preferência, um comprimento de 16-30 nucleotídeos, mais de preferência de 16-24 nucleotídeos, mais de preferência de 19, 22 ou 22 nucleotídeos. Oligonucleotídeos mais preferidos são como descritos acima, e são representados por uma sequência de nucleotídeos compreendendo ou consistindo em SEQ ID NO: 9-13, 15-19, 21-25, 27-31, 33-37, 39-43, 45-49, 51-55, 57-61, 63-67, 69-73, 75-79, 81-85, 87-91, 93-97, 99-103, 105-109, 111-115, 117 -121, 123-127, 129-133, 135-139, 141-145, 147-151, 153-157, 159-163, 165-169, 171-175, 177-181, 183-187, 189-193. 195-199, 201-205, 207-211, 213-217, 219-223, 225-229, 231-235, 237-241, 243-247, 249-253, 255-259, 261-265, 267-271, 273-277, 279-283, 285-289, 291-295, 297-301, 303-307, 309-313, 315-319, 321-325, 327-331, 333-337, 339- 343, 345-349, 351-355, 357-361, 363-367, 369-373, 375-379, 381-385, 387-391, 393-397, 399-403, 405-409, 411-415. 417-421, 423-427, 429-433, 435-439,

441-445, 447-451, 453-457, 459-463, 465-469, 471-475, 477-481, 483-487, 489. -493, 495-499, 501-505, 507-511, 513-517, 519-523, 525-529, 531-535, 537-541, 543-547, 549-553, 555-559, 561- 565, 567-571, 573-577, 579-583, 585 -589, 591-595, 597-601, 603-607, 609-613, 615-619, 621-625, 627-631, 633-637, 639-643, 645-649, 651-655, 657-661, 663-667, 669-673, 675-679, 681-685, 687-691, 693-697, 699-703, 705-709, 711-715, 717-721, 723-727, 729-733, 735-739, 741-745, 747-751, 753-757, 759-763, 765-769, 771-775, 777-781, 783-787, 789-793, 795-799, 801-805, 807- 811, 813-817, 819-823, 825-829, 831-835, 837-841, 843-847, 849-853, 855-859, 861-865, 867-871, 873-877, 879-883, 885-889, 891-895, 897-901, 903-907, 909-913, 915-919, 921-925, 927-931, 933-937, 939-943, 945-949, 951-955, 957-961, 963-967, 969-973, 975-979, 981-985, 987-991, 993-997, 999-1003, 1005-1009, 1011-1015, 1017-1021, 1023-1027, 1029-1033, 1035-1039, 1041-1045, 1047-1051, 1053-1057, 1059-1063, 1065-1069, 1071-1075, 1077-1081, 1083-1087, 1089-1093, 1095-1099, 1101-1105, 1107-1111, 1113-1117, 1119-1123, 1125-1129, 1131-1135, 1137-1141, 1143-1147, 1149-1153, 1155-1159, 1161-1165, 1167-1171, 1173-1177, 1179-1183, 1185-1189, 1191-1195, 1197-1201, 1203-1207, 1209-1213, 1215-1219, 1221-1225, 1227-1231, 1233-1237, 1239-1243, 1245-1249, 1251-1255, 1257-1261, 1263-1267, 1269-1273, 1275-1279, 1281-1285, 1287-1291, 1293-1297, 1299-1303, 1305-1309, 1311-1315,

1317-1321, 1323-1327, 1329-1333, 1335-1339, 1341-1345,
1347-1351, 1353-1357, 1359-1363, 1365-1369, 1371-1375,
1377-1381, 1383-1387, 1389-1393, 1395-1399, 1401-1405,
1407-1411, 1413-1417, 1419-1423, 1425-1429, 1431-1435,
1437-1441, 1443-1447, 1449-1453, 1455-1459, 1461-1465,
1467-1471, 1473-1477, 1479-1483, 1485 -1489, 1491-1495,
1497-1501, 1503-1507, 1509-1513, 1515-1519, 1521-1525,
1527-1531, 1533-1537, 1539-1543, 1545-1549, 1551-1555,
1557-1561, 1563-1567, 1569-1573, 1575-1579, 1592-2099, ou
3000-6048 ou por uma sequência de nucleotídeos
compreendendo ou consistindo em um fragmento de SEQ ID NO:
9-13, 15-19, 21-25, 27 -31, 33-37, 39-43, 45-49, 51-55, 57-
61, 63-67, 69-73, 75-79, 81-85, 87-91, 93-97, 99-103 , 105-
109, 111-115, 117-121, 123-127, 129-133, 135-139, 141-145,
147-151, 153-157, 159-163, 165-169, 171-175, 177-181, 183-
187, 189-193, 195-199, 201-205, 207-211, 213-217, 219-223,
225-229, 231-235, 237-241, 243-247, 249-253, 255-259, 261-
265, 267-271, 273-277, 279-283, 285-289, 291-295, 297- 301,
303-307, 309-313, 315-319, 321-325, 327-331, 333-337, 339-
343, 345-349, 351-355, 357-361, 363-367, 369-373, 375-379,
381-385, 387-391, 393- 397, 399-403, 405-409, 411-415, 417-
421, 423-427, 429-433, 435-439, 441-445, 447-451, 453-457,
459-463, 465-469, 471-475, 477-481, 483-487, 489-493, 495-
499, 501-505, 507-511, 513-517, 519-523, 525-529, 531-535,
537-541, 543- 547, 549-553, 555-559, 561-565, 567-571, 573-

577, 579-583, 585-589, 591-595, 597-601, 603-607, 609-613,
615-619, 621-625, 627-631, 633-637, 639-643, 645-649, 651-
655, 657-661, 663-667, 669-673, 675-679, 681-685, 687-691,
693- 697, 699-703, 705-709, 711-715, 717-721, 723-727, 729-
733, 735-739, 741-745, 747-751, 753-757, 759-763, 765-769,
771-775, 777-781, 783-787, 789-793, 795-799, 801-805, 807-
811, 813-817, 819-823, 825-829, 831-835, 837-841, 843- 847,
849-853, 855-859, 861-865, 867-871, 873-877, 879-883, 885-
889, 891-895, 897-901, 903-907, 909-913, 915-919, 921-925,
927-931, 933-937, 939-943, 945-949, 951-955, 957-961, 963-
967, 969-973, 975-979, 981-985, 987-991, 993-997, 999-1003,
1005-1009, 1011-1015, 1017-1021, 1023-1027, 1029-1033,
1035-1039, 1041-1045, 1047-1051, 1053-1057, 1059-1063,
1065-1069, 1071-1075, 1077-1081, 1083-1087, 1089-1093,
1095-1099, 1101-1105, 1107-1111, 1113-1117, 1119-1123,
1125-1129, 1131-1135, 1137-1141, 1143-1147, 1149-1153,
1155-1159, 1161-1165, 1167-1171, 1173-1177, 1179-1183,
1185-1189, 1191-1195, 1197-1201, 1203- 1207, 1209-1213,
1215-1219, 1221-1225, 1227-1231, 1233-1237, 1239-1243,
1245-1249, 1251-1255, 1257-1261, 1263-1267, 1269-1273,
1275-1279, 1281-1285, 1287-1291, 1293-1297, 1299-1303,
1305-1309, 1311-1315, 1317-1321, 1323-1327, 1329-1333,
1335-1339, 1341-1345, 1347-1351, 1353-1351. 1357, 1359-
1363, 1365-1369, 1371-1375, 1377-1381, 1383-1387, 1389-
1393, 1395-1399, 1401-1405, 1407-1411, 1413-1417, 1419-

1423, 1425-1429, 1431-1435, 1437-1441, 1443-1447, 1449-1453, 1455-1459, 1461-1465, 1467-1471, 1473-1477, 1479-1483, 1485-1489, 1491-1495, 1497-1501, 1503- 1507, 1509-1513, 1515-1519, 1521-1525, 1527- 1531, 1533-1537, 1539-1543, 1545-1549, 1551-1555, 1557-1561, 1563-1567, 1569-1573, 1575-1579, 1592-2099 ou 3000-6048. No contexto da invenção, um fragmento da SEQ ID NO: 8-1580 ou SEQ ID NO: 1592-2099 ou SEQ ID NO: 3000-6048 significa, de preferência, uma sequência de nuclotídeos compreendendo ou consistindo em, pelo menos, 10 nucleotídeos contíguos da referida SEQ. ID NO.

[00124] Oligonucleotídeos mais preferidos compreendem pelo menos um monômero 2'-substituído, de preferência, um monômero de RNA e opcionalmente uma ligação de esqueleto de fosforotioato, ou apenas monômeros 2'-substituídos ligados por ligações de esqueleto de fosforotioato e/ou por ligações fosfodiéster, compreendem uma base de 5-metilcitosina e/ou 5-metiluracila e compreendem pelo menos um monômero compreendendo uma modificação do arcabouço de ácido nucleico bicíclico (BNA), e são representados por uma sequência de nucleotídeos compreendendo ou consistindo em SEQ ID NO: 8-1580 ou SEQ ID NO: 1592-2099 ou SEQ ID NO: 3000-6048, ou por uma sequência de nucleotídeos compreendendo ou consistindo em fragmento de SEQ ID NO: 8-1580 ou SEQ ID NO: 1592-2099 ou SEQ ID NO:

3000-6048, e tem um comprimento de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32 ou 33 nucleotídeos.

[00125] As sequências preferidas incluem a SEQ ID NO: 452-613 e a SEQ ID NO: 1592-1605 e a SEQ ID NO: 1607, mais de preferência, SEQ ID NO: 453-457, 459-463, 465-469, 471-475, 477-481, 483-487, 489-493, 495-499, 501-505, 507-511, 513-517, 519-523, 525-529, 531-535, 537-541, 543-547, 549-553, 555-559, 561-565, 567-571, 573-577, 579-583, 585-589, 591-595, 597-601, 603-607, 609-613, 1592-1605 e 1607, e ainda mais de preferência SEQ ID NO: 453, 455, 456, 459, 461, 462, 465, 467, 468, 471, 473, 474, 483, 486, 1592, 1593, 1594, 1595, 1596, 1597, 1598, 1599, 1600, 1601, 1602, 1603, 1604, 1605 ou 1607. As sequências mais preferidas são SEQ ID NO: 455, 459, 4528, 4531, 4532, 4533, 4535, 4542, 4548 e 4568.

[00126] Em uma modalidade preferida, um oligonucleotídeo é representado por uma sequência de nucleotídeos compreendendo ou consistindo em SEQ ID NO: 8-271 ou SEQ ID NO: 1608-2099 ou SEQ ID NO: 3000-3184 e é para salto do éxon 44 de pré-mRNA de distrofina e compreende um ou mais dos seguintes:

- pelo menos um monômero 2'-substituído
- pelo menos uma ligação de esqueleto de fosforotioato;

- apenas monômeros 2'-substituídos;
- apenas ligações de esqueleto de fosforotioato;
- apenas monômeros 2'-substituídos ligados por ligações de esqueleto de fosforotioato;
- uma base de 5-metilcitosina e/ou 5-metiluracila;
- apenas bases de 5-metilcitosina em vez de bases de citosina;
- pelo menos um monômero compreendendo uma modificação de arcabouço de ácido nucleico bicíclico (BNA).

[00127] De preferência, o referido oligonucleotídeo compreende apenas monômeros 2'-substituídos, apenas ligações de esqueleto de fosforotioato e pelo menos um monômero compreendendo uma modificação de arcabouço de BNA. Mais de preferência, o referido oligonucleotídeo é representado por uma sequência de nucleotídeos compreendendo ou consistindo em SEQ ID NO: 9-13, 15-19, 21-25, 27-31, 33-37, 39-43, 45-49, 51-55, 57-61, 63-67, 69-73, 75-79, 81-85, 87- 91, 93-97, 99-103, 105-109, 111-115, 117-121, 123-127, 129-133, 135-139, 141-145, 147-151, 153-157, 159-163, 165-169, 171-175, 177-181, 183-187, 189-193, 195-199, 201-205, 207-211, 213-217, 219-223, 225-229, 231 -235, 237-241, 243-247, 249-253, 255-259, 261-265 ou 267-271. De preferência, o referido oligonucleotídeo tem um comprimento de 10 a 33 nucleotídeos, mais de preferência, de 16 a 22 nucleotídeos.

[00128] Em uma modalidade preferida, um oligonucleotídeo é representado por uma sequência de nucleotídeos compreendendo ou consistindo em SEQ ID NO: 272-451 ou SEQ ID NO: 3185-4527 e é para salto do éxon 45 de pré-mRNA de distrofina, e compreende um ou mais dos seguintes:

- pelo menos um monômero 2'-substituído
- pelo menos uma ligação de esqueleto de fosforotioato;
- apenas monômeros 2'-substituídos;
- apenas ligações de esqueleto de fosforotioato;
- apenas monômeros 2'-substituídos ligados por ligações de esqueleto de fosforotioato;
- uma base de 5-metilcitosina e/ou 5-metiluracila;
- apenas bases de 5-metilcitosina em vez de bases de citosina;
- pelo menos um monômero compreendendo uma modificação de arcabouço de ácido nucleico bicíclico (BNA).

[00129] De preferência, o referido oligonucleotídeo compreende apenas monômeros 2'-substituídos, apenas ligações de esqueleto de fosforotioato, e pelo menos um monômero compreendendo uma modificação de arcabouço de BNA. Mais de preferência, o referido oligonucleotídeo é representado por uma sequência de nucleotídeos compreendendo ou consistindo em SEQ ID NO: 273-277, 279-

283, 285-289, 291-295, 297-301, 303-307, 309-313, 315-319, 321-325, 327-331, 333-337, 339-343, 345-349, 351-355, 357-361, 363-367, 369-373, 375-379, 381-385, 387-391, 393 -397, 399-403, 405-409, 411-415, 417-421, 423-427, 429-433, 435-439, 441-445 ou 447-451. De preferência, o referido oligonucleotídeo tem um comprimento de 10 a 33 nucleotídeos, mais de preferência, de 16 a 22 nucleotídeos.

[00130] Em uma modalidade preferida, um oligonucleotídeo é representado por uma sequência de nucleotídeos compreendendo ou consistindo na SEQ ID NO: 452-613 ou SEQ ID NO: 1592-1605 ou SEQ ID NO: 4528-4572 e é para salto do éxon 51 de pré-mRNA de distrofina e compreende um ou mais dos seguintes:

- pelo menos um monômero 2'-substituído
- pelo menos uma ligação de esqueleto de fosforotioato;
- apenas monômeros 2'-substituídos;
- apenas ligações de esqueleto de fosforotioato;
- apenas monômeros 2'-substituídos ligados por ligações de esqueleto de fosforotioato;
- uma base de 5-metilcitosina e/ou 5-metiluracila;
- apenas bases de 5-metilcitosina em vez de bases de citosina;
- pelo menos um monômero compreendendo uma modificação de arcabouço de ácido nucleico bicíclico (BNA).

[00131] De preferência, o referido oligonucleotídeo compreende apenas monômeros 2'-substituídos, apenas ligações de esqueleto de fosforotioato, e pelo menos um monômero compreendendo uma modificação de arcabouço de BNA. Mais de preferência, o referido oligonucleotídeo é representado por uma sequência de nucleotídeos compreendendo ou consistindo em SEQ ID NO: 453-457, 459-463, 465-469, 471-475, 477-481, 483-487, 489-493, 495-499, 501-505, 507-511, 513-517, 519-523, 525-529, 531-535, 537-541, 543-547, 549-553, 555-559, 561-565, 567-571, 573-577, 579-583, 585-589, 591-595, 597-601, 603-607, 609-613, 1592-1605 ou 1607, ainda mais de preferência SEQ ID NO: 453, 455, 456, 459, 461, 462, 465, 467, 468, 471, 473, 474, 483, 486, 1592, 1593, 1594, 1595, 1596, 1597, 1598, 1599, 1600, 1601, 1602, 1603, 1604, 1605 ou 1607, ainda mais de preferência SEQ ID NO: 1592, 1593, 1594, 1595, 1596, 1597, 1598, 1599, 1600, 1601, 1602, 1603, 1604, 1605, ou 1607, ainda mais de preferência SEQ ID NO: 455, 459, 4528, 4531, 4532, 4533, 4535, 4542, 4548 e 4568. De preferência, o referido oligonucleotídeo tem um comprimento de 10 a 33 nucleotídeos, mais de preferência, de 16 a 22 nucleotídeos.

[00132] Consequentemente, em uma modalidade preferida, um oligonucleotídeo de acordo com a invenção é representado por uma sequência de nucleotídeos compreendendo ou consistindo na SEQ ID NO: 1592

(TCAAGGAAGAUGGCAUUUCU) e é para salto do éxon 51 de pré-mRNA de distrofina, compreende uma modificação de arcabouço de BNA no monômero 5'-terminal e nenhum outro monômero, compreende 5-metilcitosina em vez de citosina, compreende apenas ligações de fosforotioato e compreende adicionalmente apenas monômeros de RNA 2'-O-metila.

[00133] Consequentemente, em uma modalidade preferida, um oligonucleotídeo de acordo com a invenção é representado por uma sequência de nucleotídeos compreendendo ou consistindo em SEQ ID NO: 1593 (TCAAGGAAGAUGGCAUUUCT) e é para salto do éxon 51 de pré-mRNA de distrofina, compreende uma modificação de arcabouço de BNA no monômero 5'-terminal e no monômero 3'-terminal e nenhum outro monômero, compreende 5-metilcitosina em vez de citosina, compreende apenas ligações de fosforotioato e compreende adicionalmente apenas monômeros de RNA 2'-O-metila.

[00134] Consequentemente, em uma modalidade preferida, um oligonucleotídeo de acordo com a invenção é representado por uma sequência de nucleotídeos compreendendo ou consistindo na SEQ ID NO: 1594 (TCAAGGAAGAUGGCAUUUCU) e é para salto do éxon 51 de pré-mRNA de distrofina, compreende uma modificação do arcabouço de BNA no monômero 5'-terminal e no seu monômero vizinho e nenhum outro monômero, compreende 5-metilcitosina em vez de

citosina, compreende apenas ligações fosforotioato e compreende adicionalmente apenas monômeros de RNA 2'-O-metila.

[00135] Consequentemente, em uma modalidade preferida, um oligonucleotídeo de acordo com a invenção é representado por uma sequência de nucleotídeos compreendendo ou consistindo na SEQ ID NO: 1595 (TCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAG) e é para salto do éxon 51 de pré-mRNA de distrofina, compreende uma modificação do arcabouço de BNA no monômero 5'-terminal e nenhum outro monômero, compreende 5-metilcitosina em vez de citosina, compreende apenas ligações de fosforotioato, e compreende adicionalmente apenas monômeros de RNA 2'-O-metila.

[00136] Consequentemente, em uma modalidade preferida, um oligonucleotídeo de acordo com a invenção é representado por uma sequência de nucleotídeos compreendendo ou consistindo na SEQ ID NO: 1596 (TCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAG) e é para salto do éxon 51 de pré-mRNA de distrofina, compreende uma modificação do arcabouço de BNA no monômero 5'-terminal e no monômero 3'-terminal e nenhum outro monômero, compreende 5-metilcitosina em vez de citosina, compreende apenas ligações de fosforotioato e compreende adicionalmente apenas monômeros de RNA 2'-O-metila.

[00137] Consequentemente, em uma modalidade

preferida, um oligonucleotídeo de acordo com a invenção é representado por uma sequência de nucleotídeos compreendendo ou consistindo na SEQ ID NO: 1597 (TCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAG) e é para salto do éxon 51 de pré-mRNA de distrofina, compreende uma modificação do arcabouço de BNA no monômero 5'-terminal e no seu monômero vizinho e nenhum outro monômero, compreende 5-metilcitosina em vez de citosina, compreende apenas ligações fosforotioato e compreende adicionalmente apenas monômeros de RNA 2'-O-metila.

[00138] Consequentemente, em uma modalidade preferida, um oligonucleotídeo de acordo com a invenção é representado por uma sequência de nucleotídeos compreendendo ou consistindo na SEQ ID NO: 1598 (AAGGAAGAUGGCAUUUCU) e é para salto do éxon 51 de pré-mRNA de distrofina, compreende uma modificação de arcabouço de BNA no monômero 5'-terminal e nenhum outro monômero, compreende 5-metilcitosina em vez de citosina, compreende apenas ligações de fosforotioato e compreende adicionalmente apenas monômeros de RNA 2'-O-metila.

[00139] Por conseguinte, em uma modalidade preferida, um oligonucleotídeo de acordo com a invenção é representado por uma sequência de nucleotídeos compreendendo ou consistindo na SEQ ID NO: 1599 (AAGGAAGAUGGCAUUUCT) e é para salto do éxon 51 de pré-mRNA

de distrofina, compreende uma modificação de arcabouço de BNA no monômero 5'-terminal e no monômero 3'-terminal e nenhum outro monômero, compreende 5-metilcitosina em vez de citosina, compreende apenas ligações de fosforotioato e compreende adicionalmente apenas monômeros de RNA 2'-O-metila.

[00140] Consequentemente, em uma modalidade preferida, um oligonucleotídeo de acordo com a invenção é representado por uma sequência de nucleotídeos compreendendo ou consistindo em SEQ ID NO: 1600 (AAGGAAGAUGGCAUUUCU) e é para salto do éxon 51 de pré-mRNA de distrofina, compreende uma modificação de arcabouço de BNA no monômero 5'-terminal e no seu monômero vizinho e nenhum outro monômero, compreende 5-metilcitosina em vez de citosina, compreende apenas ligações fosforotioato e compreende adicionalmente apenas monômeros de RNA 2'-O-metila.

[00141] Consequentemente, em uma modalidade preferida, um oligonucleotídeo de acordo com a invenção é representado por uma sequência de nucleotídeos compreendendo ou consistindo na SEQ ID NO: 1597 (TCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAG) e é para salto do éxon 51 de pré-mRNA de distrofina, compreende uma modificação do arcabouço de BNA no monômero 5'-terminal e no seu monômero vizinho e nenhum outro monômero, compreende 5-metilcitosina em vez de

citosina, compreende apenas ligações fosforotioato e compreende adicionalmente apenas monômeros de RNA 2'-O-metila.

[00142] Consequentemente, em uma modalidade preferida, um oligonucleotídeo de acordo com a invenção é representado por uma sequência de nucleotídeos compreendendo ou consistindo na SEQ ID NO: 1598 (AAGGAAGAUGGCAUUUCU) e é para salto do éxon 51 de pré-mRNA de distrofina, compreende uma modificação de arcabouço de BNA no monômero 5'-terminal e nenhum outro monômero, compreende 5-metilcitosina em vez de citosina, compreende apenas ligações de fosforotioato e compreende adicionalmente apenas monômeros de RNA 2'-O-metila.

[00143] Por conseguinte, em uma modalidade preferida, um oligonucleotídeo de acordo com a invenção é representado por uma sequência de nucleotídeos compreendendo ou consistindo na SEQ ID NO: 1599 (AAGGAAGAUGGCAUUUCT) e é para salto do éxon 51 de pré-mRNA de distrofina, compreende uma modificação de arcabouço de BNA no monômero 5'-terminal e no monômero 3'-terminal e nenhum outro monômero, compreende 5-metilcitosina em vez de citosina, compreende apenas ligações de fosforotioato e compreende adicionalmente apenas monômeros de RNA 2'-O-metila.

[00144] Consequentemente, em uma modalidade

preferida, um oligonucleotídeo de acordo com a invenção é representado por uma sequência de nucleotídeos compreendendo ou consistindo em SEQ ID NO: 1600 (AAGGAAGAUGGCAUUUCU) e é para salto do éxon 51 de pré-mRNA de distrofina, compreende uma modificação de arcabouço de BNA no monômero 5'-terminal e no seu monômero vizinho e nenhum outro monômero, compreende 5-metilcitosina em vez de citosina, compreende apenas ligações fosforotioato e compreende adicionalmente apenas monômeros de RNA 2'-O-metila.

[00145] Consequentemente, em uma modalidade preferida, um oligonucleotídeo de acordo com a invenção é representado por uma sequência de nucleotídeos compreendendo ou consistindo em SEQ ID NO: 1601 (GGAAGAUGGCAUUUCU) e é para salto do éxon 51 de pré-mRNA de distrofina, compreende uma modificação de arcabouço de BNA no monômero 5'-terminal e nenhum outro monômero, compreende 5-metilcitosina em vez de citosina, compreende apenas ligações de fosforotioato e compreende adicionalmente apenas monômeros de RNA 2'-O-metila.

[00146] Consequentemente, em uma modalidade preferida, um oligonucleotídeo de acordo com a invenção é representado por uma sequência de nucleotídeos compreendendo ou consistindo na SEQ ID NO: 1602 (GGAAGAUGGCAUUUCT) e é para salto do éxon 51 de pré-mRNA de

distrofina, compreende uma modificação de arcabouço de BNA no monômero 5'-terminal e no monômero 3'-terminal e nenhum outro monômero, compreende 5-metilcitosina em vez de citosina, compreende apenas ligações de fosforotioato e compreende adicionalmente apenas monômeros de RNA 2'-O-metila.

[00147] Consequentemente, em uma modalidade preferida, um oligonucleotídeo de acordo com a invenção é representado por uma sequência de nucleotídeos compreendendo ou consistindo na SEQ ID NO: 1603 (GGAAGAUGGCAUUUCU) e é para salto do éxon 51 de pré-mRNA de distrofina, compreende pelo menos uma modificação do arcabouço de BNA no monômero 5'-terminal e no seu monômero vizinho e nenhum outro monômero, compreende 5-metilcitosina em vez de citosina, compreende apenas ligações fosforotioato e compreende adicionalmente apenas monômeros de RNA 2'-O-metila.

[00148] Consequentemente, em uma modalidade preferida, um oligonucleotídeo de acordo com a invenção é representado por uma sequência de nucleotídeos compreendendo ou consistindo na SEQ ID NO: 1604 (TCAAGGAAGAUGGCAU) e é para salto do éxon 51 de pré-mRNA de distrofina, compreende uma modificação de arcabouço de BNA no monômero 5'-terminal e em nenhum outro monômero, compreende 5-metilcitosina em vez de citosina, compreende

apenas ligações fosforotioato, e compreende adicionalmente apenas monômeros de RNA 2'-O-metila.

[00149] Consequentemente, em uma modalidade preferida, um oligonucleotídeo de acordo com a invenção é representado por uma sequência de nucleotídeos compreendendo ou consistindo na SEQ ID NO: 1605 (TCAAGGAAGAUGGCAU) e é para salto do éxon 51 de pré-mRNA de distrofina, compreende uma modificação de arcabouço de BNA no monômero 5'-terminal e no seu monômero vizinho e em nenhum outro monômero, compreende 5-metilcitosina em vez de citosina, compreende apenas ligações fosforotioato e compreende adicionalmente apenas monômeros de RNA 2'-O-metila.

[00150] Consequentemente, em uma modalidade preferida, um oligonucleotídeo de acordo com a invenção é representado por uma sequência de nucleotídeos compreendendo ou consistindo na SEQ ID NO: 1607 (CUCCAACAUCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAG) e é para salto do éxon 51 de pré-mRNA de distrofina, não compreende modificação do arcabouço de BNA em quaisquer monômeros, compreende citosina, compreende apenas ligações fosforotioato e compreende ainda apenas monômeros de RNA 2'-O-metila.

[00151] Consequentemente, em uma modalidade preferida, um oligonucleotídeo de acordo com a invenção é representado por uma sequência de nucleotídeos

compreendendo ou consistindo na SEQ ID NO: 1607 (CUCCAACAUCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAG) e é para salto do éxon 51 de pré-mRNA de distrofina, compreende pelo menos um BNA modificação de arcabouço em qualquer monômero, de preferência, apenas no monômero 5'-terminal, no monômero 3'-terminal, no monômero 5'-terminal e no 3'-terminal, nos dois monômeros mais 5'-terminais, ou nos dois monômeros mais 3'-terminais, compreende citosina, compreende apenas ligações fosforotioato e compreende adicionalmente apenas monômeros de RNA 2'-O-metila.

[00152] Consequentemente, em uma modalidade preferida, um oligonucleotídeo de acordo com a invenção é representado por uma sequência de nucleotídeos compreendendo ou consistindo em SEQ ID NO: 455 (TCAAGGAAGAUGGCAUUUCT) e é para salto do éxon 51 de pré-mRNA de distrofina, compreende uma modificação de arcabouço de BNA no monômero do 5'-terminal e no monômero 3'-terminal e em nenhum outro monômero, compreende 5-metilcitosina em vez de citosina, compreende apenas ligações de fosforotioato, e compreende adicionalmente apenas monômeros de RNA 2'-O-metila.

[00153] Consequentemente, em uma modalidade preferida, um oligonucleotídeo de acordo com a invenção é representado por uma sequência de nucleotídeos compreendendo ou consistindo na SEQ ID NO: 459

(TCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAG) e é para salto do éxon 51 de pré-mRNA de distrofina, compreende uma modificação do arcabouço de BNA no monômero 5'-terminal e nenhum outro monômero, compreende 5-metilcitosina em vez de citosina, compreende apenas ligações de fosforotioato, e compreende adicionalmente apenas monômeros de RNA 2'-O-metila.

[00154] Consequentemente, em uma modalidade preferida, um oligonucleotídeo de acordo com a invenção é representado por uma sequência de nucleotídeos compreendendo ou consistindo na SEQ ID NO: 4528 (TCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAG) e é para salto do éxon 51 de pré-mRNA de distrofina, compreende uma modificação do arcabouço de BNA no monômero 5'-terminal, o seu monômero vizinho e o seu monômero 3'-terminal e nenhum outro monômero compreende 5-metilcitosina em vez de citosina, compreende apenas ligações fosforotioato e compreende ainda apenas monômeros de RNA 2'-O-metila.

[00155] Consequentemente, em uma modalidade preferida, um oligonucleotídeo de acordo com a invenção é representado por uma sequência de nucleotídeos compreendendo ou consistindo na SEQ ID NO: 4531 (TCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAG) e é para salto do éxon 51 de pré-mRNA de distrofina, compreende uma modificação do arcabouço de BNA no monômero 5'-terminal, o seu monômero vizinho, no 13º monômero a partir da terminação 5', e no seu monômero

3'-terminal, e em nenhum outro monômero, compreende 5-metilcitosina em vez de citosina, compreende apenas ligações fosforotioato e compreende adicionalmente apenas monômeros de RNA 2'-O-metila.

[00156] Consequentemente, em uma modalidade preferida, um oligonucleotídeo de acordo com a invenção é representado por uma sequência de nucleotídeos compreendendo ou consistindo na SEQ ID NO: 4532 (TCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAG) e é para salto do éxon 51 de pré-mRNA de distrofina, compreende uma modificação do arcabouço de BNA no monômero 5'-terminal, o seu monômero vizinho, no 9º monômero a partir da terminação 5', e no seu monômero 3'-terminal, e em nenhum outro monômero, compreende 5-metilcitosina em vez de citosina, compreende apenas ligações fosforotioato e compreende adicionalmente apenas monômeros de RNA 2'-O-metila.

[00157] Consequentemente, em uma modalidade preferida, um oligonucleotídeo de acordo com a invenção é representado por uma sequência de nucleotídeos compreendendo ou consistindo na SEQ ID NO: 4533 (TCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAG) e é para salto do éxon 51 de pré-mRNA de distrofina, compreende uma modificação do arcabouço de BNA no monômero 5'-terminal, seu monômero vizinho, no 9º monômero a partir da terminação 5', no 13º monômero a partir da terminação 5', e no seu monômero 3'-terminal, e

em nenhum outro monômero, compreende 5-metilcitosina em vez da citosina, compreende apenas ligações fosforotioato, e compreende ainda apenas monômeros de RNA 2'-O-metila.

[00158] Consequentemente, em uma modalidade preferida, um oligonucleotídeo de acordo com a invenção é representado por uma sequência de nucleotídeos compreendendo ou consistindo na SEQ ID NO: 4535 (TCAAGGAAGAUGGCAUUUCT) e é para salto do éxon 51 de pré-mRNA de distrofina, compreende uma modificação de arcabouço de BNA no monômero 5'-terminal, no seu monômero vizinho e no seu monômero 3'-terminal, e em nenhum outro monômero, compreende 5-metilcitosina em vez de citosina, compreende apenas ligações fosforotioato, e compreende adicionalmente apenas monômeros de RNA 2'-O-metila.

[00159] Consequentemente, em uma modalidade preferida, um oligonucleotídeo de acordo com a invenção é representado por uma sequência de nucleotídeos compreendendo ou consistindo na SEQ ID NO: 4542 (TCAAGGAAGAUGGCAUUUCT) e é para salto do éxon 51 de pré-mRNA de distrofina, compreende uma modificação de arcabouço de BNA no monômero 5'-terminal, no seu 13º monômero a partir da terminação 5', e no seu monômero 3'-terminal, e em nenhum outro monômero, compreende 5-metilcitosina em vez de citosina, compreende apenas ligações fosforotioato e compreende ainda apenas monômeros de RNA 2'-O-metila.

[00160] Consequentemente, em uma modalidade preferida, um oligonucleotídeo de acordo com a invenção é representado por uma sequência de nucleotídeos compreendendo ou consistindo na SEQ ID NO: 4548 (CAAGGAAGAUGGCAUUUCT) e é para salto do éxon 51 de pré-mRNA de distrofina, compreende uma modificação de arcabouço de BNA no monômero 5'-terminal, no seu monômero vizinho, no seu 8º monômero a partir da terminação 5', no seu 12º monômero a partir da terminação 5', e no seu monômero 3'-terminal, e em nenhum outro monômero, compreende 5-metilcitosina em vez de citosina, compreende apenas ligações fosforotioato, e compreende adicionalmente apenas monômeros de RNA 2'-O-metila.

[00161] Por conseguinte, em uma modalidade preferida, um oligonucleotídeo de acordo com a invenção é representado por uma sequência de nucleotídeos compreendendo ou consistindo na SEQ ID NO: 4568 (GGUAAGUUCUGUCCAAGC) e é para salto do éxon 51 de pré-mRNA de distrofina, compreende uma modificação de arcabouço de BNA no monômero 5'-terminal, no seu monômero vizinho, no seu 6º monômero a partir da terminação 5', e no seu monômero 3'-terminal, e em nenhum outro monômero, compreende 5-metilcitosina em vez de citosina, compreende apenas fosforotioato ligações, e compreende adicionalmente apenas monômeros de RNA 2'-O-metila.

[00162] Em uma modalidade preferida, um oligonucleotídeo é representado por uma sequência de nucleotídeos compreendendo ou consistindo na SEQ ID NO: 614-841 e é para salto do éxon 52 de pré-mRNA de distrofina e compreende um ou mais dos seguintes:

- pelo menos um monômero 2'-substituído
- pelo menos uma ligação de esqueleto de fosforotioato;
- apenas monômeros 2'-substituídos;
- apenas ligações de esqueleto de fosforotioato;
- apenas monômeros 2'-substituídos ligados por ligações de esqueleto de fosforotioato;
- uma base de 5-metilcitosina e/ou 5-metiluracila;
- apenas bases de 5-metilcitosina em vez de bases de citosina;
- pelo menos um monômero compreendendo uma modificação de arcabouço de ácido nucleico bicíclico (BNA).

[00163] De preferência, o referido oligonucleotídeo compreende apenas monômeros 2'-substituídos, apenas ligações de esqueleto de fosforotioato e pelo menos uma modificação de monômero compreendendo um arcabouço de BNA. Mais de preferência, o referido oligonucleotídeo é representado por uma sequência de nucleotídeos compreendendo ou consistindo em SEQ ID NO: 615-619, 621-625, 627-631, 633-637, 639-643, 645-649, 651-655, 657-661,

663-667, 669-673, 675-679, 681-685, 687-691, 693-697, 699-703, 705-709, 711-715, 717-721, 723-727, 729-733, 735-739, 741-745, 747-751, 753-757, 759-763, 765-769, 771-775, 777-781, 783-787, 789-793, 795-799, 801-805, 807-811, 813-817, 819-823, 825-829, 831-835 ou 837-841. De preferência, o referido oligonucleotídeo tem um comprimento de 10 a 33 nucleotídeos, mais de preferência, de 16 a 22 nucleotídeos.

[00164] Em uma modalidade preferida, um oligonucleotídeo é representado por uma sequência de nucleotídeos compreendendo ou consistindo em SEQ ID NO: 842-1159 ou SEQ ID NO: 4573-6048 e é para salto do éxon 53 de pré-mRNA de distrofina e compreende um ou mais dos seguintes:

- pelo menos um monômero 2'-substituído
- pelo menos uma ligação de esqueleto de fosforotioato;
- apenas monômeros 2'-substituídos;
- apenas ligações de esqueleto de fosforotioato;
- apenas monômeros 2'-substituídos ligados por ligações de esqueleto de fosforotioato;
- uma base de 5-metilcitosina e/ou 5-metiluracila;
- apenas bases de 5-metilcitosina em vez de bases de citosina;
- pelo menos um monômero compreendendo uma modificação de arcabouço de ácido nucleico bicíclico (BNA).

[00165] De preferência, o referido oligonucleotídeo compreende apenas monômeros 2'-substituídos, apenas ligações de esqueleto de fosforotioato, e pelo menos um monômero compreendendo uma modificação de arcabouço de BNA. Mais de preferência, o referido oligonucleotídeo é representado por uma sequência de nucleotídeos compreendendo ou consistindo em SEQ ID NO: 843-847, 849-853, 855-859, 861-865, 867-871, 873-877, 879-883, 885-889, 891-895, 897-901, 903-907, 909-913, 915-919, 921-925, 927-931, 933-937, 939-943, 945-949, 951-955, 957-961, 963 -967, 969-973, 975-979, 981-985, 987-991, 993-997, 999-1003, 1005-1009, 1011-1015, 1017-1021, 1023-1027, 1029-1033, 1035- 1039, 1041-1045, 1047-1051, 1053-1057, 1059-1063, 1065-1069, 1071-1075, 1077-1081, 1083-1087, 1089-1093, 1095-1099, 1101-1105, 1107-1111, 1113-1117, 1119-1123, 1125-1129, 1131-1135, 1137-1141, 1143-1147, 1149-1153 ou 1155-1159. De preferência, o referido oligonucleotídeo tem um comprimento de 10 a 33 nucleotídeos, mais de preferência, de 16 a 22 nucleotídeos.

[00166] Em uma modalidade preferida, um oligonucleotídeo é representado por uma sequência de nucleotídeos compreendendo ou consistindo na SEQ ID NO: 1160-1399 e é para salto do éxon 55 de pré-mRNA de distrofina e compreende um ou mais dos seguintes:

- pelo menos um monômero 2'-substituído

- pelo menos uma ligação de esqueleto de fosforotioato;
- apenas monômeros 2'-substituídos;
- apenas ligações de esqueleto de fosforotioato;
- apenas monômeros 2'-substituídos ligados por ligações de esqueleto de fosforotioato;
- uma base de 5-metilcitosina e/ou 5-metiluracila;
- apenas bases de 5-metilcitosina em vez de bases de citosina;
- pelo menos um monômero compreendendo uma modificação de arcabouço de ácido nucleico bicíclico (BNA).

[00167] De preferência, o referido oligonucleotídeo compreende apenas monômeros 2'-substituídos, apenas ligações de esqueleto de fosforotioato, e pelo menos um monômero compreendendo uma modificação de arcabouço de BNA. Mais de preferência, o referido oligonucleotídeo é representado por uma sequência de nucleotídeos compreendendo ou consistindo em SEQ ID NO: 1161-1165, 1167-1171, 1173-1177, 1179-1183, 1185-1189, 1191-1195, 1197-1201, 1203-1207, 1209-1213, 1215-1219, 1221-1225, 1227-1231, 1233-1237, 1239-1243, 1245-1249, 1251-1255, 1257-1261, 1263-1267, 1269-1273, 1275-1279, 1281-1285, 1287-1291, 1293-1297, 1299-1303, 1305-1309, 1311-1315, 1317-1321, 1323-1327, 1329-1333, 1335-1339, 1341-1345, 1347-1351, 1353-1357, 1359-1363, 1365-1369, 1371-1375, 1377-

1381, 1383-1387, 1389-1393 ou 1395-1399. De preferência, o referido oligonucleotídeo tem um comprimento de 10 a 33 nucleotídeos, mais de preferência, de 16 a 22 nucleotídeos.

[00168] Em uma modalidade preferida, um oligonucleotídeo é representado por uma sequência de nucleotídeos compreendendo ou consistindo na SEQ ID NO: 1400-1579 e é para incluir o éxon 7 do pré-mRNA de SMN2 e compreende um ou mais dos seguintes:

- pelo menos um monômero 2'-substituído
- pelo menos uma ligação de esqueleto de fosforotioato;
- apenas monômeros 2'-substituídos;
- apenas ligações de esqueleto de fosforotioato;
- apenas monômeros 2'-substituídos ligados por ligações de esqueleto de fosforotioato;
- uma base de 5-metilcitosina e/ou 5-metiluracila;
- apenas bases de 5-metilcitosina em vez de bases de citosina;
- pelo menos um monômero compreendendo uma modificação de arcabouço de ácido nucleico bicíclico (BNA).

[00169] De preferência, o referido oligonucleotídeo compreende apenas monômeros 2'-substituídos, apenas ligações de esqueleto de fosforotioato, e pelo menos um monômero compreendendo uma modificação de arcabouço de BNA. Mais de preferência, o referido oligonucleotídeo é

representado por uma sequência de nucleotídeos compreendendo ou consistindo na SEQ ID NO: 1606, em que não compreende nenhuma modificação de arcabouço de BNA, ou compreendendo ou consistindo na SEQ ID NO: 1490, em que compreende modificações de arcabouço de BNA em qualquer monômero, de preferência, apenas no monômero 5'-terminal, no monômero 3'-terminal, no monômero 5'-terminal e 3'-terminal, nos dois monômeros mais 5'-terminais, ou nos dois monômeros mais 3'-terminais. De preferência, o referido oligonucleotídeo tem um comprimento de 10 a 33 nucleotídeos, mais de preferência, de 16 a 22 nucleotídeos.

[00170] Em uma modalidade preferida, um oligonucleotídeo representado por uma sequência de nucleotídeos compreendendo ou consistindo na SEQ ID N 1400-1441 e é direcionada ao íntron 6 do pré-mRNA de SMN2 e compreende um ou mais dos seguintes:

- pelo menos um monômero 2'-substituído
- pelo menos uma ligação de esqueleto de fosforotioato;
- apenas monômeros 2'-substituídos;
- apenas ligações de esqueleto de fosforotioato;
- apenas monômeros 2'-substituídos ligados por ligações de esqueleto de fosforotioato;
- uma base de 5-metilcitosina e/ou 5-metiluracila;
- apenas bases de 5-metilcitosina em vez de bases de

citossina;

- pelo menos um monômero compreendendo uma modificação de arcabouço de ácido nucleico bicíclico (BNA).

[00171] De preferência, o referido oligonucleotídeo compreende apenas monômeros 2'-substituídos, apenas ligações de esqueleto de fosforotioato, e pelo menos um monômero compreendendo uma modificação de arcabouço de BNA. Mais de preferência, o referido oligonucleotídeo é representado por uma sequência de nucleotídeos compreendendo ou consistindo em SEQ ID NO: 1401-1405, 1407-1411, 1413-1417, 1419-1423, 1425-1429, 1431-1435, 1437-1441. De preferência, o referido oligonucleotídeo tem um comprimento de 10 a 33 nucleotídeos, mais de preferência, de 16 a 22 nucleotídeos.

[00172] Em uma modalidade preferida, um oligonucleotídeo é representado por uma sequência de nucleotídeos compreendendo ou consistindo na SEQ ID NO: 1442-1579 e é direcionado ao íntron 7 do pré-mRNAs de SMN2 e compreende um ou mais dos seguintes:

- pelo menos um monômero 2'-substituído
- pelo menos uma ligação de esqueleto de fosforotioato;
- apenas monômeros 2'-substituídos;
- apenas ligações de esqueleto de fosforotioato;
- apenas monômeros 2'-substituídos ligados por

ligações de esqueleto de fosforotioato;

- uma base de 5-metilcitosina e/ou 5-metiluracila;
- apenas bases de 5-metilcitosina em vez de bases de citosina;
- pelo menos um monômero compreendendo uma modificação de arcabouço de ácido nucleico bicíclico (BNA).

[00173] De preferência, o referido oligonucleotídeo compreende apenas monômeros 2'-substituídos, apenas ligações de esqueleto de fosforotioato, e pelo menos um monômero compreendendo uma modificação de arcabouço de BNA. Mais de preferência, o referido oligonucleotídeo é representado por uma sequência de nucleotídeos compreendendo ou consistindo em SEQ ID NO: 1443-1447, 1449-1453, 1455-1459, 1461-1465, 1467-1471, 1473-1477, 1479-1483, 1485-1489, 1491-1495, 1497-1501, 1503-1507, 1509-1513, 1515-1519, 1521-1525, 1527-1531, 1533-1537, 1539-1543, 1545-1549, 1551-1555, 1557-1561, 1563-1567, 1569-1573, 1575-1579. Mais de preferência, o referido oligonucleotídeo é representado por uma sequência de nucleotídeos compreendendo ou consistindo na SEQ ID NO: 1490, em que compreende modificações de arcabouço de BNA em qualquer monômero, de preferência apenas no monômero 5'-terminal, no monômero 3'-terminal, nos monômeros 5'-terminal e no 3'-terminal, os dois monômeros mais 5'-terminais, ou os dois monômeros mais 3'-terminais. De

preferência, o referido oligonucleotídeo tem um comprimento de 10 a 33 nucleotídeos, mais de preferência, de 16 a 22 nucleotídeos, mais de preferência, 18 monômeros.

[00174] Em uma modalidade preferida, um oligonucleotídeo de acordo com a invenção é representado por uma sequência de nuclotídeos compreendendo ou consistindo em SEQ ID NO: 1606 (UCACUUUCAUAAUGCUGG) e é direcionado ao intron 7 do pré-mRNA de SMN2, não compreende modificação de arcabouço de BNA em qualquer monômero, compreende 5-metilcitosina em vez de citosina, compreende apenas ligações fosforotioato, e compreende adicionalmente apenas monômeros de RNA 2'-O-metila.

[00175] Em modalidades preferidas, o oligonucleotídeo de acordo com a invenção é um em que o referido oligonucleotídeo possui um parâmetro melhorado por comparação com um oligonucleotídeo correspondente que não compreende uma modificação de arcabouço de ácido nucleico bicíclico (BNA). Verificou-se que a presença de um BNA com 5-metilcitosina ou 5-metiluracila em um oligonucleotídeo da invenção tem um efeito positivo em pelo menos um dos parâmetros dos referidos oligonucleotídeos. Neste contexto, os parâmetros podem incluir: afinidade de ligação e/ou cinética, atividade de salto de éxon, bioestabilidade, distribuição (intratecido), captação e/ou tráfego celular e/ou imunogenicidade do referido oligonucleotídeo, como

explicado abaixo.

[00176] A afinidade e cinética de ligação dependem das propriedades termodinâmicas do oligonucleotídeo. Estas são, pelo menos em parte, determinadas pela temperatura de fusão do referido oligonucleotídeo (T_m ; calculado, por exemplo, com a calculadora das propriedades dos oligonucleotídeos (acessível através da Internet, por exemplo, em www.unc.edu/~cail/biotool/oligo/index.html ou por exemplo, eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/) para RNA de cadeia única usando o T_m básico e o modelo vizinho mais próximo), e/ou a energia livre do complexo de éxon direcionado a oligonucleotídeo (usando RNA structure versão 4.5 ou RNA mfold versão 3.5). Se uma T_m é aumentada, a atividade de salto do éxon tipicamente aumenta, mas quando uma T_m é muito alta, espera-se que o oligonucleotídeo se torne menos específico para a sequência. Uma T_m e energia livre aceitáveis dependem da sequência do oligonucleotídeo. Portanto, é difícil fornecer faixas preferidas para cada um desses parâmetros.

[00177] A atividade do salto de éxon é, de preferência, medida através da análise de RNA total isolado de culturas de células musculares ou tecido muscular tratado(as) com oligonucleotídeos através da reação em cadeia de polimerase em gotas quantitativas ou digitais de

transcriptase reversa (RT-qPCR ou RT-ddPCR) usando iniciadores específicos do gene de DMD flanqueando o éxon direcionado como descrito (Aartsma-Rus et al., 2003, Spitali et al., 2013). A razão de fragmentos de transcrito mais curtos, representando transcritos nos quais o éxon direcionado salta, ao total de produtos transcritos, é avaliada (calculada como percentagem de saltos de éxons induzidos por um oligonucleotídeo). Fragmentos mais curtos também podem ser sequenciados para determinar a correção e a especificidade do salto do éxon direcionado.

[00178] Em certas modalidades, a atividade de modulação de RNA pode ser um aumento ou uma diminuição em uma quantidade de um ácido nucleico ou proteína. Em certas modalidades, essa atividade pode ser uma alteração na razão de variantes de splicing de um ácido nucleico ou uma proteína. A detecção e/ou medição da atividade antissentido pode ser direta ou indireta. Em certas modalidades, a atividade antissentido é avaliada pela observação de uma alteração fenotípica em uma célula ou um animal.

[00179] Como aqui usado e explicado acima, "modulação" pode referir-se a uma perturbação da quantidade ou qualidade de uma função ou atividade quando comparada com a função ou atividade anterior à modulação. Por exemplo, a modulação inclui a alteração, seja um aumento (estimulação ou indução) ou uma diminuição (inibição ou

redução) na expressão gênica. Como um outro exemplo, a modulação da expressão pode incluir a seleção de sítios de splicing de perturbação do processamento de pré-mRNA, resultando em uma alteração na quantidade de uma variante de splicing presente, em comparação com condições que não foram perturbadas. Como outro exemplo, a modulação inclui a tradução perturbadora de uma proteína.

[00180] A biodistribuição e bioestabilidade são, de preferência, pelo menos em parte determinadas por um ensaio de ligação de hibridização validado adaptado de Yu et al., 2002. Em uma modalidade, amostras de tecido de plasma ou homogeneizado são incubadas com uma sonda de oligonucleotídeos de captura específica. Depois da separação, um oligonucleotídeo rotulado com DIG é ligado ao complexo e a detecção é seguida usando uma peroxidase ligada a anticorpo anti-DIG. A análise farmacocinética não compartimental é realizada usando o pacote de software WINNONLIN (modelo 200, versão 5.2, Pharsight, Mountainview, CA). Os níveis de oligonucleotídeo (μg) por mL de plasma ou mg de tecido são monitorados ao longo do tempo para avaliar a área sob a curva (AUC), concentração de pico (C_{max}), tempo até à concentração de pico (T_{max}), semi-vida terminal e tempo de retardo da absorção (t_{retardo}). Um tal ensaio preferido foi descrito na parte experimental.

[00181] Consequentemente, um oligonucleotídeo

preferido da invenção tem um parâmetro melhorado, tal como uma imunogenicidade aceitável ou diminuída e/ou uma melhor biodistribuição e/ou cinéticas de ligação a RNA aceitável ou melhorada e/ou propriedades termodinômicas em comparação com um oligonucleotídeo correspondente que difere apenas do oligonucleotídeo da invenção através da omissão de modificações de arcabouço de BNA, isto é, por comparação com um oligonucleotídeo da mesma sequência, também compreendendo monômeros substituídos com 2'-O-metila, 5'-metilcitosina e/ou 5'-metiluracila, opcionalmente fosforotioato, ainda sem um arcabouço modificado por BNA. Cada um destes parâmetros pode ser avaliado usando ensaios conhecidos da pessoa habilitada ou, de preferência, tal como aqui descrito.

Outras modificações químicas do oligonucleotídeo

[00182] Abaixo são descritos outras químicas e modificações do oligonucleotídeo da invenção. Estas químicas e modificações adicionais podem estar presentes em combinação com a química já definida para o referido oligonucleotídeo, isto é, a presença de pelo menos 1 modificação de arcabouço de BNA com ou sem uma 5-metilcitosina e/ou um 5-metiluracila, e/ou o oligonucleotídeo compreendendo ou consistindo em um monômero 2'-O-metila com ligações de esqueleto de fosforotioato opcionais.

[00183] Um oligonucleotídeo preferido da invenção compreende ou consiste em uma molécula de RNA ou em uma molécula de RNA modificada. Em uma modalidade preferida, um oligonucleotídeo é de cadeia simples. A pessoa habilitada compreenderá, no entanto, que é possível que um oligonucleotídeo de cadeia simples possa formar uma estrutura interna de cadeia dupla. Contudo, este oligonucleotídeo é ainda denominado oligonucleotídeo de cadeia simples no contexto desta invenção.

[00184] Além das modificações descritas acima, o oligonucleotídeo da invenção pode compreender outras modificações, tais como diferentes tipos de monômeros de ácidos nucleicos ou nucleotídeos, como descrito abaixo. Diferentes tipos de monômeros de ácido nucleico podem ser usados para gerar um oligonucleotídeo da invenção. O referido oligonucleotídeo pode ter pelo menos um esqueleto e/ou modificação de arcabouço e/ou pelo menos uma modificação de base em comparação com um oligonucleotídeo baseado em RNA.

[00185] Uma modificação de base pode incluir uma versão modificada das bases naturais de purina e pirimidina (*por exemplo*, adenina, uracila, guanina, citosina e timina), tal como hipoxantina, pseudouracila, pseudocitosina, 1-metilpseudouracila, ácido orótico, agmatidina, lisidina, 2- tiopirimidina (*por exemplo*, 2-

tiouracila, 2-tiotimina), G-clamp e seus derivados, pirimidina 5-substituída (por exemplo, 5-halouracila, 5-halometiluracila, 5-trifluormetiluracila, 5-propiniluracila, 5-propinilcitosina, 5-aminometiluracila, 5-hidroximetiluracila, 5-aminometilcitosina, 5-hidroximetilcitosina, Super T, ou como descrito em, por exemplo, Kumar et al., *J. Org. Chem.* 2014, 79, 5047; Leszczynska et al. *Org. Biol. Chem.* 2014, 12, 1052), pirazol[1,5-a]-1,3,5-triazina C-nucleosídeo (como, por exemplo, em Lefoix et al., *J. Org. Chem.* 2014, 79, 3221), 7-desazaguanina, 7-deaza-adenina, 7-aza-2,6-diaminopurina, 8-aza-7-desazaguanina, 8-aza-7-deaza-adenina, 8-aza-7-deaza-2,6- diaminopurina, Super G, Super A, citosina borada (como em, por exemplo, Niziot et al., *Bioorg. Med. Chem.* 2014, 22, 3906), pseudoisocitidina, C(Pyc) (como em, por exemplo, Yamada et al. *Org. Biomol. Chem.* 2014, 12, 2255) e N4-etilcitosina, ou derivados dos mesmos; N²-ciclopentilguanina (cPent-G), N²-ciclopentil-2-aminopurina (cPent-AP) e N²-propil-2-aminopurina (Pr-AP), uracila modificado com carboidrato (como por exemplo, em Kaura et al. *Org. Lett.* 2014, 16, 3308), uracila modificado com aminoácido (como, por exemplo, Guenther et al. *Chem. Commun.* 2014, 50, 9007); ou derivados dos mesmos; e bases degeneradas ou universais, como 2,6-difluorotolueno ou bases ausentes como sítios abásicos (por exemplo, 1-

desoxirribose, 1,2-didesoxirribose, 1-desoxi-2-O-metilribose; ou derivados de pirrolidina nos quais o oxigênio do anel tenha sido substituído por nitrogênio (azaribose)). Exemplos de derivados de Super A, Super G e Super T podem ser encontrados na patente US 6.683.173 (Epoch Biosciences), que é aqui incorporada inteiramente por referência. cPent-G, cPent-AP e Pr-AP mostraram reduzir os efeitos imunoestimuladores quando incorporados em siRNA (Peacock H. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 2011, 133, 9200). Exemplos de bases modificadas são descritos, *por exemplo*, WO2014/093924 (ModeRNA).

[00186] Dependendo do seu comprimento, um oligonucleotídeo da invenção pode compreender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 ou 34 modificações de base. É também abrangido pela invenção introduzir mais do que uma modificação de base distinta no referido oligonucleotídeo.

[00187] Além das modificações de arcabouço de BNA já descritas, uma modificação do esqueleto pode incluir uma versão modificada da porção ribosila, tal como RNA 2'-O-modificado, tal como 2'-O-alquila ou 2'-O-alquila(substituído), *por exemplo*, 2'-O-metila, 2'-O-(2-cianoetila), 2'-O-(2-metoxi)etil(2'-MOE), 2'-O-(2-tiometil)etila, 2'-O-butirila, 2'-O-propargila, 2'-O-

acetalester (tal como, *por exemplo*, Biscans *et al.* *Bioorg. Med. Chem.* 2015, 23, 5360), 2'-O-alila, 2'-O-(2S-metoxipropila), 2'-O-(N-(aminoetil)carbamoil)metil (2'-AECM), 2'-O-(2-carboxietila) e derivados de carbamoila (Yamada *et al.* *Org. Biomol Chem.*, 2014, 12, 6457), 2'-O-(2-amino)propila, 2'-O-(2-(dimetilamino)propila), 2'-O-(2-amino)etila, 2'-O-(2-(dimetilamino)etila); 2'-desoxi (DNA); 2'-O-(haloalcoxi)metila (Arai K. *et al.* *Bioorg. Med. Chem.* 2011, 21, 6285) *por exemplo*, 2'-O-(2-cloroetoxi)metila (MCEM), 2'-O-(2,2-dicloroetoxi)metila (DCEM); 2'-O-alcoxicarbonila, *por exemplo*, 2'-O-[2-(metoxicarbonil)etila] (MOCE), 2'-O-[2-(N-metilcarbamoil)etila] (MCE), 2'-O-[2-(N,N-dimetilcarbamoil)etila] (DCME), 2'-O-[2-(metiltio)etila] (2'-MTE), 2'-(ω -O-serinol); 2'-halo, *por exemplo*, 2'-F, FANA (ácido nucleico de 2'-F arabinosila); 2',4'-difluoro-2'-desoxi; modificações de carba-açúcar e aza-açúcar; 3'-O-substituído, *por exemplo*, 3'-O-metila, 3'-O-butirila, 3'-O-propargila; 4'-substituído, *por exemplo*, 4'-aminometil-2'-O-metila ou 4'-aminometil-2'-fluoro; 5'-substituído, *por exemplo*, 5'-metila ou CNA (Østergaard *et al.*, *ACS Chem. Biol.* 2014, 22, 6227); e derivados dos mesmos.

[00188] Dependendo do seu comprimento, um oligonucleotídeo da invenção pode compreender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20,

21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 ou 32, ou 33 modificações de arcabouço adicionais a pelo menos 1 modificação de arcabouço de BNA. É também englobado pela invenção introduzir mais de uma modificação distinta do esqueleto no referido oligonucleotídeo.

[00189] Outras modificações incluem ácido nucleico desbloqueado (UNA); ácido nucleico de ciclohexenila (CeNA), F-CeNA, ácido nucleico de ciclohexanila (CNA), ácido nucleico de *ribo*-ciclohexanila (*r*-CNA), ácido nucleico de altritól (ANA), ácido nucleico de hexitol (HNA), HNA fluorado (F-HNA), piranosil-RNA (p-RNA), 3'-deoxipiranosil-DNA (p-DNA); e derivados dos mesmos. Exemplos de análogos de ácidos nucleicos fluorados com anéis de açúcar de furanose e não furanose estão também englobados e são descritos em, *por exemplo*, Østergaard *et al.* J. Org. Chem. 2014, 79, 8877.

[00190] Dependendo do seu comprimento, um oligonucleotídeo da invenção pode compreender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 ou 34 modificações de arcabouço além de pelo menos 1 modificação de arcabouço de BNA. Em uma modalidade preferida, um oligonucleotídeo da invenção é totalmente modificado em 2'-O-metila e contém 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 modificações de arcabouço de BNA.

[00191] Os oligonucleotídeos de acordo com a invenção podem compreender modificações de ligação de esqueleto. Uma modificação da ligação de esqueleto pode ser, mas não é limitada a, uma versão modificada do fosfodiéster presente no RNA, tal como fosforotioato (PS), fosforotioato quiralmemente puro, (R)-fosforotioato, (S)-fosforotioato, fosforoditioato (PS2) fosfonoacetato (PACE), fosfonoacetamida (PACA), tiofosfonoacetato (tioPACE), tiofosfonoacetamida, pró-fármaco fosforotioato, H-fosfonato, metil fosfonato, metil fosfonotioato, metil fosfato, metil fosforotioato, etil fosfato, etil fosforotioato, boranofosfato, boranofosforotioato, metil boranofosfato, metil boranofosforotioato, metil boranofosfonato, metil boranofosfonotioato, fosfato, fosfotriéster, aminoalquilfosfotriéster e derivados dos mesmos. Outra modificação inclui fosforil guanidina, fosforamidita, fosforamidato, fosforamidato de N3'→P5', fosfordiamidato, fosforotiodiamidato, sulfamato, dimetilenossulfóxido, amida, sulfonato, siloxano, sulfeto, sulfona, formacetila, tioformacetila, metileno formalcetila, alquenila, metileno-hidrazino, sulfonamida, amida, triazol, oxalila, carbamato, metileneimino (MMI) e ácido nucleico de tioacetamido (TANA); e derivados dos mesmos. Exemplos de ligações fosforotioato quiralmemente puras são descritas em, *por exemplo*, WO2014/010250 ou

WO2017/062862 (WaVe Life Sciences). Exemplos de ligações de fosforil-guanidina estão descritos em WO2016/028187 (Noogen). Vários sais, sais mistos e formas de ácido livre também estão incluídos, assim como as ligações 3'→3' e 2'→5'.

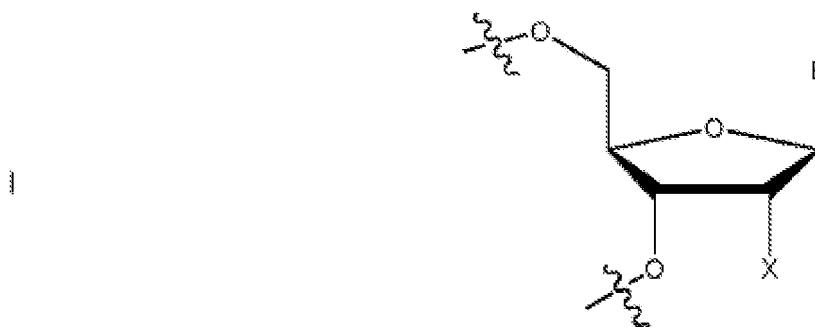
[00192] Dependendo do seu comprimento, um oligonucleotídeo da invenção pode compreender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32 ou 33 modificações de ligação de esqueleto. É também abrangido pela invenção introduzir mais do que uma modificação de esqueleto distinta no referido oligonucleotídeo.

[00193] Em uma modalidade preferida, um oligonucleotídeo da invenção compreende pelo menos uma modificação de fosforotioato. Em uma modalidade mais preferida, um oligonucleotídeo da invenção é totalmente modificado com fosforotioato. Em outra modalidade preferida, um oligonucleotídeo da invenção compreende pelo menos um fosfato.

[00194] Outras modificações químicas de um oligonucleotídeo da invenção incluem a substituição de um ou mais de um dos átomos de hidrogênio com deutério ou trítio, exemplos dos quais podem ser encontrados, *por exemplo*, WO2014/022566 (Ased) ou WO2015/011694 (Celgene).

[00195] Com o advento da tecnologia de imitação de ácido nucleico tornou-se possível gerar moléculas que têm um semelhante, de preferência, as mesmas características de hibridização em espécie, não necessariamente em quantidade como o próprio ácido nucleico. Esses equivalentes funcionais são evidentemente também adequados para uso na invenção.

a) pelo menos um monômero tem fórmula I:



em que:

B é uma nucleobase;

X é F, $-NR^1R^2$ ou $-OR$;

R é alquenila ou alquila opcionalmente substituído, em que os substituintes opcionais, quando presentes, são halo, OR^1 , NR^1R^2 ou SR^1 ;

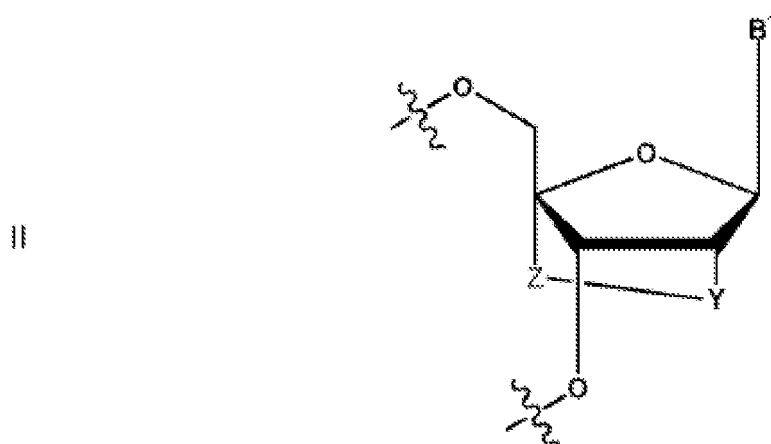
R^1 é H, alquila, cicloalquila, arila, heterocicloalquila ou heteroarila, cada um independentemente, opcionalmente, ainda substituído com halo, hidroxil ou alquila;

R^2 é H ou alquila; e



indica o ponto de ligação ao restante do oligonucleotídeo;

b) em que pelo menos um monômero compreende uma modificação de arcabouço de BNA e tem a fórmula II:



em que:

B^1 é uma nucleobase;

Z-Y é um grupo divalente selecionado de $-(CH_2)_nO-$, $-C(CH_2CH_2)O-$, $-CH_2WCH_2-$, $-(CH_2)_nNR^3-$, $-CH_2S(O_m)-$, $-CH(CH_3)O-$, $-CH(CH_2OCH_3)O-$, $-CH_2N(R^3)O-$, $-CH_2CH_2-$, $-C(O)NR^3-$, $-CH=CHO-$, $-CH_2SO_2NR^3-$ e $-NHC(O)NH-$;

n é 1 ou 2;

m é 0, 1 ou 2;

W é O, S ou NR^3 ;

R^3 é H, $-C(O)R^4$, $-C(=NH)NR^5R^5$, benzila, ou alquila opcionalmente substituído, em que os substituintes opcionais, quando presentes, são selecionados de entre halo e alcoxi;

R^4 é alquila, cicloalquila ou arila;

R^5 é H ou alquila; e



indica o ponto de ligação ao restante do oligonucleotídeo;

c) em que os monômeros são ligados por ligações de esqueleto de fosforotioato e/ou por ligações de esqueleto de fosfodiéster; e

d) em que pelo menos uma nucleobase no oligonucleotídeo é uma base de 5-metilcitosina ou 5-metiluracila.

[00196] O termo "o restante do oligonucleotídeo", como aqui usado, refere-se geralmente a monômeros vizinhos. Como uma pessoa habilitada compreenderá, quando um monômero de fórmula I ou de fórmula II é um monômero terminal, um remanescente do oligonucleotídeo pode ser -H. Para qualquer monômero de fórmula I ou de fórmula II, ambos os remanescentes podem ser monômeros vizinhos. Em contraste, para qualquer monômero de fórmula I ou de fórmula II no máximo um único resto pode constituir uma terminação e assim, por exemplo, ser -H. Como entendido por uma pessoa habilitada, um oligonucleotídeo inteiro tem apenas duas terminações.

[00197] Z-Y é um grupo bivalente. É preferível que um tal grupo divalente esteja ligado à posição 4' do

arcabouço (perto de Z) com a ligação no lado esquerdo da sua representação textual, e à posição 2' do arcabouço (perto de Y) com a ligação no lado direito de sua representação textual. Por exemplo, quando se diz que o grupo bivalente é $-\text{CH}_2-\text{O}-$, é preferível que $-\text{CH}_2-$ esteja ligado à posição 4' do arcabouço, e que $-\text{O}-$ esteja ligado à posição 2' do arcabouço. Isso formaria um monômero de LNA.

[00198] O referido oligonucleotídeo é, de preferência, para uso em métodos ou composições de acordo com a invenção. A referida nucleobase sob d) pode ser B ou B^1 ou outra nucleobase.

[00199] Em outra modalidade, X é F ou $-\text{OR}$. Em outra modalidade, X é F. Em outra modalidade, X é $-\text{OR}$. Em outra modalidade, X é F, $-\text{OCH}_3$ ou $-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$. Em outra modalidade, X é $-\text{OCH}_3$ ou $-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$. Em outra modalidade, X é $-\text{OCH}_3$. Em outra modalidade, X é F ou $-\text{OCH}_3$. Em outra modalidade, X é F ou $-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$.

[00200] Em outra modalidade, R é alquila não substituído. Em outra modalidade, R é CH_3 ou etila. Em outra modalidade, R é CH_3 . Em outra modalidade, R é etila. Em outra modalidade, R é alquila substituído com halo, OR^1 , NR^1R^2 ou SR^1 . Em outra modalidade, R é alquila substituído com OR^1 ou NR^1R^2 . Em outra modalidade, R é alquila substituído com OR^1 .

[00201] Em outra modalidade, R^1 é H ou alquila não

substituído. Em outra modalidade, R^1 é alquila não substituído. Em outra modalidade, R é CH_3 . Em outra modalidade, R^2 é H. Em outra modalidade, R^2 é alquila. Em outra modalidade, R^2 é CH_3 .

[00202] Em outra modalidade, Z-Y é um grupo divalente selecionado de entre $-(CH_2)_nO-$, $-C(CH_2CH_2)O-$, $-CH_2WCH_2-$, $-CH_2NR^3-$, $-CH_2S(O_m)-$, $-CH(CH_3)O-$, $-CH(CH_2OCH_3)O-$, $-CH_2CH_2-$, $-C(O)NR^3-$, $-CH=CHO-$, $-CH_2SO_2NR^3-$ e $-NHC(O)NH-$. Em outra modalidade, Z-Y é um grupo divalente selecionado de entre $-(CH_2)_nO-$, $-CH_2WCH_2-$, $-CH_2NR^3-$, $-CH(CH_3)O-$, $-CH(CH_2OCH_3)O-$, $-CH_2CH_2-$ e $-C(O)NR^3-$. Em outra modalidade, Z-Y é selecionado de $-(CH_2)_nO-$, $-CH_2NR^3-$, $-CH(CH_3)O-$, $-CH(CH_2OCH_3)O-$, $-CH_2CH_2-$ e $-C(O)NR^3-$. Em outra modalidade, Z-Y é selecionado de $-(CH_2)_nO-$, $-CH_2OCH_2-$, $-CH_2NR^3CH_2-$ e $-CH_2NR^3-$. Em outra modalidade, Z-Y é selecionado de entre $-(CH_2)_nO-$, $-CH_2OCH_2-$, $-CH_2NHCH_2-$, $-CH_2NH-$, $-CH_2N(CH_3)CH_2-$ e $-CH_2N(CH_3)-$. Em outra modalidade, Z-Y é selecionado de $-CH_2O-$, $-CH_2OCH_2-$, $-CH_2NHCH_2-$ e $-CH_2NH-$. Em outra modalidade, Z-Y é selecionado de $-CH_2O-$, $-CH_2OCH_2-$ ou $-CH_2NH-$. Em outra modalidade, Z-Y é selecionado de $-(CH_2)_nO-$, $-CH(CH_3)O-$ e $-CH(CH_2OCH_3)O-$. Em outra modalidade, Z-Y é $-(CH_2)_nO-$. Em outra modalidade, Z-Y é $-CH_2CH_2O-$. Em outra modalidade, Z-Y é $-CH_2O-$. Em outra modalidade, Z-Y é $-CH_2NH-$.

[00203] Em outra modalidade, W é O, S ou NH. Em outra modalidade, W é O. Em outra modalidade, W é S. Em

outra modalidade, W é O, NH ou NCH₃. Em outra modalidade, W é O ou NH. Em outra modalidade, W é NH.

[00204] Em outra modalidade, R³ representa H, -C(O)R⁴ ou alquila não substituído. Em outra modalidade, R³ é H, -C(O)R⁴ ou CH₃. Em outra modalidade, R³ é H, -C(O)CH₃ ou CH₃.

[00205] Em outra modalidade, R⁴ é alquila. Em outra modalidade, R⁴ é CH₃.

[00206] Em outra modalidade, R⁵ é H. Em outra modalidade, R⁵ é alquila.

[00207] Em outra modalidade, X é F, -OCH₃ ou -O-CH₂CH₂OCH₃; e Z-Y é -(CH₂)_nO-, -CH₂OCH₂-, -CH₂NR³CH₂- ou -CH₂NR³-. Em outra modalidade, X é F, -OCH₃ ou -O-CH₂CH₂OCH₃; e Z-Y é -(CH₂)_nO-, -CH₂OCH₂-, -CH₂NHCH₂- ou -CH₂NH-, -CH₂N(CH₃)CH₂- ou -CH₂N(CH₃)-. Em outra modalidade, X é F, -OCH₃ ou -O-CH₂CH₂OCH₃; e Z-Y é -CH₂O-, -CH₂OCH₂-, -CH₂NHCH₂- ou -CH₂NH-. Em outra modalidade, X é F, -OCH₃ ou -O-CH₂CH₂OCH₃; e Z-Y é selecionado de entre -CH₂O-, -CH₂OCH₂- e -CH₂NH-. Em outra modalidade, X é F ou -OCH₃; e Z-Y é selecionado de entre -CH₂O-, -CH₂OCH₂- e -CH₂NH-. Em outra modalidade, X é F ou OCH₃; e Z-Y é -CH₂O-.

[00208] Em outra modalidade, pelo menos, pelo menos um B no oligonucleotídeo é uma base de 5-metilcitosina ou 5-metiluracila. Em outra modalidade, pelo menos, um B¹ é no oligonucleotídeo é uma base de 5-metilcitosina ou 5-

metiluracila. Em outra modalidade, todas as nucleobases de citosina no oligonucleotídeo são 5-metilcitosina. Em outra modalidade, todas as nucleobases de uracila no oligonucleotídeo são 5-metiluracila.

[00209] Em outra modalidade, os oligonucleotídeos têm 10 a 33 nucleotídeos de comprimento, em que:

a) pelo menos um monômero tem a fórmula I, em que

B é uma nucleobase;

X é F, $-NR^1R^2$ ou $-OR$;

R é alquila opcionalmente substituído, onde os substituintes opcionais, quando presentes, são halo, OR^1 , NR^1R^2 ou SR^1 ;

R^1 é H, alquila, cicloalquila, arila, heterocicloalquila ou heteroarila, cada um independentemente, opcionalmente, ainda substituído com halo, hidroxil ou alquila;

R^2 é H ou alquila; e



indica o ponto de ligação ao restante do oligonucleotídeo;

b) em que pelo menos um monômero compreende uma modificação de arcabouço de BNA;

c) em que os monômeros são ligados por ligações de esqueleto de fosforotioato e/ou por ligações de esqueleto de fosfodiéster; e

d) em que pelo menos uma nucleobase no oligonucleotídeo é uma base de 5-metilcitosina ou 5-metiluracila.

[00210] Em outra modalidade, os oligonucleotídeos têm 10 a 33 nucleotídeos de comprimento, em que:

a) pelo menos um monômero tem a fórmula I, em que

B é uma nucleobase;

X é F, $-NR^1R^2$ ou $-OR$;

R é alquila opcionalmente substituído, onde os substituintes opcionais, quando presentes, são halo, OR^1 , NR^1R^2 ou SR;

R^1 é H, alquila, cicloalquila, arila, heterocicloalquila ou heteroarila, cada um independentemente, opcionalmente, ainda substituído com halo, hidroxil ou alquila;

R^2 é H ou alquila; e



indica o ponto de ligação ao restante do oligonucleotídeo;

b) em que pelo menos um monômero compreende uma modificação de arcabouço de BNA e tem a fórmula II, em que B^1 e Z-Y são como definidos acima;

c) em que os monômeros são ligados por ligações de esqueleto de fosforotioato e/ou por ligações de esqueleto de fosfodiéster; e

d) em que pelo menos uma nucleobase no oligonucleotídeo é uma base de 5-metilcitosina ou 5-metiluracila.

[00211] Em outra modalidade, a modificação de arcabouço de BNA resulta em um monômero que é CRN, LNA, Xilo-LNA, α -LNA, α -LNA, β -D-LNA, 2'-amino-LNA, 2'-(alquilamino)-LNA, 2'-(acilamino)-LNA, 2'-tio-LNA, cEt BNA, cMOE BNA, cLNA, LNA ligado em ponte a amido; 2',4'-BNA^{NC}(N-H); 2',4'-BNA^{NC}(N-Me); 2',4'-BNA^{NC}(N-Bn), CBBN, ENA, DpNA, BNA ligado em ponte a sulfonamida, BNA ligado em ponte a ureia, nucleotídeo carbocíclico bicíclico, TriNA, α -L-TriNA, bcDNA, tcDNA, F-bcDNA, F-tcDNA, BNA ligado em ponte heterocíclico, PMO bloqueado derivado de 2'-amino-LNA, GuNA ou scpNA.

[00212] Em outra modalidade, a modificação de arcabouço de BNA resulta em um monômero que é CRN, LNA, XilolNA, α -LNA, α -L-LNA, β -D-LNA, 2'-amino-LNA, 2'-(alquilamino)-LNA, 2'-(acilamino)-LNA, 2-tio-LNA, cEt BNA, cMOE BNA, cLNA, LNA ligado em ponte a amido; 2',4'-BNA^{NC}(N-H); 2',4'-BNA^{NC}(N-Me); 2',4'-BNA^{NC}(N-Bn), CBBN, ENA, DpNA, BNA ligado em ponte a sulfonamida, BNA ligado em ponte a ureia. Em outra modalidade, a modificação de arcabouço de BNA resulta em um monômero que é CRN, LNA, XilolNA, α -LNA, α -L-LNA, β -D-LNA, 2'-amino-LNA, ou 2'-(alquilamino)-LNA.

Em outra modalidade, a modificação de arcabouço de BNA resulta em um monômero que é CRN, LNA, 2'-amino-LNA ou CBBN. Em outra modalidade, a modificação de arcabouço de BNA resulta em um monômero que é CRN, LNA ou 2'-amino-LNA. Em outra modalidade, a modificação de arcabouço de BNA resulta em um monômero que é LNA, Xilo-LNA, α -LNA, α -L-LNA, β -D-LNA, 2'-amino-LNA, 2'-(alquilamino)-LNA, 2'-(acilamino)-LNA, 2'-tio-LNA, cEt BNA, cMOE BNA ou cLNA. Em outra modalidade, a modificação de arcabouço de BNA resulta em um monômero que é LNA, 2'-amino-LNA, 2'-(alquilamino)-LNA, 2-tio-LNA, cEt BNA, cMOE BNA ou cLNA. Em outra modalidade, a modificação de arcabouço de BNA resulta em um monômero que é LNA, 2'-amino-LNA, 2'-(alquilamino)-LNA, 2',4'-BNA^{NC}(N-H); 2',4'-BNA^{NC}(N-Me), CBBN ou ENA. Em outra modalidade, a modificação de arcabouço de BNA resulta em um monômero que é LNA, 2'-amino-LNA, 2',4'-BNA^{NC}(N-H), CBBN ou ENA. Em outra modalidade, a modificação de arcabouço de BNA resulta em um monômero que é LNA, CBBN ou ENA. Em outra modalidade, a modificação de arcabouço de BNA resulta em um monômero que é LNA ou ENA. Em outra modalidade, a modificação de arcabouço de BNA resulta em um monômero que é LNA.

[00213] Em outra modalidade, a modificação de arcabouço de BNA resulta em um monômero que é 2',4'-

$\text{BNA}^{\text{NC}}(\text{N-H})$; $2',4'\text{-BNA}^{\text{NC}}(\text{N-Me})$; $2',4'\text{-BNA}^{\text{NC}}(\text{N-Bn})$, CBBN, ENA, BNA ligado em ponte a sulfonamida, ou BNA ligado em ponte a ureia. Em outra modalidade, a modificação de arcabouço de BNA resulta em um monômero que é $2',4'\text{-BNA}^{\text{NC}}(\text{N-H})$; $2',4'\text{-BNA}^{\text{NC}}(\text{N-Me})$, CBBN ou ENA.

[00214] Em outra modalidade, os oligonucleotídeos têm 10 a 33 nucleotídeos de comprimento, em que:

a) pelo menos um monômero tem a fórmula I, em que:

B é uma nucleobase;

X é F, $-\text{OCH}_3$ ou $-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$; e



indica o ponto de ligação ao restante do oligonucleotídeo;

b) em que pelo menos um monômero compreende uma modificação de arcabouço de BNA e tem a fórmula II, em que

B^1 é uma nucleobase;

Z-Y é um grupo divalente selecionado de $-(\text{CH}_2)_n\text{O}-$, $-\text{C}(\text{CH}_2\text{CH}_2)\text{O}-$, $-\text{CH}_2\text{WCH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{NR}^3-$, $-\text{CH}_2\text{S}-$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{O}-$, $-\text{CH}(\text{CH}_2\text{OCH}_3)\text{O}-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^3-$, $-\text{CH}=\text{CHO}-$, $-\text{CH}_2\text{SO}_2\text{NR}^3-$ e $-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}-$;

n é 1 ou 2;

W é O, S ou NR^3 ;

R^3 é H, $-\text{C}(\text{O})\text{R}^4$, $-\text{C}(=\text{NH})\text{NR}^5\text{R}^5$, benzila, ou alquila opcionalmente substituído, em que os substituintes opcionais, quando presentes, são selecionados de entre halo

e alcoxi;

R^4 é alquila, cicloalquila ou arila;

R^5 é H ou alquila; e



indica o ponto de ligação ao restante do oligonucleotídeo;

c) em que os monômeros são ligados por ligações de esqueleto de fosforotioato e/ou por ligações de esqueleto de fosfodiéster; e

d) em que pelo menos uma nucleobase no oligonucleotídeo é uma base de 5-metilcitosina ou 5-metiluracila.

[00215] Em outra modalidade, os oligonucleotídeos têm 10 a 33 nucleotídeos de comprimento, em que:

a) pelo menos um monômero tem a fórmula I em que:

B é uma nucleobase;

$-OCH_3$ ou $-O-CH_2CH_2OCH_3$; e



indica o ponto de ligação ao restante do oligonucleotídeo;

b) em que um ou dois monômeros compreendem uma modificação de arcabouço de BNA e têm a fórmula II, em que:

B^1 é uma nucleobase;

Z-Y é um grupo divalente selecionado de $-(CH_2)_nO-$, $-C(CH_2CH_2)O-$, $-CH_2WCH_2-$, $-CH_2NR^3-$, $-CH_2S-$, $-CH(CH_3)O-$, $-$

$\text{CH}(\text{CH}_2\text{OCH}_3)\text{O}-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^3-$, $-\text{CH}=\text{CHO}-$, $-\text{CH}_2\text{SO}_2\text{NR}^3-$ e $-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}-$;

n é 1 ou 2;

W é O, S ou NR^3 ;

R^3 é H, $-\text{C}(\text{O})\text{R}^4$, $-\text{C}(=\text{NH})\text{NR}^5\text{R}^5$, benzila, ou alquila opcionalmente substituído, em que os substituintes opcionais, quando presentes, são selecionados de halo e alcoxi;

R^4 é alquila, cicloalquila ou arila;

R^5 é H ou alquila; e



indica o ponto de ligação ao restante do oligonucleotídeo;

c) em que os monômeros são ligados por ligações de esqueleto de fosforotioato e/ou por ligações de esqueleto de fosfodiéster; e

d) em que pelo menos uma nucleobase no oligonucleotídeo é uma base de 5-metilcitosina ou 5-metiluracila.

[00216] Em outra modalidade, os oligonucleotídeos são de 10 a 33 nucleotídeos de comprimento, em que todos os monômeros que não compreendem uma modificação de arcabouço de BNA ("os monômeros não BNA") são monômeros modificados de fórmula I. Em outra modalidade, os oligonucleotídeos são de 10 a 33 nucleotídeos de comprimento, com um ou dois

monômeros não BNA de fórmula I. Em uma outra modalidade, os oligonucleotídeos são de 10 a 33 nucleotídeos de comprimento, com um monômero não BNA de fórmula I.

[00217] Em outra modalidade, o oligonucleotídeo compreende 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 monômeros compreendendo uma modificação de arcabouço de BNA. Em outra modalidade, o oligonucleotídeo compreende 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 monômeros compreendendo uma modificação de arcabouço de BNA e tendo a fórmula II. Em outra modalidade, o oligonucleotídeo compreende 1, 2, 3 ou 4 monômeros compreendendo uma modificação de arcabouço de BNA. Em outra modalidade, o oligonucleotídeo compreende 1, 2, 3 ou 4 monômeros compreendendo uma modificação de arcabouço de BNA e tendo a fórmula II. Em outra modalidade, o oligonucleotídeo compreende 1, 2 ou 3 monômeros compreendendo uma modificação de arcabouço de BNA. Em outra modalidade, o oligonucleotídeo compreende 1, 2 ou 3 monômeros compreendendo uma modificação de arcabouço de BNA e tendo a fórmula II. Em outra modalidade, o oligonucleotídeo compreende 1 ou 2 monômeros compreendendo uma modificação de arcabouço de BNA. Em outra modalidade, o oligonucleotídeo compreende 1 ou 2 monômeros compreendendo uma modificação de arcabouço de BNA e tendo a fórmula II. Em outra modalidade, o oligonucleotídeo compreende dois monômeros compreendendo uma modificação de arcabouço de

BNA. Em outra modalidade, o oligonucleotídeo compreende dois monômeros compreendendo uma modificação de arcabouço de BNA e tendo a fórmula II. Em outra modalidade, o oligonucleotídeo compreende um monômero compreendendo uma modificação de arcabouço de BNA. Em outra modalidade, o oligonucleotídeo compreende um monômero compreendendo uma modificação de arcabouço de BNA e tendo a fórmula II.

[00218] Em outra modalidade, o oligonucleotídeo de acordo com a invenção compreende a sequência GGAAGAUGGCAU (SEQ ID NO: 6072). Em outra modalidade, o oligonucleotídeo de acordo com a invenção compreende uma sequência selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 453, 455, 456, 453, 455, 456, 459, 461, 462, 465, 467, 468, 471, 473, 474, 483, 486, 525, 531, 538, 539, 540, 543, 545, 546 e 4528-4572. Em outra modalidade, o oligonucleotídeo de acordo com a invenção compreende uma sequência selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 453, 455, 459, 4528, 4531, 4532, 4533, 4535, 4542, 4548 e 4568. Em outra modalidade, o oligonucleotídeo de acordo com a invenção compreende uma sequência selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 453, 455 e 456. Em outra modalidade, o oligonucleotídeo de acordo com a invenção compreende uma sequência selecionada do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 455 e 459. Em outra modalidade, o oligonucleotídeo de acordo para a invenção compreende uma sequência selecionada

do grupo consistindo nas SEQ ID NO: 4528, 4531, 4532, 4533, 4535, 4542, 4548 e 4568. Em outra modalidade, o oligonucleotídeo de acordo com a invenção compreende uma sequência selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 459, 4528, 4531, 4532, 4533 e 4542.

[00219] Em outra modalidade, o oligonucleotídeo de acordo com a invenção compreende a sequência GGAAGAUGGCAU (SEQ ID NO: 6072) e é para salto do éxon 51 de pré-mRNA de distrofina. Em outra modalidade, o oligonucleotídeo de acordo com a invenção compreende uma sequência selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NO: 452-613 ou SEQ ID NO: 4528-4572 e é para salto do éxon 51 de pré-mRNA de distrofina. Em outra modalidade, o oligonucleotídeo de acordo com a invenção compreende uma sequência selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 453, 455 e 456 e é para salto do éxon 51 de pré-mRNA de distrofina. Em outra modalidade, o oligonucleotídeo de acordo com a invenção compreende uma sequência selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 455 e 459 e é para salto do éxon 51 de pré-mRNA de distrofina.

[00220] Em uma outra modalidade, o oligonucleotídeo de acordo com a invenção compreende a sequência de GGUAAGUUCNGUCCAAGC (SEQ ID NO: 6073), em que N é T ou U. Em uma outra modalidade, o oligonucleotídeo de acordo com a invenção compreende a sequência de GGUAAGUUCNGUCCAAGC (SEQ

ID NO: 6073), em que N é T ou U, e é para salto do éxon 51 de pré-mRNA de distrofina. Em outra modalidade, o oligonucleotídeo de acordo com a invenção compreende uma sequência selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 4565-4571. Em outra modalidade, o oligonucleotídeo de acordo com a invenção compreende uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NO: 4565-4571 e é para salto do éxon 51 de pré-mRNA de distrofina.

[00221] Em outra modalidade, o oligonucleotídeo de acordo com a invenção compreende uma sequência selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 4561-4564 e SEQ ID NO: 4572. Em outra modalidade, o oligonucleotídeo de acordo com a invenção compreende uma sequência selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NO: 4561-4564 e SEQ ID NO: 4572 é para salto do éxon 51 de pré-mRNA de distrofina.

[00222] Em outra modalidade, o oligonucleotídeo de acordo com a invenção compreende a sequência CCCAAUUUUUCCUG (SEQ ID NO: 6074). Em outra modalidade, o oligonucleotídeo de acordo com a invenção compreende a sequência CCCAAUGCCAUCCUG (SEQ ID NO: 6075). Em outra modalidade, o oligonucleotídeo de acordo com a invenção compreende uma sequência selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 3185, 3573, 3855, 4198 e 4401. Em outra modalidade, o oligonucleotídeo de acordo com a invenção compreende uma sequência selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID Nos:

3185, 3573, 3855 e 4401. Em outra modalidade, o oligonucleotídeo de acordo com a invenção compreende a sequência CCCAAUUUUUCCUG (SEQ ID NO: 6074) é para salto do éxon 45 de pré-mRNA de distrofina. Em outra modalidade, o oligonucleotídeo de acordo com a invenção compreende a sequência CCCAUGCCAUCCUG (SEQ ID NO: 6075) e é para salto do éxon 45 de pré-mRNA de distrofina. Em outra modalidade, o oligonucleotídeo de acordo com a invenção compreende uma sequência selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 3185, 3573, 3855, 4198 e 4401 é para salto do éxon 45 de pré-mRNA de distrofina. Em outra modalidade, o oligonucleotídeo de acordo com a invenção compreende uma sequência selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 3185, 3573, 3855 e 4401 é para salto do éxon 45 de pré-mRNA de distrofina.

[00223] Em modalidades preferidas, o oligonucleotídeo de acordo com a invenção compreende a sequência CUUCUGUUAGCC (SEQ ID NO: 6076). Um tal oligonucleotídeo tem, de preferência, um comprimento de 16 a 24 nucleotídeos, mais de preferência de 20 nucleotídeos. Neste contexto, uma modalidade preferida é o oligonucleotídeo antissentido que consiste na sequência de nucleotídeos representada pela SEQ ID NO: 29.

[00224] Em modalidades preferidas, o oligonucleotídeo de acordo com a invenção compreende a

sequência UAUUUAGCA (SEQ ID NO: 6077). Tal oligonucleotídeo tem, de preferência, um comprimento de 16 a 24 nucleotídeos, mais de preferência de 23 nucleotídeos. Neste contexto, uma modalidade preferida é o oligonucleotídeo antissentido que consiste na sequência de nucleotídeos representada pela SEQ ID NO: 161.

[00225] Em modalidades preferidas, o oligonucleotídeo de acordo com a invenção compreende a sequência GGAAUUUGU (SEQ ID NO: 6078). Esse oligonucleotídeo tem, de preferência, um comprimento de 16 a 24 nucleotídeos, mais de preferência de 23 nucleotídeos. Neste contexto, uma modalidade preferida é o oligonucleotídeo antissentido que consiste na sequência de nucleotídeos representada pela SEQ ID NO: 119.

[00226] Em modalidades preferidas, o oligonucleotídeo de acordo com a invenção compreende a sequência CUCAACAGA (SEQ ID NO: 6079). Tal oligonucleotídeo tem, de preferência, um comprimento de 16 a 24 nucleotídeos, mais de preferência de 23 nucleotídeos. Neste contexto, uma modalidade preferida é o oligonucleotídeo antissentido que consiste na sequência de nucleotídeos representada pela SEQ ID NO: 233.

[00227] Quando um oligonucleotídeo de acordo com a invenção é para salto do éxon 44 de pré-mRNA de distrofina, é preferido que compreenda uma sequência representada pelas

SEQ ID NOs: 6076-6079.

[00228] Em modalidades preferidas, o oligonucleotídeo de acordo com a invenção compreende a sequência GCCCAAU (SEQ ID NO: 6080). Um tal oligonucleotídeo tem, de preferência, um comprimento de 16 a 26 nucleotídeos, mais de preferência de 25 nucleotídeos. Neste contexto, uma modalidade preferida é o oligonucleotídeo antissentido que consiste na sequência de nucleotídeos representada pela SEQ ID NO: 3185.

[00229] Em modalidades preferidas, o oligonucleotídeo de acordo com a invenção compreende a sequência CCAAUUUU (SEQ ID NO: 6081). Tal oligonucleotídeo tem, de preferência, um comprimento de 16 a 26 nucleotídeos, mais de preferência de 24 nucleotídeos. Neste contexto, uma modalidade preferida é o oligonucleotídeo antissentido que consiste na sequência de nucleotídeos representada pela SEQ ID NO: 3573.

[00230] Em modalidades preferidas, o oligonucleotídeo de acordo com a invenção compreende a sequência GCCCAAU (SEQ ID NO: 6082). Um tal oligonucleotídeo tem, de preferência, um comprimento de 16 a 26 nucleotídeos, mais de preferência de 25 nucleotídeos. Neste contexto, uma modalidade preferida é o oligonucleotídeo antissentido que consiste na sequência de nucleotídeos representada pela SEQ ID NO: 3855.

[00231] Em modalidades preferidas, o oligonucleotídeo de acordo com a invenção compreende a sequência UCUGACAACA (SEQ ID NO: 6083). Um tal oligonucleotídeo tem, de preferência, um comprimento de 16 a 24 nucleotídeos, mais de preferência de 22 nucleotídeos. Neste contexto, uma modalidade preferida é o oligonucleotídeo antissentido que consiste na sequência de nucleotídeos representada pela SEQ ID NO: 4198.

[00232] Em modalidades preferidas, o oligonucleotídeo de acordo com a invenção compreende a sequência CAAUGCCAUCC (SEQ ID NO: 6084). Um tal oligonucleotídeo tem, de preferência, um comprimento de 16 a 24 nucleotídeos, mais de preferência de 21 nucleotídeos. Neste contexto, uma modalidade preferida é o oligonucleotídeo antissentido que consiste na sequência de nucleotídeos representada pela SEQ ID NO: 4401.

[00233] Quando um oligonucleotídeo de acordo com a invenção é para salto do éxon 45 de pré-mRNA de distrofina, é preferido que compreenda uma sequência representada pelas SEQ ID NOs: 6074, 6075 ou 6080-6084.

[00234] Em modalidades preferidas, o oligonucleotídeo de acordo com a invenção compreende a sequência AAGAUGGCAU (SEQ ID NO: 6085). Um tal oligonucleotídeo tem, de preferência, um comprimento de 16 a 24 nucleotídeos, mais de preferência de 22 nucleotídeos.

Neste contexto, uma modalidade preferida é o oligonucleotídeo antissentido que consiste na sequência de nucleotídeos representada pela SEQ ID NO: 459.

[00235] Em modalidades preferidas, o oligonucleotídeo de acordo com a invenção compreende a sequência UAAGUUCUGUCCAA (SEQ ID NO: 6086). Tal oligonucleotídeo tem, de preferência, um comprimento de 16 a 24 nucleotídeos, mais de preferência de 18 nucleotídeos. Neste contexto, uma modalidade preferida é o oligonucleotídeo antissentido que consiste na sequência de nucleotídeos representada pela SEQ ID NO: 4565.

[00236] Quando um oligonucleotídeo de acordo com a invenção é para salto do éxon 51 de pré-mRNA de distrofina, é preferido que compreenda uma sequência representada pelas SEQ ID NOs: 6072, 6073, 6085 ou 6086.

[00237] Em modalidades preferidas, o oligonucleotídeo de acordo com a invenção compreende a sequência GUUGCCUCCGUUC (SEQ ID NO: 6087). Tal oligonucleotídeo tem, de preferência, um comprimento de 16 a 24 nucleotídeos, mais de preferência de 18 nucleotídeos. Neste contexto, uma modalidade preferida é o oligonucleotídeo antissentido que consiste na sequência de nucleotídeos representada pela SEQ ID NO: 845.

[00238] Em modalidades preferidas, o oligonucleotídeo de acordo com a invenção compreende a

sequência GGUUCUG (SEQ ID NO: 6088). Um tal oligonucleotídeo tem, de preferência, um comprimento de 16 a 26 nucleotídeos, mais de preferência de 25 nucleotídeos. Neste contexto, uma modalidade preferida é o oligonucleotídeo antissentido que consiste na sequência de nucleotídeos representada pela SEQ ID NO: 863.

[00239] Em modalidades preferidas, o oligonucleotídeo de acordo com a invenção compreende a sequência GAUUCUGAAU (SEQ ID NO: 6089). Um tal oligonucleotídeo tem, de preferência, um comprimento de 16 a 24 nucleotídeos, mais de preferência de 22 nucleotídeos. Neste contexto, uma modalidade preferida é o oligonucleotídeo antissentido que consiste na sequência de nucleotídeos representada pela SEQ ID NO: 4987.

[00240] Em modalidades preferidas, o oligonucleotídeo de acordo com a invenção compreende a sequência ACUUCAUC (SEQ ID NO: 6090). Tal oligonucleotídeo tem, de preferência, um comprimento de 16 a 26 nucleotídeos, mais de preferência de 24 nucleotídeos. Neste contexto, uma modalidade preferida é o oligonucleotídeo antissentido que consiste na sequência de nucleotídeos representada pela SEQ ID NO: 5174.

[00241] Em modalidades preferidas, o oligonucleotídeo de acordo com a invenção compreende a sequência UUCAUGA (SEQ ID NO: 6091). Esse oligonucleotídeo

tem, de preferência, um comprimento de 16 a 26 nucleotídeos, mais de preferência de 24 nucleotídeos. Neste contexto, uma modalidade preferida é o oligonucleotídeo antissentido que consiste na sequência de nucleotídeos representada pela SEQ ID NO: 5446.

[00242] Em modalidades preferidas, o oligonucleotídeo de acordo com a invenção compreende a sequência UGUUGCCU (SEQ ID NO: 6092). Esse oligonucleotídeo tem, de preferência, um comprimento de 16 a 26 nucleotídeos, mais de preferência de 24 nucleotídeos. Neste contexto, uma modalidade preferida é o oligonucleotídeo antissentido que consiste na sequência de nucleotídeos representada pela SEQ ID NO: 5765.

[00243] Quando um oligonucleotídeo de acordo com a invenção é para salto do éxon 53 de pré-mRNA de distrofina, prefere-se que compreenda uma sequência representada pelas SEQ ID NOs: 6087-6092.

Composição

[00244] Em um aspecto da invenção é fornecida uma composição compreendendo pelo menos um oligonucleotídeo de acordo com a invenção, de preferência, em que a referida composição compreende pelo menos um excipiente, e/ou em que o referido oligonucleotídeo compreende pelo menos um ligante conjugado, que pode auxiliar ainda a intensificar o direcionamento e/ou a dispensação da referida composição

e/ou do referido oligonucleotídeo a um tecido e/ou a uma célula e/ou para dentro de um tecido e/ou uma célula. Composições como aqui descritas são aqui referidas como composições de acordo com a invenção. Uma composição de acordo com a invenção pode compreender um ou mais do que um oligonucleotídeo de acordo com a invenção. No contexto desta invenção, um excipiente pode ser uma molécula distinta, mas também pode ser uma porção conjugada. No primeiro caso, um excipiente pode ser uma carga, tal como amido. No último caso, um excipiente pode, por exemplo, ser um ligante direcionado que está ligado ao oligonucleotídeo de acordo com a invenção.

[00245] Em modalidades preferidas deste aspecto, tais composições podem ainda compreender um composto anfifílico catiônico (CAC) ou um fármaco anfifílico catiônico (CAD). Um CAC é geralmente um agente lisossomatrópico e uma base fraca que pode tamponar endossomas e lisossomas (Mae *et al.*, Journal of Controlled Release 134: 221-227, 2009). As composições que compreendem ainda um CAC têm, de preferência, um parâmetro melhorado para modulação de RNA, em comparação com uma composição semelhante que não compreende o referido CAC. Sem estar ligado à teoria, pensa-se que isto acontece porque um CAC pode ajudar um oligonucleotídeo da invenção a atingir o seu sítio de atividade, por exemplo, facilitando o escape

endossômico. Um CAC preferido como compreendido nas composições da invenção é o toremifeno e seus derivados, análogos e metabolitos, tais como, *N*-desmetil toremifeno, tamoxifeno, afimoxifeno, clomifeno, droloxifeno, idoxifeno, miproxifeno e nafoxidina. Estes CACs compartilham uma porção comum de 1,1-difeniletileno. Quando um composto difere de um composto como descrito aqui apenas através de pequenas substituições ou modificações, o referido composto é um derivado de tal composto, também pode ser visto como um análogo do mesmo. Metabolitos de um composto são uma classe especial de derivados. Para compostos que são conhecidos na técnica, os metabolitos são frequentemente também conhecidos. Pelo menos todos esses metabólitos conhecidos são referidos quando um metabólito de um composto é referenciado. Por exemplo, o *N*-desmetil toremifeno é um metabolito conhecido do toremifeno.

[00246] Em uma modalidade preferida, a referida composição é para uso como medicamento. A referida composição é, portanto, uma composição farmacêutica. Uma composição farmacêutica compreende usualmente um carreador, diluente e/ou excipiente farmacêuticamente aceitável. Em uma modalidade preferida, uma composição da presente invenção compreende um composto como aqui definido e opcionalmente compreende ainda uma formulação, carga, conservante, solubilizante, carreador, diluente,

excipiente, sal, adjuvante e/ou solvente farmacêuticamente aceitáveis. Tal carreador, carga, conservante, solubilizante, diluente, sal, adjuvante, solvente e/ou excipiente farmacêuticamente aceitável pode, por exemplo, ser encontrado em Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª Edição. Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. O composto como descrito na invenção pode possuir pelo menos um grupo ionizável. Um grupo ionizável pode ser uma base ou um ácido e pode ser carregado ou neutro. Um grupo ionizável pode estar presente como par de íons com um contra-íon apropriado que transporta carga(s) oposta(s). Exemplos de contra-íons catiônicos são sódio, potássio, cério, Tris, lítio, cálcio, magnésio, trietilamônio, trietilamônio e tetraetilamônio. Exemplos de contra-íons aniônicos são cloreto, brometo, iodeto, lactato, mesilato, besilato, triflato, acetato, trifluoroacetato, dicloroacetato, tartarato, lactato e citrato. Exemplos de contra-íons foram descritos [por exemplo, Kumar, 2008], que é aqui incorporado na sua totalidade por referência].

[00247] Uma composição farmacêutica pode compreender um auxiliar na intensificação da estabilidade, solubilidade, absorção, biodisponibilidade, atividade, farmacocinética, farmacodinâmica, captação celular e transporte intracelular do referido composto, em

particular, um excipiente capaz de formar complexos, nanopartículas, micropartículas, nanotubos, nanogéis, hidrogéis, poloxâmeros ou plurônicos, polimersomos, coloides, microbolhas, vesículas, micelas, lipoplexos e/ou lipossomas. Exemplos de nanopartículas incluem nanopartículas poliméricas, nanopartículas de metal (mistas), nanopartículas de carbono, nanopartículas de ouro, nanopartículas magnéticas, nanopartículas de sílica, nanopartículas lipídicas, partículas de açúcar, nanopartículas de proteínas e nanopartículas peptídicas. Um exemplo da combinação de nanopartículas e oligonucleotídeos é ácido nucleico esférico (SNA), como em, *por exemplo*, Barnaby *et al. Caancer Treat. Res.* 2015, 166, 23.

[00248] Uma composição preferida compreende pelo menos um excipiente que pode auxiliar ainda na intensificação do direcionamento e/ou da dispensação da referida composição e/ou do referido oligonucleotídeo para um tecido e/ou uma célula e/ou em um tecido e/ou uma célula. Um tecido ou uma célula preferido(a) é um tecido ou célula muscular.

[00249] Muitos destes excipientes são conhecidos na técnica (por exemplo, ver Bruno, 2011) e podem ser categorizados como um primeiro tipo de excipiente. Exemplos do primeiro tipo de excipientes incluem polímeros (por exemplo, polietilenoimina (PEI), polipropilenoimina (PPI),

derivados de dextrano, butilcianoacrilato (PBCA), hexilcianoacrilato (PHCA), poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), poliaminas (*por exemplo*, espermina, espermidina, putrescina, cadaverina), quitosana, poli(amido amina) (PAMAM), poli(éster amina), éter polivinílico, polivinil pirrolidona (PVP), polietileno glicol (PEG) ciclodextrinas, ácido hialurônico, ácido colomínico e derivados dos mesmos), dendrímeros (*por exemplo*, poli(amidoamina)), lipídeos (*por exemplo*, 1,2-dioleoil-3-dimetilamônio propano (DODAP), cloreto de dioleoil-dimetilamônio (DODAC), derivados de fosfatidilcolina [*por exemplo*, 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC)], derivados de liso-fosfatidilcolina [*por exemplo*, 1-estearoil-2-liso-sn-glicero-3-fosfocolina (S-LisoPC)], esfingomielina, 2-{3-[Bis-(3-amino-propil)-amino]-propilamino}-N-ditetradecil carbamoil metilacetamida (RPR209120), derivados de fosfoglicerol [*por exemplo*, 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoglicerol, sal de sódio (DPPG-Na), derivados do ácido fosfatídico [ácido 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfatídico, sal de sódio (DSPA), derivados de fosfatidiletanolamina [*por exemplo*, dioleoil-L-R-fosfatidiletanolamina (DOPE), 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DSPE), 2-difitanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DPhyPE),], N-[1-(2,3-dioleoiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamônio (DOTAP), N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamônio (DOTMA),

1,3-dioleoiloxi-2-(6-carboxi-espermil)-propilamida (DOSPER), (1,2-dimiristiloxipropil-3-dimetil-hidroxietilamônio (DMRIE), (N1-colesteriloxicarbonil-3,7-diazanonano-1,9-diamina (CDAN), brometo de dimetildiocetadecilamônio (DDAB), 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicerol-3-fosfocolina (POPC), (N-palmitil-N-oleoil-amida tricloridrato de ácido b-L-arginil-2,3-L-diaminopropiônico (AtuFECTOI), derivados de N,N-dimetil-3-aminopropano [por exemplo, 1,2-distearoiloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano (DSDMA), 1,2-dioleiloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano (DoDMA), 1,2-Dilinoiloxi-N,N-3-dimetilaminopropano (DLinDMA), 2,2-dilinoil-4-dimetilaminometil[1,3]-dioxolano (DLin-K-DMA), derivados de fosfatidilserina [sal de sódio de 1,2-dioleil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina (DOPS)], proteínas (por exemplo, albumina, gelatinas, atelocolágeno) e peptídeos lineares ou cíclicos (por exemplo, protamina, PepFects, NickFects, poliarginina, polilisina, CADY, MPG, peptídeos penetrantes (CPPs), peptídeos de direcionamento, peptídeos de translocação de células, peptídeos de escape endossomal). Exemplos de tais peptídeos foram descritos, por exemplo, peptídeos de direcionamento muscular (por exemplo, Jirka et al., Nucl. Acid Ther. 2014, 24, 25), CPPs (por exemplo, série de Pip, incluindo WO2013/030569 e série de oligoarginina, por exemplo, US9.161.948 (Sarepta), WO2016/187425 (Sarepta) e peptídeo M12 em, por exemplo, Gao

et al., Mol. Ther. 2014, 22, 1333), ou peptídeos de cruzamento de barreira hematoencefálica (BBB), tais como, derivados de ApoE (ramificados) (Shabanpoor et al., Nucl. Acids Ther. 2017, 27, 130). Carboidratos e aglomerados de carboidratos como descritos abaixo, quando usados como compostos distintos, também são adequados para uso como um primeiro tipo de excipiente.

[00250] Outra composição preferida pode compreender pelo menos um excipiente categorizado como um segundo tipo de excipiente. Um segundo tipo de excipiente pode compreender ou conter um grupo conjugado como aqui descrito para intensificar o direcionamento e/ou a dispensação da composição e/ou do oligonucleotídeo da invenção a um tecido e/ou uma célula e/ou para dentro de um tecido e/ou uma célula, como por exemplo, tecido ou célula muscular. O grupo conjugado pode exibir um ou mais ligantes diferentes ou idênticos. Exemplos de ligantes do grupo conjugado são, *por exemplo*, peptídeos, vitaminas, aptâmeros, carboidratos ou misturas de carboidratos (Han et al., Nature Communications, 2016, doi:10.1038/ncomms10981; Cao et al., Mol. Ther. Nucleic Acids, 2016, doi:10.1038/mtna.2016.46), proteínas, moléculas pequenas, anticorpos, polímeros, fármacos. Exemplos de ligantes de grupos conjugados de carboidrato são glucose, manose, galactose, maltose, frutose, N-acetilgalactosamina (GalNac), glucosamina, N-

acetilglucosamina, glucose-6-fosfato, manose-6-fosfato e maltotriose. Carboidratos podem estar presentes em pluralidade, por exemplo, como grupos terminais em porções ligantes dendríticas ou ramificadas que ligam os carboidratos ao componente da composição. Um carboidrato também pode estar compreendido em uma porção de aglomerado de carboidrato, tal como uma porção de aglomerado de GalNAc. Uma porção de aglomerado de carboidrato pode compreender uma porção de direcionamento e, opcionalmente, um ligante conjugado. Em algumas modalidades, a porção de aglomerado de carboidrato compreende 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou mais grupos de GalNAc. Como aqui usado, "aglomerado de carboidrato" significa um composto tendo um ou mais resíduos de carboidrato ligados a um esqueleto ou grupo ligante (ver, por exemplo, Maier *et al.*, "Synthesis of antisense oligonucleotides Conjugates to a Multivalente Carbohydrate Cluster for Cellular Targeting," *Bioconjugate Chem.*, 2003, (14): 18-29; Rensen *et al.*, "Design and Synthesis of Novel N-Acetylgalactosamina-Terminated Glycolipids for Targeting of Lipoproteins to the Hepatic Asialoglycoprotein Receptor," *J. Med. Chem.* 2204, (47): 5798-5808). Neste contexto, "carboidrato modificado" significa qualquer carboidrato tendo uma ou mais modificações químicas em relação aos carboidratos de ocorrência natural. Como aqui usado, "derivado de

carboidrato” significa qualquer composto que possa ser sintetizado usando um carboidrato como um material de partida ou intermediário. Como aqui usado, “carboidrato” significa um carboidrato de ocorrência natural, um carboidrato modificado ou um derivado de carboidrato. Ambos os tipos de excipientes podem ser combinados em conjunto em uma única composição como aqui identificado. Um exemplo de um aglomerado N-acetilglucosamina trivalente é descrito em WO2017/062862 (Wave Life Sciences), que também descreve um aglomerado de pequenas moléculas de sulfonamida. Um exemplo de um único conjugado da pequena molécula sertralina também foi descrito (Ferrés-Coy et al., *Mol. Psych.* 2016, 21, 328), bem como conjugados de pequenas moléculas de ligação a proteínas, incluindo o ibuprofeno (por exemplo, US 6.656.730 ISIS/Ionis Pharmaceuticals), espermina (por exemplo, Noir et al., *J. Am. Chem Soc.* 2008, 130, 13500), anisamida (por exemplo, Nakagawa et al., *J. Am. Chem. Soc.* 2010, 132, 8848) e folato (por exemplo, Dohmen et al., *Mol. Ther. Nucl. Acids* 2012, 7, e7).

[00251] Conjugados de oligonucleotídeos com aptâmeros são conhecidos na técnica (por exemplo, Zhao et al. *Biomaterials* 2015, 67, 42).

[00252] Anticorpos e fragmentos de anticorpos podem também ser conjugados com um oligonucleotídeo da invenção. Em uma modalidade preferida, um anticorpo ou um fragmento

do mesmo direcionado a tecidos de interesse específico, particularmente tecido muscular, é conjugado com um oligonucleotídeo da invenção. Exemplos de tais anticorpos e/ou fragmentos são, por exemplo, direcionados contra CD71 (receptor de transferrina), descrito em, por exemplo, WO2016/179257 (CytoMx) e em Sugo et al. *J. Control. Rel.* 2016, 237, 1, ou contra o transportador de nucleosídeo de equilíbrio (ENT), tal como o anticorpo 3E10, como descrito em, por exemplo, Weisbart et al., *Mol. Câncer Ther.* 2012, 11, 1.

[00253] Outros conjugados de oligonucleotídeos são conhecidos pelos habilitados na técnica e foram revistos em, por exemplo, Winkler et al. *Ther. Deliv.* 2013, 4, 791, Manoharan, *Antisense Nucl. Acid. Dev.* 2004, 12, 103 e Ming et al., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2015, 87, 81.

[00254] A pessoa habilitada pode selecionar, combinar e/ou adaptar um ou mais dos acima ou outros excipientes alternativos e sistemas de dispensação para formular e dispensar um composto para uso na presente invenção.

[00255] Uma tal composição farmacêutica da invenção pode ser administrada em uma concentração eficaz em tempos definidos a um animal, de preferência, um mamífero. Mamífero mais preferido é um ser humano. Um oligonucleotídeo ou uma composição como aqui definido(a)

para uso de acordo com a invenção, pode ser adequado(a) para administração direta a uma célula, um tecido e/ou um órgão *in vivo* de indivíduos afetados ou em risco de desenvolver uma doença ou condição como aqui identificado(a), e pode ser administrado(a) diretamente *in vivo*, *ex vivo* ou *in vitro*. A administração pode ser por via tópica, sistêmica e/ou parentérica, por exemplo, intravenosa, subcutânea, intraperitoneal, intratecal, intramuscular, ocular, nasal, urogenital, intradérmica, dérmica, entérica, intravítrea, intracavernosa, intracerebral, intratecal, epidural ou oral.

[00256] De preferência, uma tal composição farmacêutica da invenção pode ser encapsulada na forma de uma emulsão, suspensão, pílula, comprimido, cápsula ou gel mole para dispensação oral, ou na forma de aerossol ou pó seco para dispensação ao trato respiratório e pulmões.

[00257] Em uma modalidade, um oligonucleotídeo da invenção pode ser sado em conjunto com outro composto já conhecido para ser usado para o tratamento da referida doença. Esses outros compostos podem ser usados para reduzir a inflamação, de preferência, para reduzir a inflamação do tecido muscular e/ou um composto auxiliar para melhorar a função, a integridade e/ou a sobrevivência da fibra muscular e/ou melhorar, aumentar ou restaurar a função cardíaca.

[00258] Os exemplos são, mas não se limitam a, um esteroide, de preferência, um (gluco)corticosteroide, epicatequina, um inibidor de ACE (de preferência perindopril), e inibidor de HDAC, um bloqueador do receptor de angiotensina II tipo 1 (de preferência losartan), peptídeo de angiotensina (1-7), um inibidor do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), um inibidor de NF- κ B, um inibidor de TGF β (de preferência decorina), biglicano recombinante humano, uma fonte de mIGF-1, um inibidor da miostatina, manose-6-fosfato, um antioxidante, um inibidor de canal iônico, dantroleno, um inibidor de protease, um inibidor de fosfodiesterase (de preferência, um inibidor de PDE5, tal como sildenafil ou tadalafil) e/ou L-arginina. Tal uso combinado pode ser um uso sequencial: cada componente é administrado de uma maneira distinta, talvez como uma composição distinta. Alternativamente, cada composto pode ser usado em conjunto em uma única composição.

[00259] Os compostos que são compreendidos em uma composição de acordo com a invenção também podem ser fornecidos separadamente, por exemplo, para permitir a administração sequencial dos componentes ativos da composição de acordo com a invenção. Em tal caso, a composição de acordo com a invenção é uma combinação de

compostos compreendendo pelo menos um oligonucleotídeo de acordo com a invenção com ou sem um ligante conjugado, pelo menos um excipiente e, opcionalmente, um CAC como descrito acima.

Uso

[00260] Em um aspecto adicional, é fornecido o uso de uma composição ou um oligonucleotídeo como descrita(o) nas seções anteriores para uso como um medicamento ou parte de terapia, ou aplicações em que o referido oligonucleotídeo exerce a sua atividade intracelular.

[00261] De preferência, um oligonucleotídeo ou uma composição da invenção para uso como um medicamento ou parte de uma terapia para prevenir, retardar, curar, melhorar e/ou tratar DMD ou BMD ou SMA.

[00262] Em uma modalidade deste aspecto da invenção, é fornecido o oligonucleotídeo de acordo com a invenção, ou a composição de acordo com a invenção, para uso como um medicamento, de preferência, para tratar, prevenir e/ou retardar a Distrofia Muscular de Duchenne (DMD), Distrofia Muscular de Becker (BMD), ou Atrofia Muscular Espinhal (SMA).

Método

[00263] Em um aspecto adicional, é fornecido um método para prevenir, tratar, curar, melhorar e/ou retardar uma condição ou doença como definido na seção anterior em

um indivíduo, em uma célula, tecido ou órgão do referido indivíduo. O método compreende administrar um oligonucleotídeo ou uma composição da invenção ao referido indivíduo ou a um indivíduo na necessidade da mesma.

[00264] O método de acordo com a invenção, em que um oligonucleotídeo ou uma composição como aqui definido(a) pode ser adequado(a) para administração a uma célula, um tecido e/ou um órgão *in vivo* de indivíduos afetados por qualquer uma das doenças aqui definidas ou em risco de desenvolver um distúrbio inflamatório e podem ser administrados *in vivo*, *ex vivo* ou *in vitro*. Um indivíduo ou um sujeito em necessidade é, de preferência, um mamífero, mais de preferência, um ser humano. Alternativamente, um indivíduo não é humano. A administração pode ser por via tópica, sistêmica e/ou parentérica, por exemplo, intravenosa, subcutânea, nasal, ocular, intraperitoneal, intratecal, intramuscular, intracavernosa, urogenital, intradérmica, dérmica, entérica, intravítrea, intracerebral, intratecal, epidural ou oral.

[00265] Em uma modalidade, em um método da invenção, uma concentração de um oligonucleotídeo ou uma composição varia entre 0,01 nM e 1 μ M. Mais de preferência, a concentração usada é de 0,05 a 500 nM, ou de 0,1 a 500 nM, ou de 0,02 a 500 nM, ou de 0,05 a 500 nM, ainda mais de preferência de 1 a 200 nM.

[00266] As faixas de dose de um oligonucleotídeo ou uma composição de acordo com a invenção são, de preferência, projetadas com base em estudos de dose crescente em ensaios clínicos (uso *in vivo*) para os quais existem requisitos rigorosos de protocolo. Um oligonucleotídeo como aqui definido pode ser usado em uma dose que varia desde 0,01 a 200 mg/kg ou 0,05 a 100 mg/kg ou 0,1 a 50 mg/kg ou 0,1 a 20 mg/kg, de preferência de 0,5 a 10 mg/kg.

[00267] As faixas de concentração ou dose de oligonucleotídeo ou composição como dadas acima são concentrações ou doses preferidas para usos *in vitro* ou *ex vivo*. A pessoa habilitada compreenderá que, dependendo da identidade do oligonucleotídeo usado, a célula alvo a ser tratada, o alvo de gene e os seus níveis de expressão, o meio usado e as condições de transfecção e incubação, a concentração ou dose de oligonucleotídeo usada podem ainda variar e talvez precise ser otimizado ainda mais.

[00268] Em uma modalidade deste aspecto da invenção é fornecido um método para prevenir, tratar e/ou atrasar a Distrofia Muscular de Duchenne (DMD), Distrofia Muscular de Becker (BMD) ou Atrofia Muscular Espinal (SMA), compreendendo administrar a um indivíduo um oligonucleotídeo de acordo com a invenção, ou uma composição de acordo com a invenção.

Modalidades particulares da Invenção

[00269] 1. Um oligonucleotídeo compreendendo:

i) ia) pelo menos um monômero 2'-substituído e opcionalmente uma ligação de esqueleto de fosforotioato, ou

ib) apenas monômeros 2'-substituídos ligados por ligações de esqueleto de fosforotioato e/ou por ligações fosfodiéster,

ii) uma base de 5-metilcitosina e/ou um 5-metiluracila e

iii) pelo menos um monômero compreendendo uma modificação do arcabouço de ácido nucleico bicíclico (BNA).

[00270] 2. Um oligonucleotídeo, de acordo com a modalidade 1, em que o referido oligonucleotídeo compreende 1, 2, 3 ou 4 monômeros que compreendem uma modificação de arcabouço de ácido nucleico (BNA) bicíclico, de preferência, uma modificação de arcabouço de ácido nucleico ligado em ponte.

[00271] 3. Um oligonucleotídeo, de acordo com a modalidade 1 ou 2, em que pelo menos uma modificação de arcabouço de ácido nucleico bicíclico (BNA) está compreendida em um monômero terminal do referido oligonucleotídeo, de preferência no monômero 5'-terminal do referido oligonucleotídeo, mais de preferência em ambos os monômeros terminais do referido oligonucleotídeo.

[00272] 4. Um oligonucleotídeo, de acordo com

qualquer uma das modalidades de 1 a 3, em que cada ocorrência da referida modificação do arcabouço de ácido nucleico bicíclico (BNA) resulta em um monômero que é independentemente selecionado do grupo consistindo em um monômero de nucleotídeo restringido conformacionalmente (CRN), um monômero de ácido nucleico (LNA) bloqueado, um monômero de xilol-LNA, um monômero de α -L-LNA, um monômero de β -D-LNA, um monômero de 2'-amino-LNA, um monômero de 2'-(alquilamino)-LNA, um monômero de 2'-(acilamino)-LNA, um monômero 2'-N-substituído-2'-amino-LNA, um monômero de etileno restrito (cEt)-LNA, UM monômero de metoxietila restrito (cMOE)-BNA (2'-O,4'-C), um monômero 2',4'-BNA^{NC}(NH), um monômero 2',4'-BNA^{NC}(N-Me), um monômero de ácido nucleico ligado em ponte a etileno (ENA), um monômero de nucleotídeo bicíclico ligado em ponte 2'-C (CBBN) e derivados dos mesmos.

[00273] 5. Um oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das modalidades de 1 a 4, em que o referido monômero 2'-substituído é um monômero de RNA 2'-substituído, um monômero 2'-F, um monômero 2'-amino, um monômero 2'-O-substituído, um monômero 2'-O-metila, ou um monômero 2'-O-(2-metoxietila), de preferência, um monômero 2'-O-metila.

[00274] 6. Um oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das modalidades de 1 a 5, em que todas as

bases de citosina são bases de 5-metilcitosina e/ou em que todas as bases de uracila são bases de 5-metiluracila.

[00275] 7. Um oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das modalidades de 1 a 6, em que o comprimento do referido oligonucleotídeo é menor que 34 nucleotídeos.

[00276] 8. Um oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das modalidades de 1 a 7, em que o referido oligonucleotídeo é complementar ou se liga a, ou é direcionado a, ou se hibridiza com, pelo menos uma parte de um éxon e/ou região não exônica, de preferência, em que o referido oligonucleotídeo compreende ou consiste em uma sequência que é complementar a, ou se liga, ou é direcionado a, ou se hibridiza com, pelo menos uma parte de uma sequência de reconhecimento de éxon (ERS), um silenciador de splicing de éxon (ESS), um silenciador de splicing intrônico (ISS), um sítio de ligação de proteína SR ou outro elemento de splicing, sinal ou estrutura.

[00277] 9. Um oligonucleotídeo, de acordo com a modalidade 8, em que a referida pelo menos parte de uma região exônica e/ou não exônica tem um comprimento de 10 a 33 nucleotídeos.

[00278] 10. Um oligonucleotídeo, de acordo com a modalidade 8 ou 9, em que a referida região exônica e/ou não exônica está em um gene de DMD ou em um gene SMN.

[00279] 11. Um oligonucleotídeo, de acordo com

qualquer uma das modalidades de 1 a 10, em que o referido oligonucleotídeo é representado por uma sequência de nucleotídeos compreendendo ou consistindo em SEQ ID NO: 8-1580, ou por uma sequência de nucleotídeos compreendendo ou consistindo em um fragmento de SEQ ID NO: 8-1580, de preferência, em que o referido oligonucleotídeo é representado por uma sequência de nucleotídeos compreendendo ou consistindo em SEQ ID NO: 453, 455, 456, 459, 461, 462, 465, 467, 468, 471, 473, 474, 483 ou 486, ou por uma sequência de nucleotídeos compreendendo ou consistindo em um fragmento de SEQ ID NO: 453, 455, 456, 459, 461, 462, 465, 467, 468, 471, 473, 474, 483 ou 486.

[00280] 12. Um oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das modalidades de 1 a 11, em que o referido oligonucleotídeo induz a modulação de splicing de pré-mRNA, de preferência, a referida modulação de splicing de pré-mRNA altera a produção ou composição de proteína, que compreende, de preferência, o salto do éxon ou a inclusão do éxon, em que a modulação de RNA compreende, mais de preferência, o salto do éxon.

[00281] 13. Um oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das modalidades de 1 a 12, em que o referido oligonucleotídeo induz a modulação de splicing de pré-mRNA, em que a referida modulação de splicing de pré-mRNA altera a produção de proteína que está relacionada com uma doença

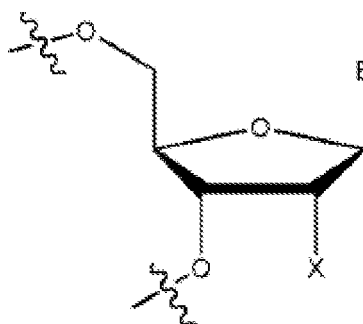
ou uma, de preferência, em que a doença ou condição condição é Distrofia Muscular de Duchenne (DMD), Distrofia Muscular de Becker (BMD), ou Atrofia Muscular Espinhal (SMA).

[00282] 14. Um oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das modalidades de 1 a 13, em que o referido oligonucleotídeo possui um parâmetro melhorado em comparação com um oligonucleotídeo correspondente que não compreende uma modificação de arcabouço de ácido nucleico bicíclico (BNA).

[00283] 15. Uma composição compreendendo um oligonucleotídeo como definido em qualquer uma das modalidades de 1 a 14, de preferência, em que a referida composição compreende pelo menos um excipiente que pode auxiliar adicionalmente na intensificação do direcionamento e/ou da dispensação da referida composição e/ou do referido oligonucleotídeo a um tecido e/ou célula e/ou em um tecido e/ou uma célula.

[00284] 16. Um oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das modalidades de 1 a 14, ou uma composição de acordo com a reivindicação 15, para uso como medicamento, de preferência, para tratamento, prevenção e/ou atraso da Distrofia Muscular de Duchenne (DMD), Distrofia Muscular de Becker (BDM), ou Atrofia Muscular Espinhal (SMA).

a) pelo menos um monômero tem fórmula I:



R¹ é H, alquila, cicloalquila, arila, heterocicloalquila ou heteroarila, cada um independentemente opcionalmente adicionalmente substituído

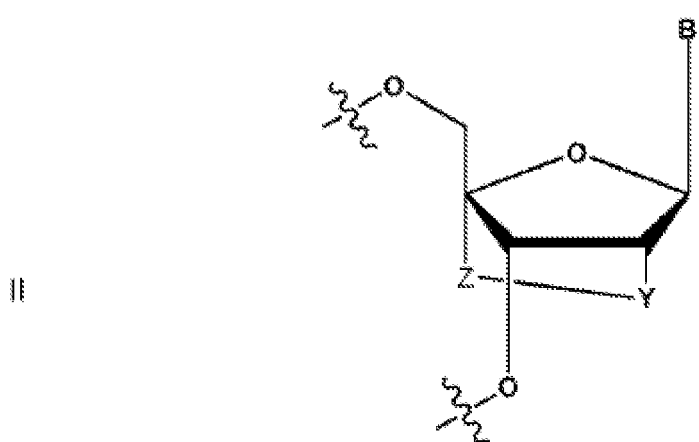
com halo, hidroxí ou alquila;

R^2 é H ou alquila; e



indica o ponto de ligação ao restante do oligonucleotídeo;

b) em que pelo menos um monômero compreende uma modificação de arcabouço de BNA e tem a fórmula II:



em que:

B^1 é uma nucleobase;

Z-Y é um grupo divalente selecionado de $-(CH_2)_nO-$, $-C(CH_2CH_2)O-$, $-CH_2WCH_2-$, $-(CH_2)_nNR^3-$, $-CH_2S(O_m)-$, $-CH(CH_3)O-$, $-CH(CH_2OCH_3)O-$, $-CH_2N(R^3)O-$, $-CH_2CH_2-$, $-C(O)NR^3-$, $-CH=CHO-$, $-CH_2SO_2NR^3-$ e $-NHC(O)NH-$;

n é 1 ou 2;

m é 0, 1 ou 2;

W é O, S ou NR^3 ;

R^3 é H, $-C(O)R^4$, $-C(=NH)NR^5R^5$, benzila, ou alquila opcionalmente substituído, em que os substituintes

opcionais, quando presentes, são selecionados de halo e alcoxi;

R^4 é alquila, cicloalquila ou arila;

R^5 é H ou alquila; e



indica o ponto de ligação ao restante do oligonucleotídeo;

c) em que os monômeros são ligados por ligações de esqueleto de fosforotioato e/ou por ligações de esqueleto de fosfodiéster; e

d) em que pelo menos uma nucleobase no oligonucleotídeo é uma base de 5-metilcitosina ou 5-metiluracila.

[00287] 19. O oligonucleotídeo, de acordo com a modalidade 18, em que R é alquila não substituído, ou $-CH_3$ ou $-CH_2CH_3$.

[00288] 20. O oligonucleotídeo, de acordo com a modalidade 18 ou 19, em que R^1 é CH_3 .

[00289] 21. O oligonucleotídeo, de acordo com qualquer das modalidades de 18 a 20, em que X é F ou $-OR$.

[00290] 22. O oligonucleotídeo, de acordo com qualquer das modalidades de 18 a 21, em que X é F ou $-OCH_3$.

[00291] 23. O oligonucleotídeo, de qualquer das modalidades de 18 a 22, em que Z-Y é um grupo divalente selecionado do grupo consistindo em $-(CH_2)_nO-$, $-CH(CH_3)O-$ e

-CH(CH₂OCH₃)O-.

[00292] 24. O oligonucleotídeo, de acordo com qualquer das modalidades de 18 a 23, em que Z-Y é -CH₂O-. De preferência, Z é -CH₂- e Y é -O-.

[00293] 25. O oligonucleotídeo, de acordo com qualquer das modalidades de 18 a 24, em que o oligonucleotídeo compreende a sequência GGAAGAUGGCAU (SEQ ID NO: 6072).

[00294] 26. O oligonucleotídeo, de acordo com qualquer das modalidades de 18 a 25, em que o oligonucleotídeo tem um comprimento de 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22 nucleotídeos.

[00295] 27. O oligonucleotídeo, de acordo com qualquer das modalidades de 18 a 26, em que o oligonucleotídeo tem um comprimento de 19, 20 ou 22 nucleotídeos.

[00296] 28. O oligonucleotídeo, de acordo com qualquer das modalidades de 18 a 27, em que o oligonucleotídeo tem um comprimento de 20 ou 22 nucleotídeos.

[00297] 29. O oligonucleotídeo, de acordo com qualquer das modalidades de 18 a 28, em que o oligonucleotídeo tem um comprimento de 20 nucleotídeos.

[00298] 30. O oligonucleotídeo, de acordo com qualquer das modalidades de 18 a 28, em que o

oligonucleotídeo tem um comprimento de 22 nucleotídeos.

[00299] 31. O oligonucleotídeo, de acordo com qualquer das modalidades de 18 a 27, em que o oligonucleotídeo tem um comprimento de 19 nucleotídeos.

[00300] 30. O oligonucleotídeo, de acordo com qualquer das modalidades de 18 a 27, em que o oligonucleotídeo é representado por uma sequência compreendendo ou consistindo em uma sequência selecionada a partir da SEQ ID NO: 453, 455, 459, 4528, 4531, 4532, 4533, 4535, 4542, 4548 e 4568.

[00301] 31. O oligonucleotídeo, de acordo com qualquer das modalidades de 18 a 26, em que o oligonucleotídeo é representado por uma sequência consistindo em uma sequência selecionada de SEQ ID NO: 453, 455, 459, 4528, 4531, 4532, 4533, 4535, 4542, 4548 e 4568.

[00302] 32. O oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das modalidades de 18 a 31, em que o referido oligonucleotídeo induz a modulação de splicing de pré-mRNA, de preferência, a referida modulação de splicing de pré-mRNA altera a produção ou composição de proteína, que compreende, de preferência, salto do éxon ou inclusão composição de proteína, que compreende, de preferência, salto do, em que a referida modulação de RNA, mais de preferência, compreende o salto do éxon.

[00303] 33. O oligonucleotídeo, de acordo com

qualquer das modalidades de 18 a 32, em que o referido oligonucleotídeo induz a modulação de splicing de pré-mRNA, em que a referida modulação de splicing de pré-mRNA altera a produção de proteína que está relacionada com uma doença ou uma condição, de preferência, Distrofia Muscular de Duchenne (DMD), Distrofia Muscular de Becker (BMD) ou Atrofia Muscular Espinhal (SMA).

[00304] 34. O oligonucleotídeo, de acordo com qualquer das modalidades de 18 a 33, em que o referido oligonucleotídeo induz a modulação de splicing de pré-mRNA, em que a referida modulação de splicing de pré-mRNA altera a produção de proteína que está relacionada com Distrofia Muscular de Duchenne (DMD).

[00305] 35. O oligonucleotídeo, de acordo com qualquer das modalidades de 18 a 33, em que o referido oligonucleotídeo induz a modulação de splicing de pré-mRNA, em que a referida modulação de splicing de pré-mRNA altera a produção de proteína que está relacionada com Distrofia Muscular de Becker (BMD).

[00306] 36. O oligonucleotídeo, de acordo com qualquer das modalidades de 18 a 33, em que o referido oligonucleotídeo induz a modulação de splicing de pré-mRNA, em que a referida modulação de splicing de pré-mRNAs altera a produção de proteína que está relacionada com Atrofia Muscular Espinal (SMA).

[00307] 37. O oligonucleotídeo, de acordo com qualquer das modalidades de 18 a 36, em que o referido oligonucleotídeo possui um parâmetro melhorado em comparação com um oligonucleotídeo correspondente que não compreende uma modificação do arcabouço de ácido nucleico bicíclico (BNA).

Definições

[00308] Neste documento e em suas reivindicações, o verbo "compreender" e suas conjugações é usado em seu sentido não limitativo para significar que os itens que seguem a palavra estão incluídos, mas os itens não especificamente mencionados não são excluídos. Adicionalmente, o verbo "consistir" pode ser substituído por "consistir essencialmente em" significando que um oligonucleotídeo ou uma composição como aqui definido pode compreender componente(s) adicional(ais) que os especificamente identificados, o(s) componente(s) adicional(ais) não alterando a característica única da invenção. Além disso, a referência a um elemento pelo artigo indefinido "um" ou "uma" não exclui a possibilidade de que mais de um elemento esteja presente, a menos que o contexto claramente exija que haja um e apenas um dos elementos. O artigo indefinido "um" ou "uma" normalmente significa "pelo menos um".

[00309] Cada modalidade como aqui identificada pode

ser combinada em conjunto, salvo indicação em contrário. Todas as referências de patente e literatura citadas na presente especificação são aqui incorporadas por referência na sua totalidade.

[00310] Ao longo da aplicação, a palavra "liga", "direciona", "hibridiza" pode ser usada indistintamente quando usada no contexto de um oligonucleotídeo antissentido que é complementar, de preferência complementarmente inverso, a uma parte de um pré-mRNA como aqui identificado. No contexto da invenção, "hibridiza" sob condições fisiológicas em uma célula, de preferência, uma célula muscular, salvo indicação em contrário.

[00311] Quando uma fórmula estrutural ou nome químico é entendida(o) pela pessoa habilitada para ter centros quirais, ainda não se indica quiralidade, para cada centro quiral faz-se referência a todos os três de mistura racêmica, enantiômero *R* puro e o enantiômero *S* puro.

[00312] Sempre que um parâmetro de uma substância é discutido no contexto desta invenção, assume-se que, a menos que especificado de outro modo, o parâmetro é determinado, medido ou manifestado sob condições fisiológicas. As condições fisiológicas são conhecidas de uma pessoa habilitada na técnica, e compreendem sistemas de solventes aquosos, pressão atmosférica, valores de pH entre 6 e 8, uma temperatura variando desde a temperatura

ambiente até cerca de 37°C (de cerca de 20°C até cerca de 40°C), e uma concentração adequada de sais tampão ou outros componentes. Entende-se que a carga é frequentemente associada ao equilíbrio. Uma parte que se diz que porta ou carrega uma carga é uma parte que será encontrada em um estado onde ela porta ou carrega tal carga com mais frequência do que aquela que não porta ou carrega tal carga. Como tal, um átomo que é indicado nesta descrição para ser carregado pode ser não carregado sob condições específicas, e uma porção neutra pode ser carregada sob condições específicas, como é entendido por uma pessoa habilitada na técnica.

[00313] Geralmente, uma substituição substitui uma porção, que pode ser hidrogênio, por outra metade. Quando se considera o esqueleto de carbono das moléculas orgânicas, um monômero de RNA é inerentemente 2'-substituído porque tem uma porção hidroxila na sua posição-2'. Um monômero de DNA não seria, portanto, 2'-substituído, e um monômero de RNA pode ser visto como um monômero de DNA 2'-substituído. Quando um monômero de RNA, por sua vez, é 2'-substituído, esta substituição pode ter substituído o 2'-OH ou o 2'-H. Quando um monômero de RNA é 2'-O-substituído, esta substituição substitui o H da porção 2'-OH. Como um exemplo não limitativo, o RNA 2'-O-metila é um monômero 2'-substituído (-OMe substitui -H) e um monômero

de RNA 2'-substituído (-OMe substitui -OH) e um monômero de RNA 2'-O-substituído (-Me substitui -H), enquanto o RNA 2'-F é um monômero de RNA 2'-substituído (-F substitui -OH ou -H), mas não um monômero de RNA 2'-O-substituído (2'-O não está mais presente ou não é substituído). RNA 2'-F onde 2'-OH substituo com F é RNA 2'-F-2'-desoxi, que também é DNA 2'-F.

[00314] "Alquenila" significa um radical hidrocarboneto linear ou ramificado tendo de 2 a 8 átomos de carbono e pelo menos uma ligação dupla. Em certas modalidades, alquenila inclui etenila, propenila, 1 but-3-enila, 1 pent-3-enila e 1-hex-5-enila.

[00315] "Alcoxi" significa um grupo da fórmula -OR, em que R é alquila. Em certas modalidades, o alcoxi inclui metoxi, etoxi, propoxi, 2-propoxi, butoxi, terc-butoxi, pentiloxi e hexiloxi.

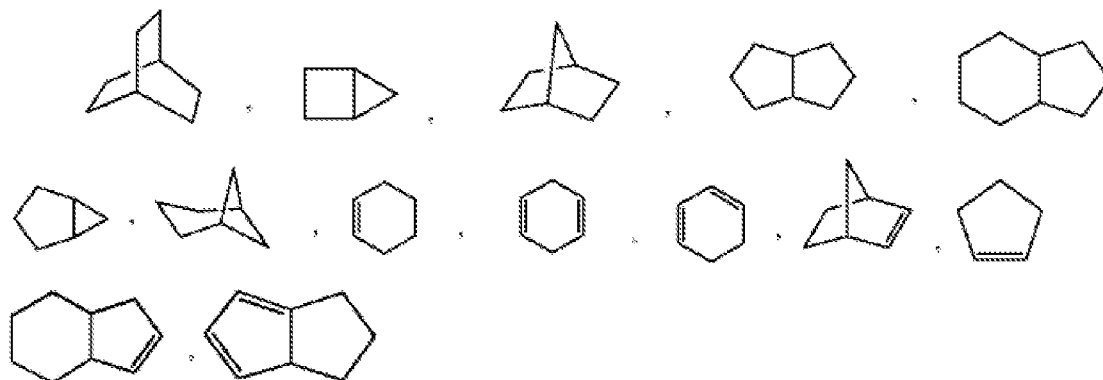
[00316] "Alquila" significa um radical hidrocarboneto saturado linear ou ramificado contendo de 1-20 átomos de carbono, e em certas modalidades inclui 1-6 átomos de carbono. Em certas modalidades, alquila inclui 1-4 átomos de carbono, e em certas modalidades inclui 1-3 átomos de carbono. Em certas modalidades, alquila inclui metila, etila, n-propila, iso-propila, n-butila, sec-butila, terc-butila, n-pentila, isopentila, neopentila, n-hexila, 3-metil-hexila, 2,2-dimetilpentila, 2,3-dimetil-

hexila, n-heptila, n-octila, n-nonila e n-decila.

[00317] "Arilo" significa um anel monovalente, mono-, bi- ou tri-carbocíclico monovalente de seis a quatorze membros, em que o anel monocíclico é aromático e pelo menos um dos anéis no anel bicíclico ou tricíclico é aromático. Em certas modalidades, o arila inclui fenila, naftila, indanila e antracenila.

[00318] "Cicloalquila" significa um radical hidrocarboneto monocíclico ou bicíclico, saturado ou parcialmente insaturado (mas não aromático) de três a dez átomos de carbono no anel. Em certas modalidades, o grupo cicloalquila contém de 5-6 átomos de carbono, pode ser aqui referido como cicloalquila C₅₋₆. Grupos cicloalquila incluem anéis bicíclicos fundidos, ligados em ponte e espirocicloalquila. Por exemplo, quando fundido, o grupo cicloalquila pode compreender dois anéis que compartilham átomos adjacentes (*por exemplo*, uma ligação covalente). Quando ligado em ponte, o grupo cicloalquila pode compreender dois anéis que compartilham três ou mais átomos, separando os dois átomos da cabeça de ponte por uma ponte contendo pelo menos um átomo. Quando espiro, o grupo cicloalquila pode compreender dois anéis que compartilham apenas um único átomo, o átomo espiro, que pode ser, *por exemplo*, um carbono quaternário. Em certas modalidades, os grupos cicloalquila incluem ciclopropila, ciclobutila,

ciclopentila e ciclohexila. Em certas modalidades, os grupos cicloalquinos incluem:



[00319] "Halo" significa um grupo fluoro, cloro, bromo ou iodo. "Halo" significa, de preferência, flúor. "Halo" pode ser substituído por um halogêneo. Os halogêneos preferidos são flúor, cloro, bromo ou iodo. Um halogêneo mais preferido é flúor.

[00320] "Heteroarila" significa radical monocíclico, bicíclico fundido ou tricíclico fundido de 5 a 14 átomos no anel contendo um ou mais, em um outro exemplo um, dois, três ou quatro heteroátomos do anel independentemente é(são) selecionado(s) de -O-, -S(O)_n- (n é 0, 1 ou 2), -N= (nitrogênio trivalente), -N(H)- e >N-óxido, e os restantes átomos do anel sendo carbono, em que o anel que compreende um radical monocíclico é aromático e em que pelo menos um dos anéis fundidos compreendendo um radical bicíclico ou tricíclico é aromático (mas não tem que ser um anel que contenha um heteroátomo, por exemplo, 2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioxina-6-ila). O radical bicíclico

fundido inclui sistemas de anéis em ponte. Salvo indicação em contrário, a valência pode estar localizada em qualquer átomo de qualquer anel do grupo heteroarila, permitindo as regras de valência.

[00321] Em certas modalidades, heteroarila inclui, mas não está limitado a, triazolila, tetrazolila, pirrolila, imidazolila, tienila, furanila, pirazolila, oxazolila, isoxazolila, oxadiazolila, tiadiazolila, indolila, indazolila, ftalimidila, benzimidazolila, benzoxazolila, benzofuranila, benzotienila, benzopiranila, benzotiazolila, piridinila, pirazinila, pirimidinila, piridazinila, quinolinila, isoquinolinila e tetra-hidroisoquinolinila.

[00322] "Heterocicloalquila" significa um grupo monocíclico monovalente saturado ou parcialmente insaturado (mas não aromático) de 3 a 9 átomos no anel ou um grupo bicíclico monovalente saturado ou parcialmente insaturado (mas não aromático) de 5 a 12 átomos no anel, em que um ou mais átomos do anel é(são) um heteroátomo independentemente é selecionado de -O-, -S(O)_n- (n é 0, 1 ou 2), -N= (nitrogênio trivalente) ou -NH- e os restantes átomos do anel são carbono. Grupos heterocicloalquila incluem anéis bicíclicos fundidos, em ponte e espiro heterocicloalquila. Por exemplo, quando fundido, o grupo heterocicloalquila pode compreender dois anéis que compartilham átomos

adjacentes (por exemplo, uma ligação covalente). Quando ligado em ponte, o grupo heterocicloalquila pode compreender dois anéis que compartilham três ou mais átomos, separando os dois átomos da cabeça de ponte por uma ponte contendo pelo menos um átomo. Quando espiro, o grupo heterocicloalquila pode compreender dois anéis que compartilham apenas um único átomo, o átomo espiro, que pode ser, por exemplo, um carbono quaternário. Em certas modalidades, o grupo heterocicloalquila compreende um, dois, três ou quatro heteroátomos no anel, selecionado(s) independentemente de -O-, -S(O)_n- (n é 0, 1 ou 2), -N= (nitrogênio trivalente) ou -NH-.

[00323] Em certas modalidades, o grupo heterocicloalquila contém de 5 ou 6 átomos no anel. Em certas modalidades, heterocicloalquila inclui, mas não está limitado a, azetidinila, pirrolidinila, piperidinila, morfolinila, piperazinila, piranila, tetra-hidropiranila, tetra-hidrotiopiranila, dioxinila, tiomorfolinila, pirazolidinila, imidazolinila, imidazolidinila, oxazolinila, oxazolidinila, isoxazolidinila, tiazolinila, tiazolidinila e tetra-hidrofurila.

[00324] No contexto desta invenção, uma diminuição ou um aumento de um parâmetro a ser avaliada(o) significa uma alteração de pelo menos 5% do valor correspondente a esse parâmetro. Mais de preferência, uma diminuição ou um

aumento do valor significa uma alteração de pelo menos 10%, ainda mais de preferência, pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 70%, pelo menos 90% ou 100%. Neste último caso, pode ser que não exista mais um valor detectável associado ao parâmetro.

[00325] O uso de uma substância como medicamento, como descrito neste documento, também pode ser interpretado como o uso da referida substância na fabricação de um medicamento. De forma similar, sempre que uma substância é usada para tratamento ou como medicamento, também pode ser usada para a fabricação de um medicamento para tratamento.

[00326] A palavra "cerca de" ou "aproximadamente" quando usada em associação com um valor numérico (por exemplo, cerca de 10) significa, de preferência, que o valor pode ser o valor dado (de 10) mais ou menos 0,1% do valor.

[00327] Os compostos ou composições de acordo com esta invenção são, de preferência, para uso em métodos ou usos de acordo com esta invenção.

[00328] Como será entendido por uma pessoa habilitada, ao longo deste pedido, os termos "BNA", "arcabouço de BNA", "nucleotídeo de BNA", "nucleosídeo BNA", "modificação BNA" ou "modificação de arcabouço de BNA" podem ser substituídos por modificação de arcabouço conformacionalmente restrita, modificação de arcabouço

bloqueado, nucleotídeo bloqueado, nucleosídeo bloqueado, monômero bloqueado, ou modificação de arcabouço de intensificação de T_m, ou modificação de alta afinidade e semelhantes, como apropriado.

[00329] Os exemplos seguintes são oferecidos apenas para fins ilustrativos, e não pretendem limitar o escopo da presente invenção de qualquer forma.

Legendas para as figuras

Figura 1.

[00330] O efeito da implementação de um nucleotídeo modificado por um arcabouço de BNA 5' e/ou 3' no salto de éxon 51 DMD induzido por AON (A) e produção de distrofina (B) em uma cultura de células musculares de pacientes com DMD (éxon del. 48-50), em comparação com uma AON isosequencial sem modificação de BNA com base na SEQ ID NO: 452. A modificação de BNA neste caso é LNA (SEQ ID NOS mostrado na figura refere-se à SEQ ID NOS, em que as modificações de arcabouço de BNA como indicado resultam em um monômero de LNA). (A): As percentagens médias de saltos do éxon 51 foram determinadas por análise de RT-ddPCR de amostras de RNA triplicadas, barras de erro indicam desvio padrão, AON (800 nM ou 4 µM). (B): Valores médios de quimiluminescência (área sob a curva (AUC) do eletroferograma) foram medidos por imunensaio capilar Western simples; concentrações de proteína, alta a baixa,

foram carregadas HC = amostra de músculo de controle saudável, NT = amostra não tratada, concentração de AON a 800 nM.

Figura 2.

[00331] O efeito da implementação de um nucleotídeo modificado por um esqueleto de BNA 5' e/ou 3' no salto do éxon 51 de DMD induzido por AON em uma cultura de células musculares de paciente com DMD (éxon del. 48-50), em comparação com um AON

[00332] iso-sequencial sem modificação de BNA com base na SEQ ID NO: 452. A modificação de BNA em A é CRN (SEQ ID NOs: 453C e 455C mostradas na figura referem-se a SEQ ID NO: 453 e 455 onde as modificações de arcabouço de BNA como indicado resultam em um monômero de CRN). A modificação de BNA em B é 2'-amino-2'-desoxi LNA, que neste pedido é referido como 2'-amino-LNA (SEQ ID NO: 456A mostrada na figura refere-se a SEQ ID NO: 456, em que o a modificação de arcabouço de BNA como indicado resulta em um monômero 2'-amino-LNA). As percentagens médias de salto do éxon 51 foram determinadas por análise RT-ddPCR de amostras de RNA em triplicata, barras de erro indicam desvio padrão, concentração de AON a 800 nM (B) ou 4 µM (A, B).

Figura 3.

[00333] O efeito da implementação de um nucleotídeo modificado por um arcabouço de BNA 5' e/ou 3' no éxon 51 de

DMD induzido por AON, saltando no modelo de camundongo com hDMD após 12 semanas de tratamento IV (100 mg/kg de AON semanalmente). A modificação de BNA neste caso é LNA (SEQ ID NOs mostradas na figura refere-se a SEQ ID NOs, onde as modificações de arcabouço de BNA como indicado resultam em um monômero de LNA). As percentagens médias do salto de éxon 51 foram determinadas por análise RT-ddPCR de amostras de RNA muscular.

Figura 4.

[00334] O efeito da implementação de pelo menos um nucleotídeo modificado por arcabouço de BNA no salto do éxon 51 de DMD induzido por AON em uma cultura de células musculares de paciente com DMD (éxon del. 48-50), em comparação com um AON iso-sequencial sem modificação de BNA baseada em SEQ ID NO: 452 (todos a 800 nM). A modificação de BNA neste caso resulta em LNA (SEQ ID NOs mostradas na figura referem-se a SEQ ID NOs onde as modificações de arcabouço de BNA como indicado resultam em um monômero de LNA). O aumento médio das vezes dos níveis de salto do éxon 51 em relação à SEQ ID NO: 452 baseia-se na análise RT-ddPCR de amostras de RNA em triplicata.

Figura 5.

[00335] O efeito de implementação de um nucleotídeo modificado por arcabouço de BNA 5' e 3' no salto do éxon 44 de DMD induzido por AON (A, SEQ ID NO: 29), salto do éxon

45 (B, SEQ ID NO: 3185) e salto do éxon 53 (C, SEQ ID NO: 863) em células de músculo humano saudáveis, em comparação com AONs iso-sequenciais sem modificações de arcabouço de BNA (SEQ ID NO: 26 (éxon 44), SEQ ID NO: 6049 (éxon 45) e SEQ ID NO: 860 (éxon 53)). A modificação do BNA neste caso resulta em LNA (SEQ ID NOS mostradas na figura referem-se a SEQ ID NOS, onde as modificações de arcabouço do BNA como resultado indicado em um monômero de LNA). As percentagens médias de saltos de éxon foram determinadas por análise RT-ddPCR de amostras de RNA (n=6), barras de erro indicam desvio padrão, AON (800 nM ou 4 μ M).

Exemplos

EXEMPLO 1 (IN VITRO)

Material e métodos

AONs

[00336] Oligonucleotídeos antissentido (AONs) (Tabela 1, Figura 1-3) tinham um esqueleto de fosforotioato com monômeros 2'-O-metila e ou LNA (SEQ ID NO: 452, 453, 455 e 456), ou 2'-amino-LNA (SEQ ID NO: 456A), ou modificação de arcabouço de CRN (SEQ ID NO: 453C e 455C). O AON com a SEQ ID NO: 452 apresentava citosinas, as outras SEQ ID NOS apresentavam 5-metilcitosinas. 2'-amino-LNA refere-se à modificação do arcabouço que também é, às vezes, denominada 2'-amino-2'-desoxi LNA. Os AONs foram sintetizados em escala de 10 μ mol usando um sintetizador

OP-10 (GE/ÅKTA Oligopilot), através de protocolos de fosforamidita padrão. Os AONs foram clivados e desprotegidos em uma sequência de duas etapas (dietilamina seguida por tratamento com NH_4OH conc.), purificados por HPLC e dissolvidos em água e foi adicionado um excesso de NaCl para troca de íons. Após a evaporação, os AONs foram redissolvidos em água, dessalinizados por FPLC e liofilizados. A espectrometria de massa confirmou a identidade de todos os AONs, e a pureza (determinada por UPLC) foi considerada aceitável para todos os AONs (> 80%).

Tabela 1

ID de AON	Modificação Química	Sequência	Comprimento	SEQ ID NO
NO: 452	20Me/PS	UCAAGGAAGAUGGCAUUUCU	20	452
NO: 453 (C)	20Me/BNA/PS	<u>T</u> CAAGGAAGAUGGCAUUUCU	20	453
NO: 455 (C)	20Me/BNA/PS	<u>T</u> CAAGGAAGAUGGCAUUUCT <u>T</u>	20	455
NO: 456 (A)	20Me/BNA/PS	<u>T</u> CAAGGAAGAUGGCAUUUCU	20	456

A = adenosina, G = guanina, U = uracila, T = timina, C = citosina, C = 5-metilcitosina e T = nucleotídeo de BNA; 20Me detalha que o AON compreende substituições de 2'-O-metila em todos os monômeros de não BNA; PS detalha que o AON compreende exclusivamente ligações de esqueleto de fosforotioato

Captação gimnótica e síntese de cDNA

[00337] Mioblastos imortalizados, derivados de um paciente com DMD com uma eliminação de éxons 48-50 ($\Delta 48-$

50), foram cultivados até a confluência em placas de 6 cavidades. Para induzir a formação de miotubos, o meio de proliferação foi substituído por meio de diferenciação de soro baixo por 5 dias, suplementado com 800 nM ou 4 µM de AON (em triplicata) de acordo com procedimentos operacionais padrão não-GLP. O RNA total foi então isolado e 1000 ng de RNA foi usado como entrada para a síntese de cDNA usando iniciadores de hexâmeros aleatórios.

Análise de PCR em gota digital (dd)

[00338] Ensaios específicos do aglutinante de sulco menor Taqman (MGB) foram concebidos para detectar os produtos do transcrito da distrofina com e sem o éxon 51 (Tabela 2) e foram adquiridos da Applied Biosystems. A análise de PCR em gota digital foi realizada em 1µl (para transcrito não saltado) ou 4µl (para transcrito saltado) de cDNA em um volume de reação de 20µl usando uma temperatura de anelamento/extensão de 60°C de acordo com as instruções do fabricante (BioRad). Os dados foram apresentados como porcentagem de salto de éxon $[N_0 \text{ saltados} / (N_0 \text{ saltados} + N_0 \text{ não saltados}) * 100]$.

Tabela 2

Ensaio	Éxons de	Sequências	Comprimento	SEQ ID NO
	direcionamento		de amplicon	
	Iniciador	TGAAAATAAGCTCA		1586
	Direto	AGCAGACAAATC		

DMD_47-	47/52	Iniciador	GACGCCTCTGTTC	71	1587
52		Inverso	CAAATCC		
		Sonda	CAGTGGATAAAGG		1588
			CAACA		
		Iniciador	GTGATGGTGGGTG	82	1589
		Direto	ACCTTGAG		
DMD_51-	51/52	Iniciador	GACGCCTCTGTTC		1590
52.2		Inverso	CAAATCC		
		Sequência	CAAGCAGAAGGCA		1591
		de Sonda	ACAA		

Imunoensaio capilar Western simples

[00339] A proteína total foi extraída em tampão de carregamento proteico (6% de Tris-HCl a 1,25 M em pH 6,8, 20% de glicerol, 15% de SDS, 0,0016% de azul de bromofenol, 5% de β -mercaptoetanol (todos Sigma) com inibidor de protease (Roche)). A concentração de proteína foi medida usando um Conjunto de Reagente de preparação de Ensaio de Proteína Compatível (Thermo scientific) e um Kit de Ensaio de Proteína Pierce BCA (Thermo scientific). Para a amostra de células de controle humano saudável, 50,5 ou 0,5 $\mu\text{g/mL}$ foram aplicados, para as amostras de células de pacientes com DMD, 100, 50 ou 10 $\mu\text{g/mL}$. Os níveis de proteína distrofina foram quantificados usando o Imunoensaio Capilar Western Simples (Proteína Simples) e o Kit Rabbit Master WES 66-440 kDa (Protein Simple cat. # PSMK20) de acordo com os protocolos do fabricante. A placa WES foi carregada com escada biotinilada, amostras, anticorpo anti-distrofina

policlonal de coelho primário (Abeam, cat.# ab15277, 1:50 diluído no diluente de anticorpo fornecido), estreptavidina-HRP para detecção de escada, anticorpo anti-coelho secundário, mistura de luminol e peróxido e tampão de lavagem (todos fornecidos no kit WES master). A placa foi centrifugada durante 5 minutos a 2500 rpm em temperatura ambiente e carregada no equipamento WES em conjunto com o cartucho capilar correspondente. Depois de realizar o ensaio, os dados foram analisados usando o software Compass.

Resultados

[00340] A implementação de pelo menos um nucleotídeo modificado por arcabouço de BNA 5' e/ou 3' em uma AON melhora os níveis de saltos do éxon 51 quando comparado com um AON iso-sequencial sem nucleotídeo modificado por arcabouço de BNA (baseado na SEQ ID NO: 452). A Figura 1A mostra este efeito para três AONs (SEQ ID NO: 453, NO: 455 e NO: 456) a baixas (800 nM) e altas concentrações (4 µM) em células do músculo do paciente com DMD *in vitro*. A modificação do arcabouço de BNA neste caso é LNA. Em comparação com AON sem modificações do arcabouço de BNA com base na SEQ ID NO: 452, os AONs com nucleotídeos de LNA induziram níveis de saltos de éxon 51 de 4 a 8 vezes mais altos. Isto foi associado a uma melhoria ainda maior nos níveis de distrofina (até 20 vezes com a SEQ ID NO: 456)

(Figura B). Foi obtido um efeito semelhante com a implementação de um nucleotídeo modificado por arcabouço de CRN 5' e/ou 3' (SEQ ID NO: 453C e 455C) ou modificado por arcabouço de 2'-amino-LNA (SEQ ID NO: 456A) quando comparado com o AON sem modificações de arcabouço de BNA com base na SEQ ID NO: 452 a 800 nM e/ou 4 µm (Figura 2A,B).

EXEMPLO 2 (IN VIVO)

Material e métodos

AONs

[00341] Oligonucleotídeos antissentido (AONs) (Tabela 1, Figura 3) tinham um esqueleto completo de fosforotioato com substituições 2'-O-metila em todos os monômeros não BNA, 5-metilcitosinas e modificações de arcabouço de BNA resultando em monômeros de LNA (SEQ ID NOs: 453, 455 e 456). O AON de controle com a SEQ ID NO: 452 tinha um esqueleto de fosforotioato com monômeros de 2'-O-metila, citosinas e nenhuma modificação de arcabouço de BNA. Os AONs foram sintetizados em uma escala de 1 mmol usando um sintetizador OP-100 (GE/ÅKTA Oligopilot), através de protocolos padrão de fosforamidita. Os AONs foram clivados e desprotegidos em uma sequência de duas etapas (dietilamina seguida por tratamento com NH₄OH conc.), purificados por cromatografia de troca iônica, dessalinizados por ultrafiltração/diafiltração e

lioofilizados. A espectrometria de massa confirmou a identidade de todos os AONs e a pureza (determinada por UPLC) foi considerada aceitável para todos os AONs (> 85%).

Experimento com camundongo

[00342] Este experimento de camundongo foi realizado de acordo com as diretrizes do Instituto Nacional de Saúde (NIH) para o cuidado e o uso de animais de laboratório. Camundongos com hDMD foram criados e genotipados pela JAX Labs (EUA). Os camundongos foram distribuídos aleatoriamente em grupos (n=15), tendo em conta o peso base e a distribuição masculino-feminino. Os camundongos receberam 1x por semana uma injeção intravenosa na veia da cauda com 100 mg/kg de cada um dos AONs com SEQ ID NO: 452, 453, 455 ou 456, e começando às 5-6 semanas de idade durante um total de 12 semanas (SEQ ID NO: 452 não compreende quaisquer modificações de arcabouço de BNA neste caso). Quatro dias após a última injeção de AON, os animais foram sacrificados e as amostras de tecido coletadas (após a perfusão transcardial com PBS para remover o sangue dos tecidos). Amostras de tecidos musculares foram congeladas e armazenadas a -80°C.

Isolamento de RNA e síntese de cDNA

[00343] Os tecidos foram homogeneizados em 1 mL de RNA-Bee (Bio-Connect) por trituração em um MagNa Lyser usando MagNa Lyser Green Beads (Roche). O RNA total foi

extraído do homogeneizado com base nas instruções do fabricante. Para a síntese de cDNA, 1000 ng de RNA total foi usado como entrada.

[00344] O cDNA foi gerado em reações de 20µl usando iniciadores de hexâmeros aleatórios e Transcriptor de transcriptase reversa de acordo com as instruções do fabricante (Roche), com a exceção de que a incubação ocorreu por 40 minutos a 50°C ao invés de 30 minutos a 55°C.

Análise de PCR em gota digital

[00345] Ensaaios específicos do aglutinante de sulco menor Taqman (MGB) foram concebidos (usando o software Primer Express 3.0.1; Applied Biosystems) para detectar os produtos do transcrito da distrofina com e sem o éxon 51 (Tabela 2) e adquiridos da Applied Biosystems. A análise de PCR em gota digital foi realizada em 2 ou 4 µl de cDNA em um volume de reação de 20 µl usando uma temperatura de anelamento/extensão de 60°C de acordo com as instruções do fabricante (BioRad). Os dados foram apresentados como porcentagem de salto de éxon $[N_0 \text{ saltados} / (N_0 \text{ saltados} + N_0 \text{ não saltados}) * 100]$.

Resultados

[00346] Camundongos com hDMD transgênicos que expressam distrofina humana de tamanho completo permitem a

triagem *in vivo* de AONs específicos para humanos em uma base experimental com camundongos. Note que este modelo não é deficiente em distrofina e não tem patologia muscular. Portanto, a captação de AONs pelo tecido muscular é tipicamente menor do que no modelo de camundongos *mdx*. Neste experimento, três AONs com nucleotídeos modificados por arcabouço de BNA 5' e/ou 3' (SEQ ID NO: 453, 455 e 456, usando modificações de arcabouço de LNA) foram comparados com o AON iso-sequencial sem nucleotídeos modificados por arcabouço de BNA (SEQ ID NO: 452) em um estudo de hDMD sistêmico (IV) de 12 semanas. A Figura 3 mostra níveis de salto de éxon 51 *in vivo* melhorados para todos os AONs contendo LNA, até 8 vezes com AON da SEQ ID NO: 455 quando comparado com AON da SEQ ID NO: 452.

EXEMPLO 3 (IN VITRO)

AONs

[00347] Os oligonucleotídeos antissentido (AONs) da invenção (Tabela 3, Figura 4) compreende um esqueleto completo de fosforotioato com substituições 2'-O-metila em todos os monômeros não BNA, 5-metilcitosinas, e pelo menos uma modificação de arcabouço de BNA resultando em um monômero de LNA (SEQ ID NOs: 455, 459, 4528, 4531, 4532, 4533, 4535, 4542, 4548 e 4568). O AON de controle com a SEQ ID NO: 452 compreende um esqueleto de fosforotioato com monômeros de 2'-O-metila, citosinas e nenhuma modificação

de arcabouço de BNA. Os AONs foram sintetizados em escala de 5 μ mol usando um sintetizador OP-10 (GE/ÅKTA Oligopilot), através de protocolos padrão de fosforamidita. Os AONs foram clivados e desprotegidos em uma sequência de duas etapas (DEA seguido de tratamento com NH_4OH conc.), purificados por cromatografia de troca iônica, dessalinizados por cromatografia por exclusão de tamanho e liofilizados. A espectrometria de massa confirmou a identidade de todos os AONs e a pureza (determinada por UPLC) foi considerada aceitável para todos os AONs (> 80%).

Tabela 3

SEQ ID NO:	Modificação Química	Sequência
452	20Me/os	UCAAGGAAGAUGGCAUUUCU
455	20Me/PS/LNA	<u>T</u> CAAGGAAGAUGGCAUUUC <u>T</u>
459	20Me/PS/LNA	<u>T</u> CAAGGAAGAUGGCAUUUCUAG
4528	20Me/PS/LNA	<u>T</u> CAAGGAAGAUGGCAUUUCUAG
4531	20Me/PS/LNA	<u>T</u> CAAGGAAGAUGGCAUUUCUAG
4532	20Me/PS/LNA	<u>T</u> CAAGGAAGAUGGCAUUUCUAG
4533	20Me/PS/LNA	<u>T</u> CAAGGAAGAUGGCAUUUCUAG
4535	20Me/PS/LNA	<u>T</u> CAAGGAAGAUGGCAUUUC <u>T</u>
4542	20Me/PS/LNA	<u>T</u> CAAGGAAGAUGGCAUUUC <u>T</u>
4548	20Me/PS/LNA	<u>C</u> AAGGAAGAUGGCAUUUC <u>T</u>
4568	20Me/PS/LNA	<u>G</u> GUAAGUUCUUUCAAGC

A = adenosina, G = guanina, U = uracila, T = timina, C =

citossina, C = 5-metilcitossina e T = nucleotídeo LNA; 20Me detalha que o AON compreende substituições de 2'-O-metila em todos os monômeros não BNA; PS detalha que o AON compreende exclusivamente ligações de esqueleto de fosforotioato

Captação gimnótica e síntese de cDNA

[00348] Mioblastos imortalizados, derivados de um paciente com DMD com uma eliminação de éxons 48-50 (Δ 48-50), foram cultivados até a confluência em placas de 6 cavidades. Para induzir a formação de miotubos, o meio de proliferação foi substituído por um meio de diferenciação de baixo teor de soro durante 7 dias, suplementado com AON a 800 nM (em triplicata) de acordo com procedimentos operacionais normais não GLP. O RNA total foi então isolado e 1000 ng de RNA foi usado como entrada para a síntese de cDNA usando iniciadores de hexâmeros aleatórios.

Análise de PCR em gota digital (dd)

[00349] Ensaios específicos do aglutinante de sulco menor Taqman (MGB) foram concebidos para detectar os produtos do transcrito da distrofina com e sem o éxon 51 (Tabela 2) e foram adquiridos da Applied Biosystems. A análise de PCR em gota digital foi realizada em 1 μ l (para transcrito sem salto éxon) ou 4 μ l (para transcrito com salto de éxon) de cDNA em um volume de reação de 20 μ l

usando uma temperatura de anelamento/extensão de 60°C de acordo com as instruções do fabricante (BioRad). Os dados foram apresentados como porcentagem de salto de éxon $[N_0 \text{ saltados} / (N_0 \text{ saltados} + N_0 \text{ não saltados}) * 100]$.

Resultados

[00350] A implementação de pelo menos um nucleotídeo modificado por arcabouço de BNA (resultando em um monômero de LNA) em um AON melhora os níveis de salto de éxon 51 quando comparado com um AON iso-sequencial sem uma modificação de arcabouço de BNA (com base na SEQ ID NO: 452). A Figura 4 mostra este efeito para dez AONs (SEQ ID NOs: 455, 459, 4528, 4531, 4532, 4533, 4542, 4542, 4548 e 4568) a uma concentração de 800 nM em células do músculo do paciente com DMD in vitro. Em comparação com a AON sem uma modificação de arcabouço de BNA (SEQ ID NO: 452), os AONs com nucleotídeos de LNA induzem níveis de saltos de éxon 51 de 10 a 40 vezes mais altos.

EXEMPLO 4 (IN VITRO)

Material e métodos

AONs

[00351] Os oligonucleotídeos antissentido (AONs) da invenção (Tabela 4, Figura 5) compreenderam um esqueleto completo de fosforotioato com substituições 2'-O-metila, 5-metilcitosinas, e pelo menos uma modificação de arcabouço de BNA resultando em um monômero de LNA (SEQ ID NOs:29,

3185 e 863). Os AONs de controle compreendiam um esqueleto completo de fosforotioato com apenas monômeros substituídos com 2'-O-metila, 5-metilcitosinas, mas sem modificação de arcabouço de BNA (SEQ ID NO: 26, 6049 e 860; para SEQ ID NO: 6049, estas modificações tornam os mesmos idênticos a SEQ ID NO: 6071). Os AONs foram sintetizados em escala de 5 µmol usando um sintetizador OP-10 (GE/AKTA Oligopilot), através de protocolos padrão de fosforamidita. Os AONs foram clivados e desprotegidos em uma sequência de duas etapas (DEA seguido de tratamento com NH₄OH conc.), purificados por cromatografia de troca iônica, dessalinizados por cromatografia por exclusão de tamanho e liofilizados. A espectrometria de massa confirmou a identidade de todos os AONs, e a pureza (determinada por UPLC) foi considerada aceitável para todos os AONs (> 80%).

Tabela 4

SEQ ID NO:	Modificação Química	Sequência
26	20Me/PS	UCAGCUUCUGUUAGCCACUG
2	20Me/PS/LNA	TCAGCUUCUGUUAGCCACUG
6049	20Me/PS	UUUGCCGCGGCCAAUGCCAUCUG
3185	20Me/PS/LNA	TUUGCCGCGGCCAAUGCCAUCUG
860	20Me/PS	GUUGCCUCCGGUUCUGAAGGUGUUC
86	20Me/PS/LNA	GUUGCCUCCGGUUCUGAAGGUGUUC

A = adenosina, G = guanina, U = uracila, T = timina, C = 5-metilcitosina e T = nucleotídeo LNA; 20Me detalha que o AON compreende substituições de 2'-O-metila em todos os

monômeros não-BNA; PS detalha que o AON compreende exclusivamente ligações de esqueleto de fosforotioato

Captação Gimnótica e síntese de cDNA

[00352] Mioblastos imortalizados, derivados de um doador saudável, foram cultivados para confluência em placas de 12 cavidades. Para induzir a formação de miotubos, o meio de proliferação foi substituído por meio de diferenciação de baixo teor de soro por 7 dias, suplementado com 800 nM ou 4 μ M de AON (n=6) de acordo com procedimentos operacionais padrão não GLP. O RNA total foi então isolado e 1000 ng de RNA foi usado como entrada para a síntese de cDNA usando iniciadores de hexâmeros aleatórios.

Análise de PCR em gota digital (dd)

[00353] Ensaios específicos do aglutinante de sulco menor Taqman (MGB) foram concebidos para detectar os produtos do transcrito da distrofina com e sem o éxon 44, 45 ou 53 (Tabela 5) e foram adquiridos da Applied Biosystems. A análise de PCR em gota digital foi realizada em 1 μ l (para transcrições sem salto de éxon) ou 4 μ l (para transcrito com salto de éxon) de cDNA em um volume de reação de 20 μ l usando uma temperatura de anelamento/extensão de 60°C de acordo com as instruções do fabricante (BioRad). Os dados foram apresentados como

porcentagem de salto de éxon $[N_0 \text{ saltados} / (N_0 \text{ saltados} + N_0 \text{ não saltados}) * 100]$.

Tabela 5

Ensaio		Iniciador/sonda	Comprimento de	SEQ ID
		Sequências (5' -3')	apmlicon	
DMD 43-45	Direto	CCCAGCTTGATTTCCAATGG	83	6050
	Inverso	GCCGCTGCCCAATGC		6051
	Sonda	ACCGACAAGGGAATC		6052
DMD 44-45	Direto	TGGGAACATGCTAAATACAAATGG	62	6053
	Inverso	TCCGCTGCCCAATG		6054
	Sonda	ATCTTAAGGAATCCAGGATG		6055
DMD 44-46.2	Direto	GAGAATTGGGAACATGCTAAATACAA	110	6056
	Inverso	CCTCCAACCATAAAACAAATTCATT		6057
	Sonda	TATCTTAAGGCTAGAAGAACAA		6058
DMD 52-54	Direto	CCAGCAATCAAGAGGCTAGAACA	92	6059
	Inverso	TCATTTGCCACATCTACATTTGTCT		6060
	Sonda	ATTACGGATCGAACAGTTG		6061
DMD 53-54	Direto	GTCCCTATACAGTAGATGCAATCCAA	75	6062
	Inverso	GCCACTGGCGGAGGTCTT		6063
	Sonda	ACAGAAACCAAGCAGTTG		6064

Resultados

[00354] A implementação de modificações de arcabouço de BNA resultando em monômeros de LNA nas extremidades 5' e 3' de AONs direcionados a éxon 44, éxon 45 ou éxon 53 de DMD, melhorou os níveis de saltos de éxons em miotubos de controle de humanos saudáveis in vitro 2- a 3 vezes quando em comparação com AONs iso-sequenciais sem modificações de arcabouço de BNA. A Figura 5 mostra este efeito para três AONs (SEQ ID NO: 29 (éxon de direcionamento 44), SEQ ID NO: 3185 (éxon de direcionamento 45), e SEQ ID NO: 863 (éxon de

direcionamento 53), em concentrações baixas (800 nM) e altas (4 μ M). Note que os níveis de salto de éxon em miotubos de humanos saudáveis são tipicamente menores que os obtidos em células musculares de pacientes com DMD (como usado no Exemplo 1). Isto é explicado pela degradação mediada por mutação sem sentido de transcritos fora de quadro resultando do éxon induzido por AON para saltar em células musculares saudáveis.

Lista de referências

- Dominski e Kole, PNAS 1993, 90(18):8673-8677
- Friedman et al., J Biol Chem 1999, 274(51):36193-36199
- Uchikawa et al., J Hum Genet 2007, 52 11):891-897
- Williams et al., Oligonucleotides 2006, 16(2):186-95
- Vickers et al., J Immunol 2006, 176(6):3652-61
- Karras et al., Biochemistry 2001, 40(26):7853-9
- Vetrini et al., Hum Mutat 2006, 27(5):420-6
- Du et al., PNAS 2007, 104(14):6007-12
- Rincon et al., Am J Hum Genet 2007, 81(6):1262-1270
- Tyson-Capper et al., Mol Pharmacol 2006, 69(3):796-804
- Khoo et al., BMC Mol Biol 2007, 8;3
- Renshaw et al., Mol Cancer Ther 2004, 3(11):1467-84
- Giles et al., Nucleic Acid Drug Dev 1999, 9(2):213-20
- Goto et al., J Invest Dermatol 2006, 126(12):2614-20
- Disterer et al., Mol Ther 2013, 21(3):602-609
- Uehara et al., FASEB J 2013, 27(1):76-85

Gedicke-Hornung et al., EMBO Mol Med 2013, 5(7):1060-77

Lentz et al., Nat Med 2013, 19(3):345-350

Taniguchi-Ikeda et al., Nature 2011, 478(7367):127-31

Owen et al., PLoS One 2012, 7(3):e33576

Zammarchi et al., PNAS 2011, 108(43):17779-84.

Mercatante et al., J Biol Chem 2002, 277(51):49374-82

Osorio et al., Sci Transl Med 2011, 3(106):106ra107

Wein et al., Hum Mut 2010, 31(2):136-42

Gao et al., Cell Transplant 2008, 17(7)723-34

Peacey et al., NAR 2012, 40(19):9836-49

Wheeler et al., J Clin Invest 2007, 117(12):3952-7

Evers et al., Nucleic Acid Ther 2014, 24(1):4-12

van Ommen, van Deutekom, Aartsma-Rus, Curr Opin Mol Ther. 2008; 10(2):140-9.

Yokota, Duddy, Partidge, Acta Myol. 2007; 26(3):179-84.

van Deutekom et al., N Engl J Med. 2007; 357(26):2677-86.

Goemans et al., N Engl J Med. 2011; 364(16):1513-22.

Cirak et al., Lancet 2011; 378:595-605.

Voit et al., Lancet Neurol 2014, 13(10):987-96

Heemskerk et al., Mol Ther 2010; 18(6):1210-7.

Evers et al. PLoS One 2011, 6(9)e24308

Gao et al., Mol Ther Nucleic Acids 2015, 4:e255

Goyenvalle et al., Nat Med 2015, 21(3):270-5

Khoo e Krainer, Curr Opin Mol Ther 2009, 11(2):108-15

Singh et al., Mol Cell Biol 2006, 26(4):1333-46

Hua et al., Am J Hum Genet 2008, 82(4):834-48

Hua et al., Genes Dev 2010, 24(15):1634-44

Hua et al., Nature 2011, 478(7367):123-6

Passini et al., Sci Transl Med 2011, 3(72):72ra18

Swoboda et al., J Clin Invest 2014, 124(2):487-90

Chiriboga et al., Neurology 2016, 86(10):890-7

Braida C., et al., Human Molecular Genetics, 2010, vol 9: 1399-1412

Aartsma-Rus et al., Hum Mol Gen 2003; 12 (8): 907-14.

Yu RZ., Anal Biochem 2002; 304: 19-25.

Dorn e Kippenberger, Curr Opin Mol Ther 2008; 10(1):10-20

Krieg AM. et al., Nature 1995; 374:546-549.

Krieg, A. M., Curr. Opin. Immunol. 2000; 12:35-43.

Han et al., Nature Communications, 2016, doi:10.1038/ncomms10981

Wagner, H., Adv. Immunol. 1999; 73:329-368.

Popovic PJ. et al. J of Immunol 2006; 177:8701-8707.

Diebold S.S., et al., Eur J Immunol. 2006; Dez; 36(12): 3256-67.

Peacock H et al. J. Am. Chem. Soc. 2011, 133, 9200

Arai K et al. Bioorg. Med. Chem. 2011, 21, 6285

Ehmsen J. et al, J. Cell Sci. 2002, 115(Pt14):2801-2803.

Monaco A.P., et al. Genomics 1988; 2:90-95.

Manzur A.Y. et al., editores Wiley, 2008. A colaboração Cochrane.

Hodgetts S., et al., Neuromuscular Disorders 2006; 16:591-602.

Zuker M., et al., Nucleic Acids Res. 2003; 31(13):3406-15.

Cartegni L, et al, Nat Rev Genet 2002; 3(4):285-98.

Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20^a edição.

Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins, 2000

Kumar L, Pharm. Technol.2008, 3, 128

Bruno, K., Advanced Drug Delivery Reviews 2011; 63: 1210.

doi: 10.1021/ja710342q

Seth et al., J. Org. Chem. 2010, 75, 1569-1581

doi: 10.1093/nass/1.1.241

doi:10.1021/jo100170g

Osawa et al., J. Org. Chem., 2015, 80(21), págs. 10474-10481

WO 2014/145356 (MiRagen Therapeutics)

WO 2014/126229 (Mitsuoka Y et al.)

Yamamoto et al. *Org. Biomol. Chem.* 2015, 13, 3757

Nishida et al. *Chem. Commun.* 2010, 46, 5283

WO 2014/112463 (Obika S et al.)

WO 2015/142910 (lonis Pharmaceuticals)

Hanessian et al., J. Org. Chem., 2013, 78 (18), págs. 9064-9075

Bolli et al., Chem Biol. Mar de 1996; 3(3):197-206

DOI: 10.1021/jo402690j

Murray et al., Nucl. Acids Res., 2012, vol. 40, n° 13 6135-

6143 doi:10.1021/acs.joc.5b00184
Nucleic Acids Res. 2004, 32, 5791-5799
WO 2011/097641 (ISIS/Ionis Pharmaceuticals)
WO2016/017422 (Universidade de Osaka)
Cao et al., Mol. Ther. Nucleic Acids, 2016, doi:
10.1038/mtna.2016.46
Spitali et al., FASEB J 2013, 27(12):4909-4916
Horiba et al., J. Org. Chem. 2016, doi:
10.1021/acs.joc.6b02036
Shrestha et al., Chem. Commun. 2014, doi: 10.1039/C3CC46017G
WO2017/062862 (WaVe Life Sciences)
WO2016/028187 (Noogen)
Jirka et al., Nucl. Acid Ther. 2014, 24, 25
WO2013/030569
US9.161.948 (Sarepta)
WO2016/187425 (Sarepta)
Gao et al., Mol. Ther. 2014, 22, 1333
Shabanpoor et al., Nucl. Acids Ther. 2017, 27, 130
WO2017/062862 (Wave Life Sciences)
Ferrés-Coy et al. Mol. Psych. 2016, 21, 328
US 6.656.730 (ISIS/Ionis Pharmaceuticals)
Noir et al., J. Am. Soc. Chem. 2008, 130, 13500
Nakagawa et al., J. Am. Chem. Soc. 2010, 132, 8848
Dohmen et al., Mol. Ther. Nucl. Acids 2012, 1, e7
Zhao et al. Biomaterials 2015, 67, 42

WO2016/179257 (CytoMx)

Sugo et al., J. Control. Rel. 2016, 237, 1

Weisbart et al., Mol. Cancer Ther. 2012, 11, 1

Winkler et al. Ther. Deliv. 2013, 4, 791

Manoharan, Antisense Nucl. Acid. Dev. 2004, 12, 103

Ming et al., Adv. Drug Deliv. Rev. 2015, 87, 81

REIVINDICAÇÕES

1. Oligonucleotídeo tendo um comprimento de 10 a 33 nucleotídeos **caracterizado** pelo fato de compreender:

i) apenas monômeros 2'-substituídos ligados por ligações de esqueleto fosforotioato e/ou por ligações fosfodiéster,

ii) uma base de 5-metilcitosina, e

iii) pelo menos um monômero compreendendo uma modificação do arcabouço de ácido nucleico bicíclico (BNA),

em que o referido oligonucleotídeo é complementar a, ou se liga a, ou é direcionado a, ou se hibridiza com, pelo menos uma parte dos éxons 2 a 78 de pré-mRNA de distrofina.

2. Oligonucleotídeo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o referido oligonucleotídeo compreende um segmento contínuo de pelo menos 10 e até 33 nucleotídeos de pelo menos uma das sequências de nucleotídeos selecionadas de SEQ ID NO: 6065 a 6070, de preferência SEQ ID NO: 6067.

3. Oligonucleotídeo, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizado** pelo fato de que o referido oligonucleotídeo compreende 1, 2, 3 ou 4 monômeros que compreendem uma modificação de arcabouço de ácido nucleico bicíclico (BNA), de preferência, uma modificação de arcabouço de ácido nucleico ligado em ponte.

4. Oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das

reivindicações de 1 a 3, **caracterizado** pelo fato de que pelo menos uma modificação de arcabouço de ácido nucleico bicíclico (BNA) está compreendida em um monômero terminal do referido oligonucleotídeo, de preferência, no monômero 5'-terminal do referido oligonucleotídeo, mais de preferência, em ambos os monômeros terminais do referido oligonucleotídeo.

5. Oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 4, **caracterizado** pelo fato de que cada ocorrência da referida modificação de arcabouço de ácido nucleico (BNA) bicíclico resulta em um monômero que é independentemente selecionado do grupo que consiste em

um monômero de ácido nucleico (LNA) bloqueado, um monômero de nucleotídeo conformacionalmente restrito (CRN), um monômero xilo-LNA, um monômero α -L-LNA, um monômero β -D-LNA, um monômero 2'-amino-LNA, um monômero 2'-amino-LNA 2'-N-substituído, um monômero de etila restrito(cEt)-LNA (2'-O, 4'-C), um monômero de metoxietila restrito (cMOE)-BNA, um monômero de 2',4'-BNA^{NC}(N-H), um monômero de 2',4'-BNA^{NC}(N-Me), um monômero de ácido nucleico ligado a etileno (ENA), um monômero de nucleotídeo bicíclico ligado em ponte a 2'-C (CBBN) e derivados dos mesmos,

de preferência, selecionado do grupo consistindo em um monômero de LNA, um monômero de ENA, um monômero cEt-BNA, um monômero oxo-CBBN, um monômero 2'-amino-LNA e um

monômero cMOE-BNA,

mais de preferência selecionado do grupo consistindo em um monômero de LNA, um monômero de ENA, um monômero de cEt-BNA, ou um monômero de cNAE-BNA,

mais de preferência, a modificação de arcabouço de BNA resulta em um monômero de LNA.

6. Oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 5, **caracterizado** pelo fato de que o referido monômero 2'-substituído é um monômero de RNA 2'-substituído, um monômero 2'-F, um monômero 2'-amino, um monômero 2'-substituído, um monômero 2'-O-metila, ou um monômero 2'-O-(2-metoxietila), de preferência, um monômero 2'-O-metila.

7. Oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 6, **caracterizado** pelo fato de que todas as bases de citosina são bases de 5-metilcitosina e/ou em que todas as bases de uracila são bases de 5-metiluracila.

8. Oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 7, **caracterizado** pelo fato de que o comprimento do referido oligonucleotídeo é menor que 34 nucleotídeos.

9. Oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 8, **caracterizado** pelo fato de que o referido oligonucleotídeo compreende ou consiste em uma

sequência que é complementar ou se liga a, ou é direcionada a, ou se hibridiza com, pelo menos uma parte de uma sequência de reconhecimento de éxon (ERS), um silenciador de splicing exônico (ESS), um silenciador de splicing intrônico (ISS), um sítio de ligação de proteína SR, ou outro(a) elemento, sinal ou estrutura de splicing.

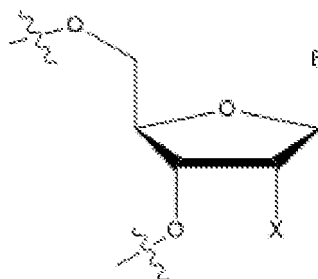
10. Oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 9, **caracterizado** pelo fato de que o referido oligonucleotídeo induz a modulação de splicing de pré-mRNA, de preferência, a referida modulação de splicing de pré-mRNA altera a produção ou composição de proteína, que de preferência compreende salto de éxon ou inclusão de éxon, em que modulação, mais de preferência, compreende o salto de éxon.

11. Oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 10, **caracterizado** pelo fato de que o referido oligonucleotídeo tem um parâmetro melhorado por comparação com um oligonucleotídeo correspondente que não compreende uma modificação de arcabouço de ácido nucleico bicíclico (BNA).

12. Oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 11, **caracterizado** pelo fato de que:

a) pelo menos um monômero tem fórmula I:

I



em que:

B é uma nucleobase;

X é F, $-NR^1R^2$ ou $-OR$;

R é alquenila ou alquila opcionalmente substituído, em que os substituintes opcionais, quando presentes, são halo, OR^1 , NR^1R^2 ou SR^1 ;

R^1 é H, alquila, cicloalquila, arila, heterocicloalquila ou heteroarila, cada um independentemente, opcionalmente, ainda substituído com halo, hidroxí ou alquila;

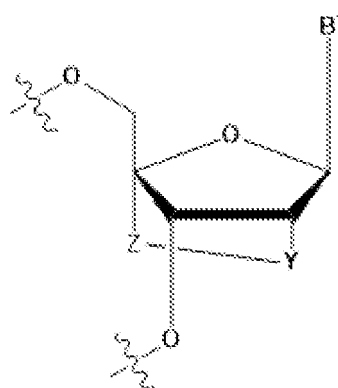
R^2 é H ou alquila; e



indica o ponto de ligação ao restante do oligonucleotídeo;

b) em que pelo menos um monômero compreende uma modificação de arcabouço de BNA e tem a fórmula II:

II



em que:

B^1 é uma nucleobase;

Z-Y é um grupo divalente selecionado de $-(CH_2)_nO-$, $-C(CH_2CH_2)O-$, $-CH_2WCH_2-$, $-(CH_2)_nNR^3-$, $-CH_2S(O_m)-$, $-CH(CH_3)O-$, $-CH(CH_2OCH_3)O-$, $-CH_2N(R^3)O-$, $-CH_2CH_2-$, $-C(O)NR^3-$, $-CH=CHO-$, $-CH_2SO_2NR^3-$, e $-NHC(O)NH-$;

n é 1 ou 2;

m é 0, 1 ou 2;

W é O, S ou NR^3 ;

R^3 é H, $-C(O)R^4$, $-C(=NH)NR^5R^5$, benzila, ou alquila opcionalmente substituído, em que os substituintes opcionais, quando presentes, são selecionados de entre halo e alcoxi;

R^4 é alquila, cicloalquila ou arila;

R^5 é H ou alquila; e



, indica o ponto de ligação ao restante do oligonucleotídeo.

13. Composição **caracterizada** pelo fato de que

compreende um oligonucleotídeo como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 12, de preferência, em que a referida composição compreende pelo menos um excipiente que pode adicionalmente auxiliar na intensificação do direcionamento e/ou dispensação da referida composição e/ou do referido oligonucleotídeo a um tecido e/ou uma célula e/ou para dentro de um tecido e/ou uma célula.

14. Oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 12, composição de acordo com a reivindicação 13, **caracterizado** pelo fato de ser para uso como medicamento, de preferência, para tratar, prevenir e/ou retardar a Distrofia Muscular de Duchenne (DMD).

15. Método para prevenir, tratar e/ou retardar a Distrofia Muscular de Duchenne (DMD), **caracterizado** pelo fato de compreender administrar a um indivíduo um oligonucleotídeo como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 12, ou uma composição como definida na reivindicação 13.

Fig. 1A

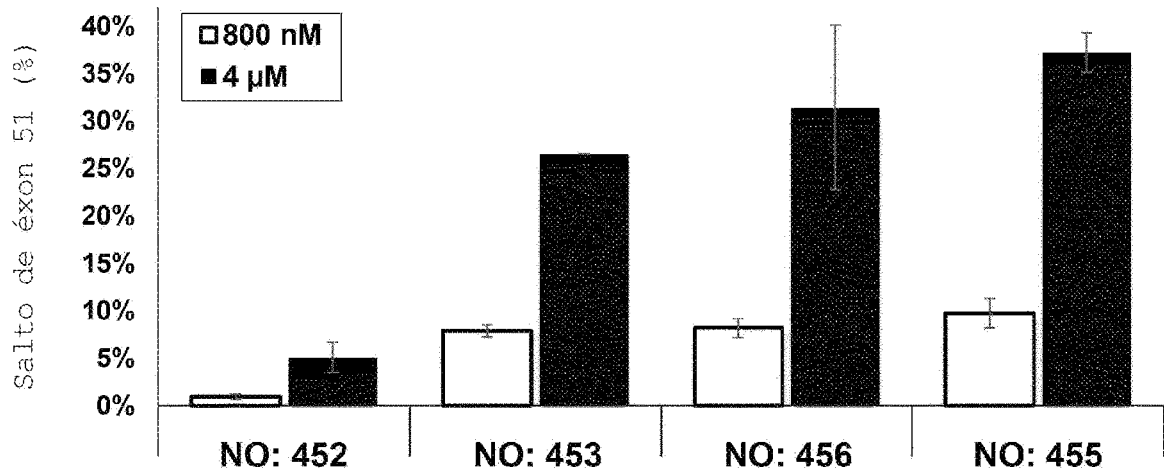


Fig. 1B

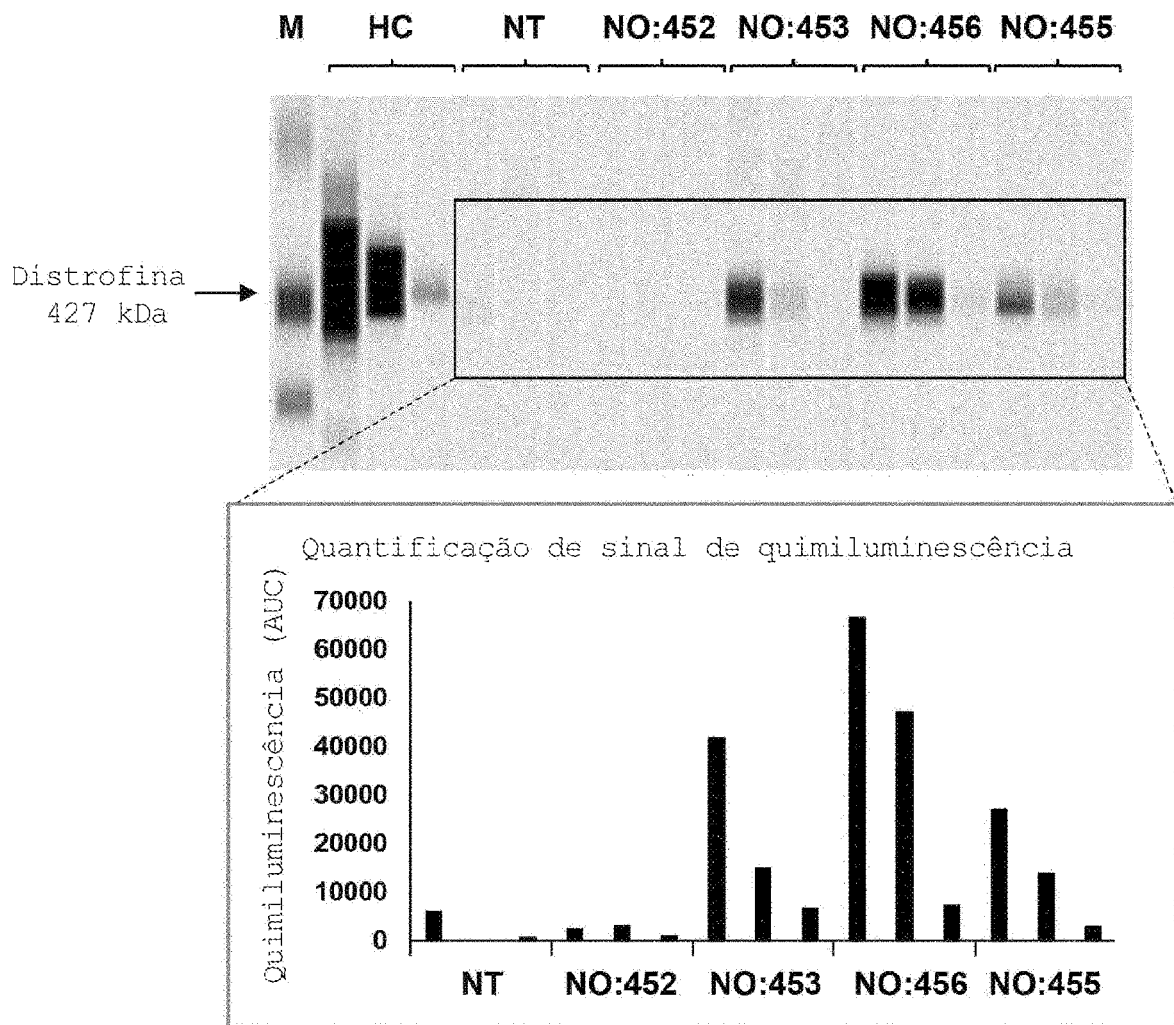


Fig. 2A

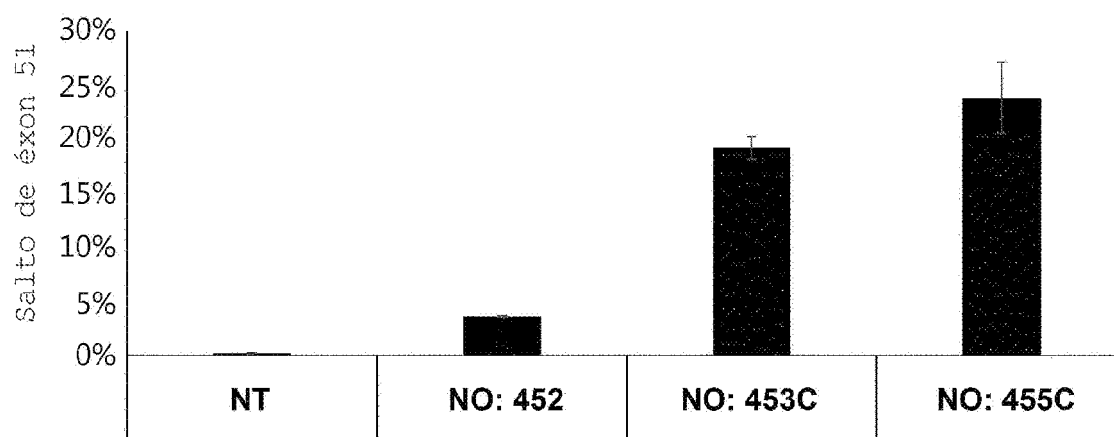


Fig. 2B

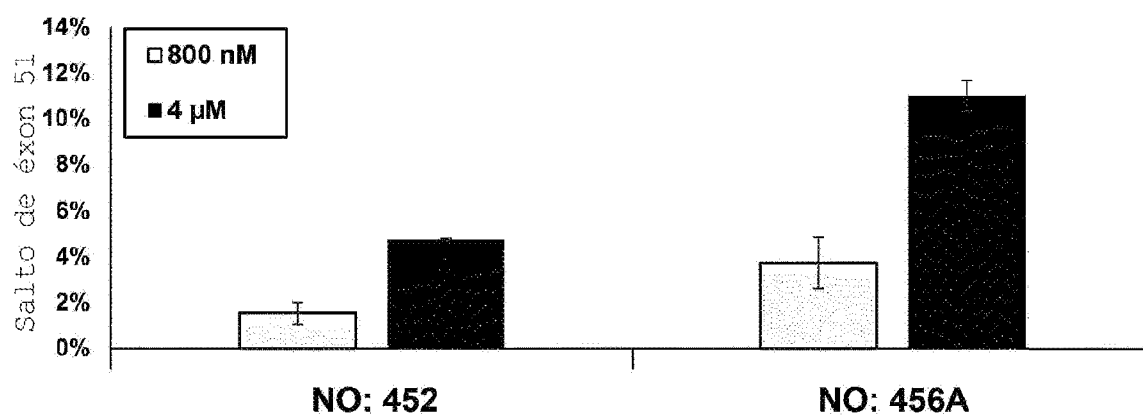


Fig. 3

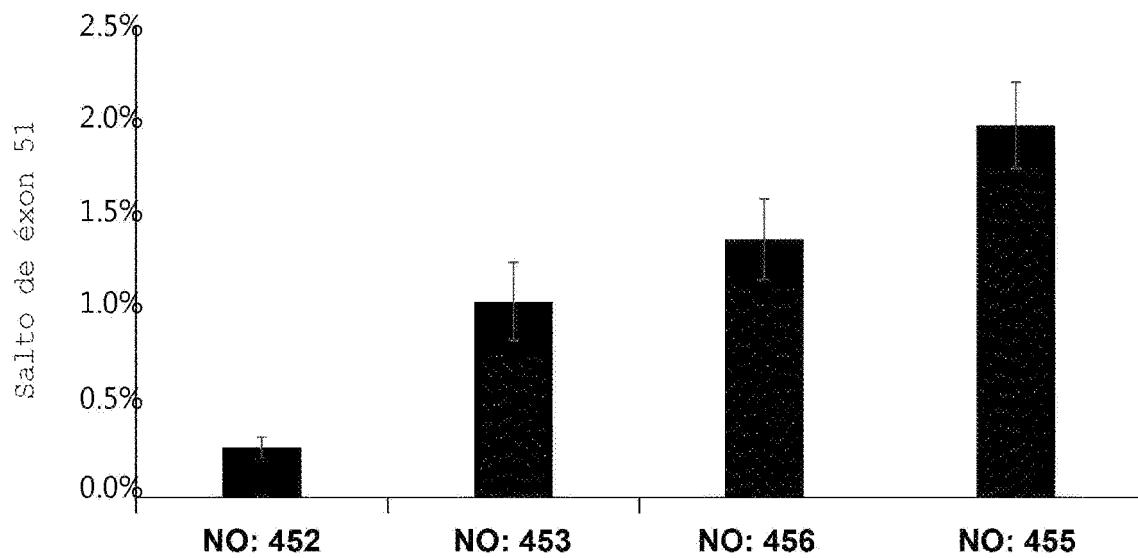


Fig. 4

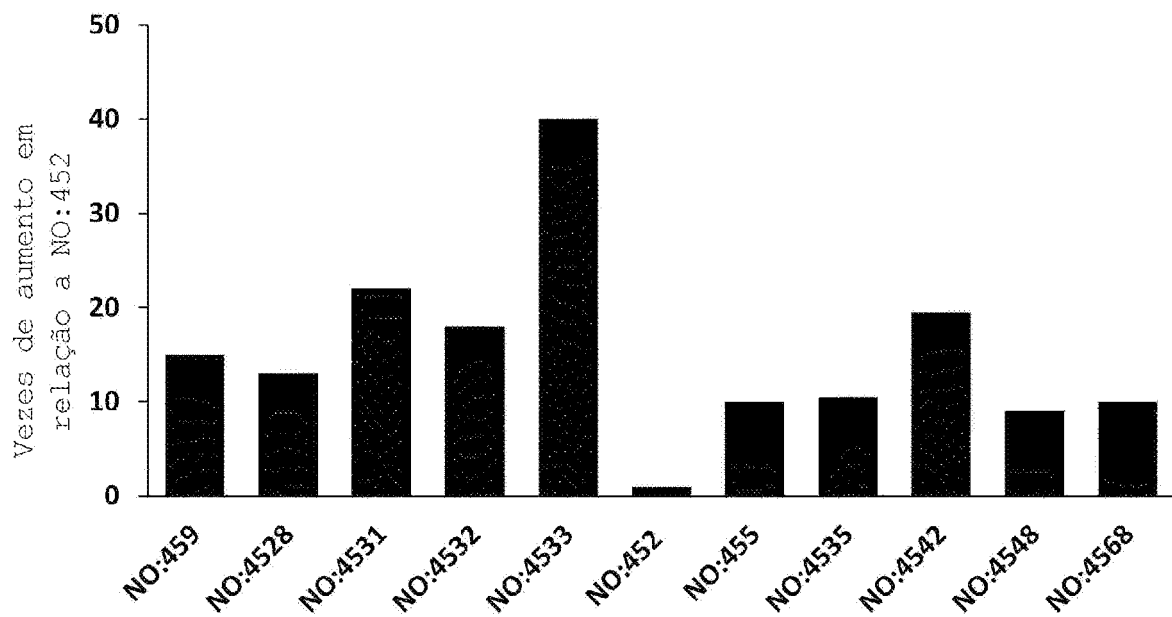


Fig. 5A

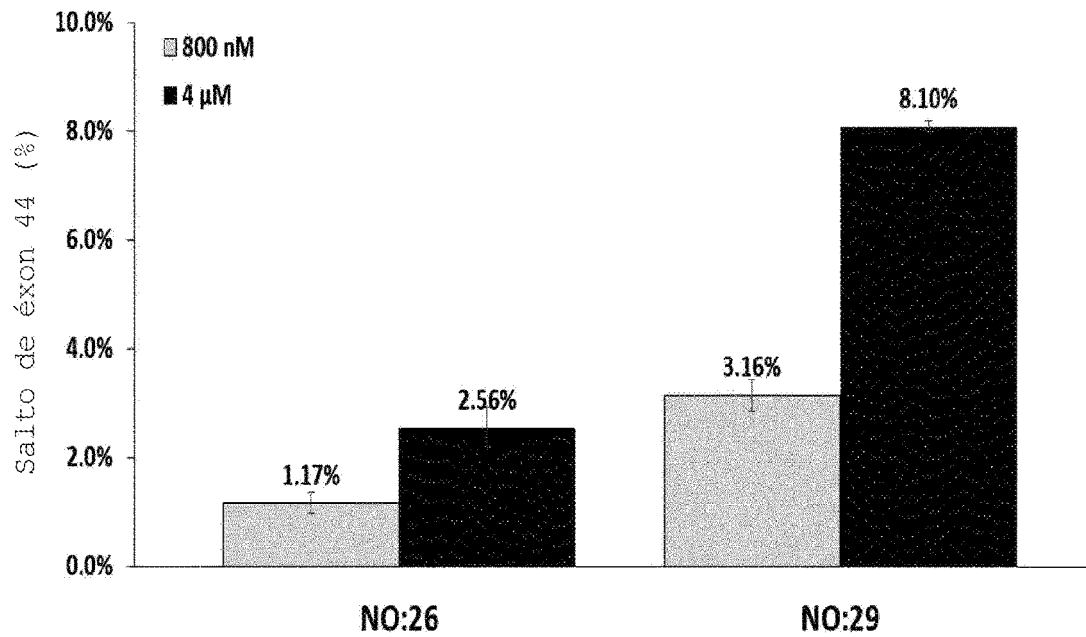


Fig. 5B

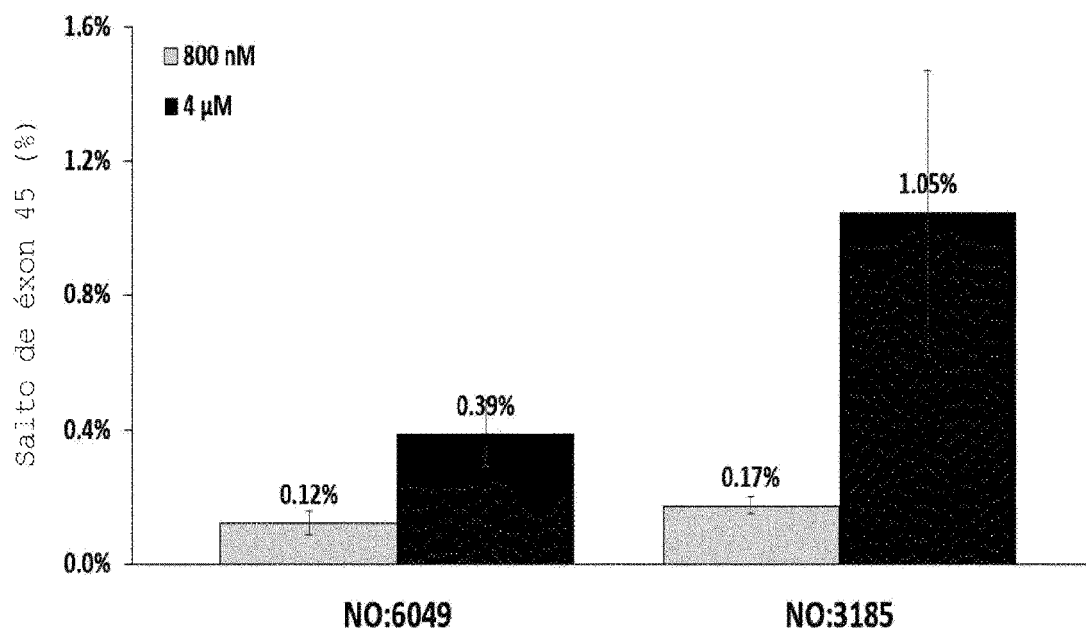
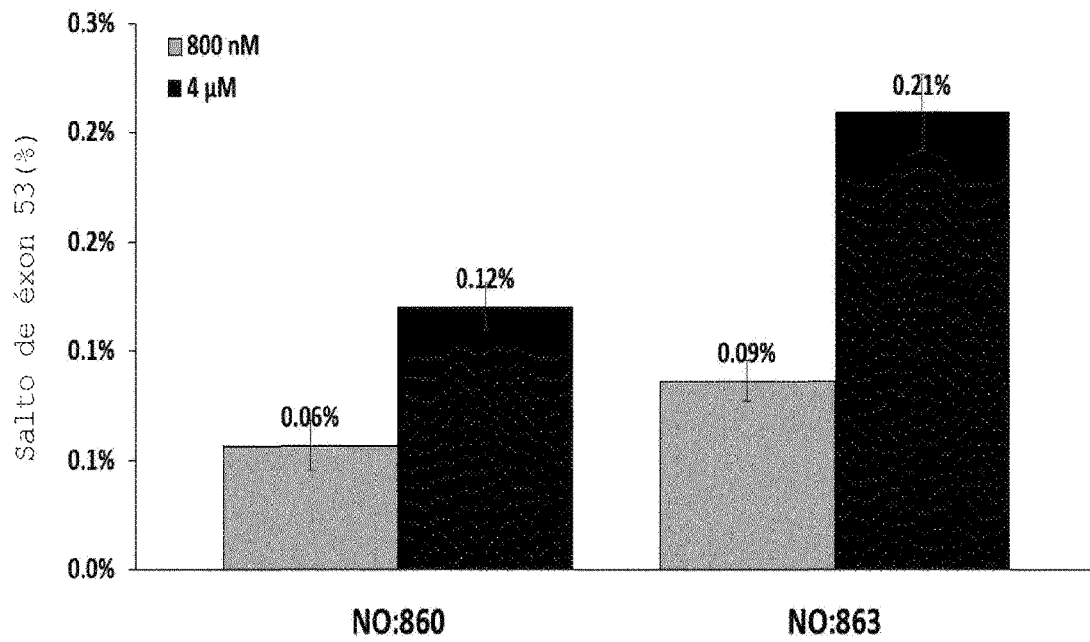


Fig. 5C



Resumo da Patente de Invenção para: "COMUTAÇÃO E MODULAÇÃO DE SPLICING DE PRÉ-MRNA COMPREENDENDO PORÇÕES DE ARCABOUÇO BICÍCLICO, COM CARACTERÍSTICAS MELHORADAS PARA O TRATAMENTO DE DISTÚRBIOS GENÉTICOS"

A presente invenção fornece oligonucleotídeos de comutação de splicing antissentido com características melhoradas que intensificam a aplicabilidade clínica para tratamento, melhoria, prevenção e/ou atraso de distúrbios neuromusculares, tal como DMD.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: Listagem de Sequência N.03.051.PI-BR.txt
- Data de Geração do Código: 03/01/2019
- Hora de Geração do Código: 10:15:09
- Código de Controle:
 - Campo 1: 908A1121533A2251
 - Campo 2: 7FDA24084CA23528