



República Federativa do Brasil  
Ministério do Desenvolvimento, Indústria  
e do Comércio Exterior  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0616250-9 A2**

(22) Data de Depósito: 01/09/2006  
(43) Data da Publicação: 14/06/2011  
(RPI 2110)



\* B R P I O 6 1 6 2 5 0 A 2 \*

(51) *Int.Cl.:*  
C12N 15/11 2006.01  
C07K 14/77 2006.01

(54) Título: **COMPOSTOS ANTAGONISTAS DE RNA PARA A INIBIÇÃO DE EXPRESSÃO DE APO-B100**

(30) Prioridade Unionista: 15/09/2005 US 60/718,018, 27/04/2006 US 60/796,211, 27/04/2006 DK PA2006 00598, 27/04/2006 DK PA2006 00598, 27/04/2006 DK PA2006 00598, 27/04/2006 US 60/796,211

(73) Titular(es): Santaris Pharma A/S

(72) Inventor(es): Bo Hansen, Christoph Rosenbohm, Ellen Marie Straarup, Henrik Frydenlund Hansen, Majken Westergaard

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT DK2006000481 de 01/09/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/031081 de 22/03/2007

(57) Resumo: COMPOSTOS ANTAGONISTAS DE RNA PARA A INIBIÇÃO DE EXPRESSÃO DE APO-B100. A presente invenção refere-se a oligonucleotídeos direcionados contra o gene Apo-B100 são providos para modulação de expressão de Apo-B100. As composições compreendem oligonucleotídeos, particularmente oligonucleotídeos anti-sentido, alvejados para ácidos nucleicos codificando Apo-B100. Métodos de utilização destes compostos para modulação de expressão de Apo-B100 e para o tratamento de doenças associadas com superexpressão de Apo-B100, expressão de Apo-B100 com mutação ou ambas são providos. Exemplos de doenças são câncer tais como cânceres de pulmão, mama, cólon, próstata, pâncreas, pulmão, fígado, tireóide, rim, cérebro, testículos, estômago, intestinos, cordão espinhal, sinos, bexiga, trato urinário ou ovário. Os oligonucleotídeos podem ser compostos por desoxirribonucleosídeos ou um análogo de ácido nucleico tal como por exemplo, ácido nucleico fechado ou uma combinação dos mesmos.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**COMPOSTOS ANTAGONISTAS DE RNA PARA A INIBIÇÃO DE EXPRESSÃO DE APO-B100**".

Campo da Invenção

5 A presente invenção refere-se a composições e processos para modulação de expressão de Apo-B100. Em particular, esta invenção refere-se a compostos oligonucleotídeos que especificamente hibridizam com ácidos nucleicos codificando Apo-B100. Os compostos oligonucleotídeos foram mostrados modularem a expressão de Apo-B100 e suas preparações farmacêuticas e seu uso como tratamento de doenças de câncer são mostradas.

Antecedentes da Invenção

Apolipoproteína B (também conhecida como ApoB, apolipoproteína B-100; ApoB-100, apolipoproteína B-48; ApoB-48 e antígeno Ag(x)), é uma grande glicoproteína que serve um indispensável papel na montagem e secreção de lipídeos e no transporte e tomada mediada por receptor e liberação de distintas classes de lipoproteínas. ApoB desempenha um importante papel na regulação de níveis de lipoproteína circulante, e é por isso relevante em termos de suscetibilidade à aterosclerose que é altamente correlacionada com a concentração ambiente de apolipoproteína B contendo lipoproteínas. Ver Davidson and Shelness (Annul Ver. Nutr., 2000, 20, 169-193) para ainda detalhes das duas formas de ApoB presente em mamíferos, sua estrutura e importância medicinal de ApoB.

Elevados níveis em plasma da ApoB-100 contendo lipoproteína Lp(a) estão associados com aumentado risco para aterosclerose e suas manifestações, que podem incluir hipercolesterolemia (Seed et al., N. Eng. J. Med., 1990, 322, 1494-1499), infartação miocárdial (Sandkamp et al., Clin. Chew., 1990, 36, 20-23), e trombose (Nowak-Gottl et al., Pediatrics, 1997, 99, Eli).

A concentração em plasma de Lp(a) é fortemente influenciada por fatores herdáveis e é refratária a maioria de drogas e manipulação de dieta (Katan and Beynen, Am. J. Epidemiol., 1987, 125, 387-399; Vessby et al., Atherosclerosis, 1982, 44, 61-71). Terapia farmacológica de elevados

níveis de Lp(a) tem sido somente modestamente bem-sucedida e aférese permanece a modalidade terapêutica mais eficaz (Hajjar and Nachman, *Annul Rev. Med.*, 1996, 47, 423-442).

Duas formas de apolipoproteína B existem em mamíferos. ApoB-100 representa a proteína de inteiro comprimento contendo 4536 resíduos de aminoácidos sintetizada exclusivamente no fígado humano (Davidson and Shelness, *Annul Ver. Nutr.*, 2000, 20, 169-193). Uma forma truncada conhecida como ApoB-48 é colinear com os 2152 resíduos terminais amino e é sintetizada no intestino delgado de todos os mamíferos (Davidson and Shelness, *Annul Ver. Nutr.*, 2000, 20, 169-193).

As bases através das quais o gene estrutural comum para apolipoproteína B produz duas isoformas de proteína distintas é um processo conhecido como edição de RNA. Uma reação de edição citosina-para-uracila específica de sítio produz um códon de interrupção UAA e término transducional de apolipoproteína B para produzir Apo-48 (Davidson and Shelness, *Annul Ver. Nutr.*, 2000, 20, 169-193).

A significância medicinal de ApoB de mamífero foi verificada usando estudos de camundongo transgênico tanto superexpressando ApoB humana (Kim and Young, *J. Lipid Res.*, 1998, 39, 703-723; Nishina et al., *J. Lipid Res.*, 1990, 31, 859-869) ou camundongos nocaute ApoB (Farese et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1995, 92, 1774-1778; Kim and Young, *J. Lipid Res.*, 1998, 39, 703-723).

Atualmente, estratégias objetivando inibição de função de apolipoproteína B têm sido limitadas à aferese de Lp(a), anticorpos, fragmentos de anticorpos e ribozimas. Além disso, oligonucleotídeos anti-sentido de baixa bioestabilidade e/ou baixa afinidade de ligação foram mostrados e reivindicados em publicação PCT WO 00/97662, WO 03/11887 e WO 2004/44181.

Conseqüentemente, permanece uma necessidade de adicionais agentes capazes de efetivamente antagonizarem função de apolipoproteína B e conseqüentemente diminuir o nível de Lp(a) em plasma.

A presente invenção provê compostos eficazes oligoméricos Á-

cido Nucléico Fechado (ANF) (LNA) e seu uso em métodos para modulação de expressão de apolipoproteína B, incluindo inibição da isoforma alternativa de apolipoproteína B, ApoB-48.

#### Sumário da Invenção

5                   A presente invenção provê composições e métodos para modulação de expressão de apolipoproteína B (Apo-B100/Apo-B48). Em particular, esta invenção refere-se a compostos oligonucleotídeos sobre específicos motivos alvejando apolipoproteína B. Estes motivos são SEQ ID NOS: 2-26, em particular SEQ ID NOS: 2, 3, 10, 11 e 21. Específicos desenhos de compostos oligonucleotídeos contendo LNA também são mostrados. Compostos especificamente preferidos são SEQ ID NOS: 29-47, em particular SEQ ID NOS: 29, 30, 31, 36, 37, 38, 40 e 42. Os compostos da invenção são potentes inibidores de mRNA de apolipoproteína e expressão de proteína. In vitro, SEQ ID NOS: 29 e 30 regularam descendentemente expressão de ApoB  
10 com IC<sub>50</sub> ao redor de 1-5 nM, e SEQ ID NO 37 mostrou uma IC<sub>50</sub> de cerca de 0,5 nM. In vivo, a expressão de mRNA de ApoB-100 foi suprimida no fígado e jejuno seguindo tratamento com SEQ ID NO: 29 em uma maneira dependente de droga. Concomitante com reduzidos níveis de ApoB-100, o colesterol total em plasma foi reduzido por 70%.

20                   Composições farmacêuticas e outras compreendendo os compostos oligonucleotídeos da invenção também são providas. São ainda providos processos de modulação de expressão de apolipoproteína B em células ou tecidos compreendendo contato das ditas células ou tecidos com um ou mais compostos ou composições de oligonucleotídeos da invenção.  
25 Também são mostrados métodos de tratamento de um animal ou um ser humano, suspeito de ter ou sendo propenso a uma doença ou condição, associada com expressão de apolipoproteína B através de administração de uma quantidade terapêutica ou profilaticamente eficaz de um ou mais dos compostos ou composições de oligonucleotídeos da invenção. Ainda, métodos de uso de compostos oligonucleotídeos para a inibição de expressão de  
30 apolipoproteína B e para tratamento de doenças associadas com atividade de apolipoproteína B são providos. Exemplos de tais doenças são diferentes

tipos de desequilíbrio de colesterol HDL/LDL; dislipidemias, por exemplo, hiperlipidemia combinada familiar (FCHL), hiperlipidemia adquirida, hipercolesterolemia; hipercolesterolemia resistente à estatina; doença de artéria coronária (CAD), doença de coração de coronária (CHD), aterosclerose.

#### 5 Breve Descrição das Figuras

Figura 1A: Expressão relativa de mRNA de ApoB em hepatócitos de camundongo (células Hepa1-6) seguindo tomada auxiliada com lipídeo de SEQ ID NO: 29, siRNA (não-modificado) ou siRNA modificado com colesterila.

10 Figura 1B: Expressão relativa de ApoB em células BNLCL2 seguindo tratamento com SEQ ID NOS: 29 e 30. Ambos compostos são potentes inibidores do mRNA de ApoB-100 já em 1 nM ou 5 nM de concentração.

Figura 2A: Expressão de mRNA de ApoB-100 relativa seguindo tratamento (dosagem diária i.v. por três dias) com SEQ ID NO: 29, siRNA  
15 (não-modificado) (SEQ ID NOS: 48/49) ou siRNA modificado com colesterila (SEQ ID Nos: 50/49) em fígados.

Figura 2B: expressão relativa de mRNA de ApoB-100 seguindo tratamento (dosagem diária i.v por três dias com SEQ ID NO: 29, siRNA  
20 (não-modificado) (SEQ ID NOS: 48/49) ou siRNA modificado com colesterila (SEQ ID NOS: 50/49) em jejuno.

Figura 3: Níveis relativos de colesterol em plasma de camundongos tratados com SEQ ID NO: 29, siRNA (não-modificado) (SEQ ID NOS: 48/49) ou siRNA modificado colesterila (SEQ ID NOS: 50/49).

Figura 4: ApoB-100 in vitro alveja regulação descendente em células Hepa 1-6 ou BNCL. Efeito de resposta de dose de SEQ ID NOS: 29 e  
25 27 sobre o nível de mRNA de ApoB (normalizado para GapDH) a partir de linhas de células de camundongos.

Figura 5A: Silenciamento de ApoB-100 in vivo no fígado seguindo tratamento com LNA anti-sentido de camundongos C57BL/6. As moléculas anti-sentido de LNA foram dosadas uma dose (6,25, 12,5 ou 25 mg/kg) e o siRNA (50 mg/kg) 3 dias consecutivos em camundongos C57BL/6. Expressão de ApoB-100 foi medida por qPCR e normalizada para Gapdh. Da-  
30

dos representam média +/- DP (n = 7).

Figura 5B: Silenciamento de ApoB-100 in vivo em jejuno seguindo tratamento com LNA anti-sentido de camundongos C57BL/6. As moléculas de LNA anti-sentido foram dosadas uma dose (6,25, 12,5 ou 25 mg/kg) e o siRNA (50 mg/kg) 3 dias consecutivos em camundongos C57BL/6 camundongos. Expressão de ApoB-100 foi medida por qPCR e normalizada para Gapdh. Dados representam média +/- DP (n = 7).

Figura 6A: Níveis de colesterol em plasma seguindo tratamento com LNA anti-sentido. As moléculas de LNA anti-sentido foram dosadas uma dose (6,25, 12,5 ou 25 mg/kg) e o siRNA (50 mg/kg) 3 dias consecutivos em camundongos C57BL/6. Níveis de colesterol – LDL foram determinados usando um kit colorimétrico. Dados representam média +/- DP (n = 7).

Figura 6B: níveis de colesterol em plasma seguindo tratamento com LNA anti-sentido. Moléculas de LNA anti-sentido foram dosadas uma dose (6,25, 12,5 ou 25 mg/kg) e o siRNA (50 mg/kg) 3 dias consecutivos em camundongos C57BL/6. Níveis de colesterol total em plasma foram determinados usando um kit colorimétrico. Dados representam média +/- DP (n = 7).

Figura 7: Mostra a comparação de seqüência do comprimento reverso das seqüências preferidas do ácido nucléico alvo de ApoB, que foram usadas para desenhar compostos oligoméricos de acordo com a invenção.

Figura 8: Resposta de dose e seleção in vitro (1,5 ou 25 nM) em células Huh-7 (hepatócitos) tratadas com diferentes oligonucleotídeos de LNA anti-sentido e o efeito dos oligonucleotídeos medido como regulação descendente de mRNA (ApoB-100) alvo (QPCR).

Figura 9: IC50 (a concentração de oligonucleotídeo anti-sentido para obter 50% de inibição de expressão alvo (ApoB-100)) para 7 oligonucleotídeos LNA anti-sentido selecionados, medida em células Huh-7 analisadas por QPCR.

Figura 10A: Níveis de mRNA ApoB-100 medidos no fígado no sacrifício dia 28. Camundongos C57BL/6 foram dosados tanto duas vezes por semana com 2,5 mg/kg/dose (total de 8 doses) ou uma vez por semana

5 mg/kg (total de 4 doses) por 4 semanas.

Figura 10B: Níveis de LDL em plasma medidos uma vez por semana por 4 semanas em sangue retro orbital. Camundongos C57BL/6 foram dosados tanto duas vezes por semana com 2,5 mg/kg/dose (total de 8 doses) como uma vez por semana com 5 mg/kg (total de 4 doses) por 4 semanas.

Figura 11A: Duração de ação medida como níveis de mRNA ApoB-100 no fígado no sacrifício dia 3, 5, 8, 13 ou 21. Camundongos C57BL/6 foram dosados uma, duas ou três doses de 25 mg/kg/dose de SEQ ID NO: 37 uma dose em cada um de 1, 2 ou 3 dias consecutivos, respectivamente.

Figura 11B: Colesterol total em plasma medido no dia de sacrifício 3, 5, 8, 13 ou 21. Camundongos fêmeas C57BL/6 foram dosados com uma, duas ou 3 doses de 25 mg/kg/dose de SEQ ID NO: 37, uma dose cada dia em um, dois ou três dias consecutivos, respectivamente.

#### Descrição Detalhada da Invenção

A presente invenção emprega compostos oligoméricos, particularmente oligonucleotídeos anti-sentido, para uso em modulação de função de moléculas de ácido nucléico codificando apolipoproteína B (tal como ApoB100 e/ou ApoB-48). A modulação é por último uma mudança na quantidade de apolipoproteína B produzida. Em uma modalidade isto é realizado através de provimento de compostos oligoméricos, que especificamente hibridizam com ácidos nucléicos, tal como RNA mensageiro, que codificam apolipoproteínaB. A modulação preferivelmente resulta na inibição da expressão de apolipoproteína B, isto é, conduz a uma diminuição no número de proteínas funcionais produzidas.

A Figura 1 demonstra que siRNA e oligonucleotídeos anti-sentido de fita única compreendendo análogos de nucleotídeo LNA são potentes na mesma faixa nano molar in vitro. Entretanto, in vivo os oligonucleotídeos LNA anti-sentido de 16-mer da invenção são superiores a ambos, siRNA conjugado com colesterol e não-modificado.

As Figuras 2A e 2B mostram oligonucleotídeos LNA da invenção

que são até 8 vezes mais potentes que siRNA conjugado com colestera in vivo (cfr.). Oligonucleotídeos LNA diminuíram colesterol total em plasma de camundongo enquanto tratamento com siRNA não (Figura 3). Além disso, oligonucleotídeos LNA são mais bioestáveis que siRNA.

5 Compostos oligoméricos, que modulam expressão do alvo, são identificados através de experimentação ou através de desenho racional baseado em informação de seqüência sobre o alvo e conhecimento de como  
10 melhor desenhar um composto oligonucleotídeo contra um desejado alvo. As seqüências destes compostos são modalidades preferidas da invenção. Da mesma maneira, os motivos de seqüências no alvo ao qual estes compostos oligoméricos preferidos são complementares (referidos como "pontos quentes") são preferidos sítios para serem alvo.

#### Compostos oligoméricos e compostos oligonucleotídeos

Os termos "composto oligomérico", que são usados intercambiavelmente com o termo "oligonucleotídeo", "oligo", e "composto oligonucleotídeo", referem-se, no contexto da presente invenção, a um oligômero, isto é, um polímero de ácido nucléico (por exemplo, ácido ribonucléico (RNA) ou ácido desoxirribonucléico (DNA)) ou análogo de ácido nucléico daqueles conhecidos na técnica, preferivelmente ácido nucléico fechado (locked) (LNA),  
15 ou uma mistura dos mesmos). Este termo inclui oligonucleotídeos compostos por núcleo-bases ocorrendo naturalmente, açúcares e ligações internucleosídeo (cadeia principal) assim como oligonucleotídeos tendo porções ocorrendo não-naturalmente que funcionam similarmente ou com específicas funções aperfeiçoadas. Oligonucleotídeos modificados ou substituídos inteira  
20 ou parcialmente são freqüentemente preferidos sobre formas nativas devido a várias desejáveis propriedades de tais oligonucleotídeos, tal como, por exemplo, a habilidade de penetrar uma membrana de célula, boa resistência a nucleases extra e intracelulares, alta afinidade e especificidade para o alvo ácido nucléico. O análogo de LNA é particularmente preferido, por exemplo,  
25 com relação às propriedades mencionadas acima. Por isso, em uma modalidade altamente preferível, os termos "composto oligomérico", "oligonucleotídeo", "oligo" e "composto oligonucleotídeo" de acordo com a invenção, são  
30

compostos que são construídos por ambas unidades de análogos de nucleotídeos e nucleotídeos, tais como unidades de LNA para formação de um composto polimérico de entre 12-50 nucleotídeos/análogos de nucleotídeos (oligômero).

5 Pelo termo "unidade" é entendido um monômero.

Os compostos oligoméricos da invenção são capazes de hibridizarem tanto para a fita de RNA(s) mensageiro de apolipoproteína B e/ou a de DNA de apolipoproteína B (Apo-B) de mamífero sentido ou complementar. Acesso NCBI N<sup>o</sup> NM\_000384 provê uma seqüência de mRNA para apolipoproteína B humana. É altamente preferível que o composto oligomérico da invenção seja capaz de hibridizar para a apolipoproteína humana codificada pelo ácido nucléico mostrado em acesso NCBI N<sup>o</sup> NM\_000384, ou seu complemento reverso, incluindo em uma modalidade preferida, alvos ácido nucléico mRNA derivados da dita apolipoproteína humana.

15 Em uma modalidade preferida, os oligonucleotídeos são capazes de hibridizarem contra o ácido nucléico alvo, tal como um mRNA ApoB, para formar um dúplex com uma T<sub>m</sub> de pelo menos 37°C, tal como pelo menos 40°C, pelo menos 50°C, pelo menos 55°C, ou pelo menos 60°C. Em um aspecto a T<sub>m</sub> está entre 37°C e 80°C, tal como entre 50 e 70°C.

#### 20 Medição de T<sub>m</sub>

Uma solução 3 µM do composto em fosfato de sódio 10 mM/NaCl 100 mM/EDTA 0,1 nM, pH 7,0 é misturada com seu oligonucleotídeo RNA ou DNA complemento em uma concentração de 3 µM em fosfato de sódio 10 mM/NaCl 100 mM/EDTA 0,1 nM, pH 7,0 a 90°C por um minuto e deixado resfriar para temperatura ambiente. A curva de fusão do dúplex é então determinada através de medição de absorvância em 260 nm com uma taxa de aquecimento de 1°C/minuto na faixa de 25 a 95°C. A T<sub>m</sub> é medida como o máximo do primeiro derivado da curva de fusão.

Os compostos oligoméricos são preferivelmente compostos oligoméricos anti-sentido, também referidos como 'oligonucleotídeos anti-sentido' e 'inibidores anti-sentido'.

Tais inibidores anti-sentido, são compostos que compreendem

seqüências de nucleotídeos/análogos de nucleotídeos complementares para o ácido nucléico alvo, e podem tomar a forma de "siRNA", "miRNA", "ribozimas", "oligozimas". Entretanto, preferivelmente, os inibidores anti-sentido são oligonucleotídeos de fita única. Os oligonucleotídeos de fita única são preferivelmente complementares à correspondente região do ácido nucléico alvo.

Tipicamente, oligonucleotídeos 'anti-sentido' de fita única interagem especificamente com o mRNA do gene alvo, causando degradação alvejada do mRNA, por exemplo, via o mecanismo RnaseH, ou de outro modo prevenindo tradução.

Em uma modalidade, o composto oligomérico de acordo com a invenção pode alvejar o DNA codificando ApoB de mamífero, tal como a fita de DNA sentido ou anti-sentido. siRNAs são conhecidos serem capazes de interagirem com DNA alvo.

O composto oligomérico de acordo com a invenção preferivelmente compreende pelo menos três análogos de nucleotídeos. Os pelo menos três análogos de nucleotídeos são preferivelmente análogos de nucleotídeos ácido nucléico fechado, e o composto oligomérico que compreende tais análogos de nucleotídeos são aqui referidos como "composto oligomérico LNA", "composto oligonucleotídeo LNA" e "oligonucleotídeo LNA".

Apropriadamente, os termos "composto oligonucleotídeo", "composto oligomérico", "composto oligomérico LNA", de acordo com a invenção, são oligonucleotídeos, como aqui definidos, que podem induzir um desejado efeito terapêutico em seres humanos através de, por exemplo, ligação através de ligação de hidrogênio a um ácido nucléico alvo.

A invenção é direcionada a um composto oligomérico, tal como um oligonucleotídeo, consistindo em 8-50, tal como 10-50, em particular 12-50 ou 12-25, nucleotídeos e/ou análogos de nucleotídeos, onde o dito composto compreende uma subseqüência de pelo menos 8, por exemplo, pelo menos 10, tal como pelo menos 12, tal como pelo menos 14, tal como pelo menos 15, tal como 14, 15, 16 ou 17, nucleotídeos ou análogos de nucleotídeos, a dita subseqüência estando localizada dentro (isto é, correspondendo

a) uma seqüência da seqüência alvo de ácido nucléico, Apo-B100 e/ou Apo-B48. Os análogos de nucleotídeos são análogos de seus respectivos nucleotídeos das seqüências de SEQ ID NOS: 2-26, em particular SEQ ID NOS: 2, 3, 10, 11 e 21. Assim, a subseqüência do composto da invenção está localizada dentro (isto é, corresponde a) uma seqüência selecionada do grupo consistindo em SEQ ID NOS: 2-26, em particular SEQ ID NOS: 2, 3, 10, 11 e 21, ou compreende análogos dos nucleotídeos dentro da seqüência de SEQ ID NOS: 2-26, em particular SEQ ID NO: 2, 3, 10, 11, e 21.

Grupos preferidos de seqüências nos quais a subseqüência do composto está localizada dentro (ou a subseqüência compreende análogos dos nucleotídeos dentro) incluem SEQ ID NO: 2 & 3; SEQ ID NO: 2 & 3; SEQ ID NO: 10 & 11; SEQ ID NO: 21.

Em uma modalidade, o grupo de seqüências no qual a subseqüência do composto está localizada dentro (ou a subseqüência compreende análogos dos nucleotídeos dentro) SEQ ID NO: 3.

Em uma modalidade, o grupo de seqüências no qual a subseqüência do composto está localizado dentro (ou a subseqüência compreende análogos dos nucleotídeos dentro) uma seqüência selecionada do grupo consistindo em: SEQ ID NO: 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 27, 28, 48 e 50.

Em uma modalidade interessante, o composto da invenção compreende de 8-50 nucleotídeos, onde o dito composto compreende uma subseqüência de pelo menos 8 nucleotídeos, a dita subseqüência sendo localizada dentro de uma seqüência selecionada do grupo consistindo em SEQ ID NO: 2 e 3, onde pelo menos um nucleotídeo é substituído com um correspondente análogo de nucleotídeo e onde a extremidade 3' compreende nucleotídeo, antes que um análogo de nucleotídeo.

Em modalidades do composto da invenção compreendendo de 8-50 nucleotídeos, onde o dito composto compreende uma subseqüência de pelo menos 8 nucleotídeos, a dita subseqüência estando localizada dentro de uma seqüência selecionada do grupo consistindo em SEQ ID NOS: 2 e 3 e os ditos nucleotídeos compreendendo análogos de nucleotídeos LNA, a

subseqüência tipicamente pode compreender uma extensão de 2-6 LNAs, como aqui definido, seguida por uma extensão de 4-12 nucleotídeos, que é seguida por uma extensão de 2-6 LNAs, como aqui definida.

Os termos "localizado dentro" e "correspondendo a"/"corresponde a" referem-se à comparação entre a seqüência combinada de nucleotídeos e análogos de nucleotídeos do composto oligomérico da invenção, ou sua subseqüência, e a seqüência de nucleotídeos equivalente de i) o complemento reverso da seqüência de ácidos nucléicos de Apolipoproteína B (isto é, o alvo ácido nucléico), e/ou ii) a seqüência de nucleotídeos provida no grupo consistindo em SEQ ID NOS: 2-26, 59-67 respectivamente (isto é, um motivo de seqüência), ou em uma modalidade os seus complementos reversos. Análogos de nucleotídeos são comparados diretamente a seus nucleotídeos equivalentes.

A subseqüência pode compreender pelo menos 8, tal como pelo menos 9, tal como pelo menos 10, tal como pelo menos 11, tal como pelo menos 12, tal como pelo menos 13, tal como pelo menos 14, tal como pelo menos 15, tal como pelo menos 16, tal como pelo menos 17, tal como pelo menos 18, tal como pelo menos 19, ou pelo menos 20 nucleotídeos ou análogos de nucleotídeos que correspondem a um número equivalente de nucleotídeos consecutivos presentes em um ácido nucléico selecionado do grupo consistindo em: SEQ ID NOS: 63, 64, 65, 66, 67 e 68. (Ver Figura 7).

Preferivelmente, pelo menos 3 análogos de nucleotídeos estão localizados dentro da dita subseqüência, opcionalmente como uma seqüência consecutiva de pelo menos 3 análogos de nucleotídeos, tal como uma seqüência consecutiva de 3, 4, 5 ou 6 análogos de nucleotídeos.

Em uma modalidade preferida o composto oligomérico consiste somente em uma subseqüência, isto é, a inteira seqüência do composto oligomérico é encontrada na correspondente seqüência, tal como uma seqüência selecionada do grupo consistindo em SEQ ID NOS: 2-26 e 59-62.

Preferivelmente, não existem nucleotídeos ou análogos de nucleotídeos que formam um desemparelhamento quando correlacionados à correspondente região da seqüência alvo de ApoB, isto é, todos os nucleotí-

deos e análogos de nucleotídeos presentes no oligômero da invenção são capazes de formarem emparelhamento de bases consecutivos com a seqüência alvo de ácido nucléico de ApoB.

Entretanto, em uma modalidade pode existir um desemparelhamento ou dois desemparelhamentos dentro de uma subseqüência e a seqüência alvo de ácido nucléico. Quando ocorrem desemparelhamentos, pode ser preferido que eles não estejam presentes entre um análogo de nucleotídeo e a seqüência alvo.

Entretanto, em um 'gap' de um 'gapmer', que seja capaz de recrutar RnaseH, desemparelhamentos podem conduzir a perda da habilidade para recrutar RnaseH. Tipicamente, 5 ou 6 nucleotídeos complementares são requeridos para assegurar suficiente atividade de RnaseH.

Em uma modalidade preferível o composto oligonucleotídeo de acordo com a invenção compreende uma seqüência que corresponde à SEQ ID NO 59 e/ou SEQ ID NO 60, onde a dita subseqüência pode, opcionalmente, compreender um ou dois desemparelhamentos.

Em uma modalidade, o composto oligonucleotídeo de acordo com a invenção compreende uma seqüência que corresponde à SEQ ID NO: 61 e/ou 62, onde a dita subseqüência pode, opcionalmente, compreender um ou dois desemparelhamentos.

Em uma modalidade preferível da invenção, a subseqüência compreende pelo menos 8, tal como pelo menos 10, ou pelo menos 12, tal como pelo menos 14, tal como 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 nucleotídeos ou análogos de nucleotídeos que estão localizados dentro (isto é, correspondendo a) do número equivalente de nucleotídeos consecutivos em SEQ ID NO: 63, onde a dita subseqüência pode, opcionalmente, compreender um ou dois desemparelhamentos.

Ainda em modalidades da invenção, a subseqüência compreende pelo menos 8, tal como pelo menos 10, ou pelo menos 12, tal como pelo menos 14, tal como entre 14 e 20, tal como 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 nucleotídeos ou análogos de nucleotídeos que estão localizados dentro (isto é, correspondendo a) do número equivalente de nucleotídeos consecutivos em

uma seqüência de nucleotídeos selecionada do grupo consistindo em SEQ ID NO: 64, 65, 66, 67 e 68, onde a dita subseqüência pode, opcionalmente, compreender um ou dois desemparelhamentos.

5 Em uma modalidade, o composto oligomérico de acordo com a invenção é um oligonucleotídeo de fita dupla, onde cada fita compreende (ou consiste em) um total de 16-30 nucleotídeos e/ou análogos de nucleotídeos. Deve ser entendido que uma fita do complexo de fita dupla (oligonucleotídeo) corresponde ao composto oligonucleotídeo aqui definido, e que a outra fita é um oligonucleotídeo tendo uma seqüência complementar.

10 O total de, por exemplo, 8-50 nucleotídeos e/ou análogos de nucleotídeos é pretendido significar 8-50 nucleotídeos ou 8-50 análogos de nucleotídeos ou uma combinação dos mesmos não excedendo um total combinado de 50 unidades nucleosídeos.

15 Os compostos preferivelmente consistem em 12-25 nucleotídeos ou análogos de nucleotídeos, tal como 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, ou 24 nucleotídeos ou análogos de nucleotídeos, tal como entre 15 e 22 nucleotídeos ou análogos de nucleotídeos, tal como entre 14 e 18 nucleotídeos ou análogos de nucleotídeos, mais preferido 15 ou 16 nucleotídeos ou análogos de nucleotídeos.

20 No presente contexto, os termos "nucleosídeo" e "nucleotídeo" são usados em seu significado normal. Por exemplo, ele contém uma unidade de 2-desoxirribose que é ligada através de seu carbono número um a uma das bases nitrogenadas adenina (A), citosina (C), timina (T) ou guanina (G).

25 Em uma maneira similar, o termo "nucleotídeo" significa, por exemplo, em uma modalidade preferida quando relacionado ao composto da invenção o termo "nucleotídeo" refere-se a uma unidade 2-desoxirribose que é ligada através de seu átomo de carbono número um a uma das bases nitrogenada adenina (A), citosina (C), timina (T) ou guanina (G), e que é ligada através de seu átomo de carbono número cinco a um fosfato internucleosídeo (ou em uma modalidade um equivalente, tal como um grupo fosforotioato), ou a um grupo terminal. Um nucleotídeo também pode, por exemplo, em  
30 uma modalidade compreender uma unidade ribose, tal como um nucleotídeo

## RNA.

Quando aqui usado, o termo "análogo de nucleotídeo" refere-se a um nucleotídeo ocorrendo não-natural, por exemplo, em uma modalidade preferida, tanto a unidade ribose é diferente de 2-desoxirribose e/ou a base nitrogenada é diferente de A, C, T e G e/ou o grupo de ligação fosfato internucleosídeo é diferente. Exemplos específicos de análogos de nucleosídeos são descritos, por exemplo, em Freier & Altmann; Nucl. Acid Res., 1997, 25, 4429-4443, e Uhlmann; Curr. Opinion in Drug Development, 2000, 3(2), 293-213, e em Esquemas 1.

Os termos "correspondente nucleosídeo/análogo de nucleotídeo" e "correspondente nucleosídeo/nucleotídeo" são pretendidos indicar que a base nitrogenada no nucleosídeo/análogo de nucleotídeo e o nucleosídeo/nucleotídeo é idêntica. Por exemplo, quando a unidade 2-desoxirribose do nucleotídeo está ligada a uma adenina, o "correspondente análogo nucleosídeo" contém uma unidade pentose (diferente de 2-desoxirribose) ligada a uma adenina.

O termo "ácido nucléico" é definido como uma molécula formada por uma ligação covalente de dois ou mais nucleotídeos. Os termos "ácido nucléico" e "polinucleotídeo" são aqui usados intercambiavelmente. Por exemplo, DNA e RNA são ácidos nucléicos.

O termo "análogo de ácido nucléico" refere-se a um composto ligando ácido nucléico ocorrendo não-naturalmente, isto é, em uma modalidade preferida um composto, tal como uma seqüência de pelo menos um nucleotídeo e pelo menos um análogo de nucleotídeo, tal como uma unidade LNA. Tais compostos não são encontrados naturalmente dentro do organismo mamífero (ou, em uma modalidade não foram publicamente conhecidos serem encontrados dentro de organismo mamífero no momento da invenção).

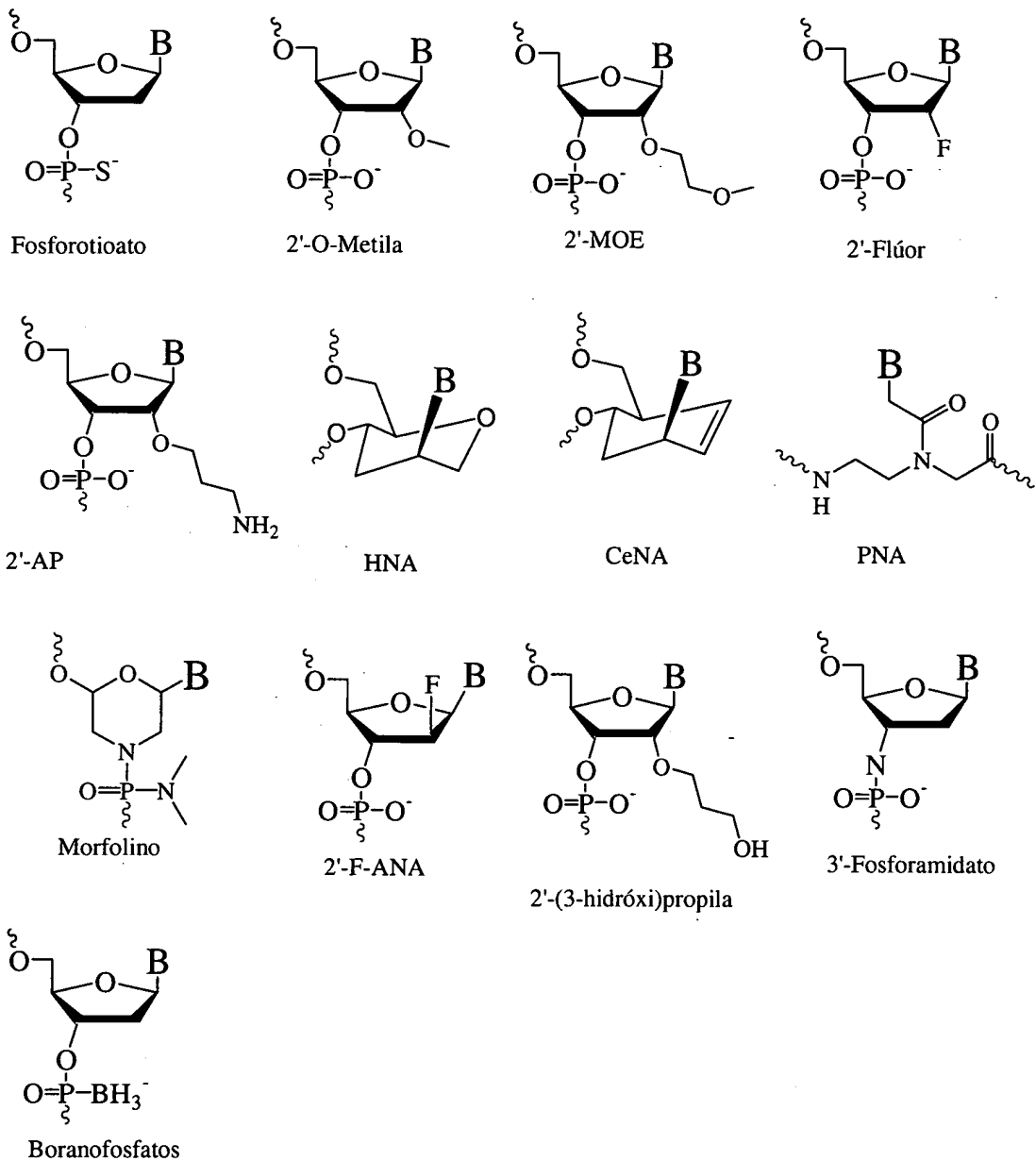
Um análogo de nucleotídeo preferido é LNA, tal como beta-D-óxi-LNA, alfa-L-óxi-LNA, beta-D-amino-LNA e beta-D-tio-LNA, mais preferido beta-D-óxi-LNA. Os compostos da invenção são tipicamente aqueles onde os ditos nucleotídeos compreendem um grupo de ligação selecionado do

grupo consistindo em um grupo fosfato, um grupo fosforotioato, e um grupo boranofosfato, a ligação internucleosídeo pode ser  $-O-P(O)_2-O-$ ,  $-O-P(O,S)-O-$ , em particular um grupo fosfato e/ou um grupo fosforotioato. Em uma modalidade particular, todos os nucleotídeos compreendem um grupo fosforotioato. Em uma modalidade, alguns ou todos os nucleotídeos são ligados uns aos outros por meio de um grupo fosforotioato. Apropriadamente, todos os nucleotídeos são ligados uns aos outros por meio de um grupo fosforotioato.

Os nucleotídeos são tipicamente ligados uns aos outros por meio do grupo de ligação.

10 Análogos de nucleotídeos e análogos de ácidos nucléicos são descritos em, por exemplo, Freier & Altmann (Nucl. Acid Res., 1997, 25, 4429-4443) e Uhlmann (Curr. Opinion in Drug & Development (2000, 3(2): 293-213). Esquemas 1 e 2 ilustram exemplos selecionados de análogos de nucleotídeos apropriados para obtenção de ácidos nucléicos:

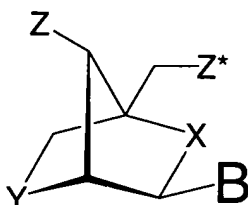
## Esquema 1



Em uma modalidade interessante, os compostos compreendem de 3-12 análogos de nucleotídeos, por exemplo, 6 ou 7 análogos de nucleotídeos. Nas modalidades mais preferidas, pelo menos um dos ditos análogos de nucleotídeos é um ácido nucléico fechado (locked) (LNA), tal como pelo menos dois, ou pelo menos 3 ou pelo menos 4, ou pelo menos 5, ou pelo menos 6, ou pelo menos 7, ou pelo menos 8, ou pelo menos 9, ou pelo menos 10, ou pelo menos 11, dos análogos de nucleotídeos podem ser LNA, em uma modalidade todos os análogos de LNA podem ser LNA.

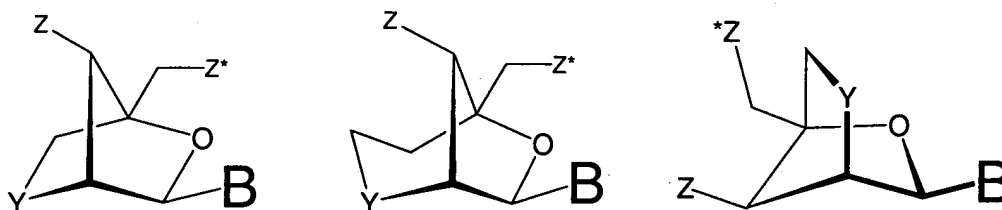
um análogo de nucleotídeo bicíclico, também referido como um monômero LNA.

O termo "LNA" quando usado no contexto de "oligonucleotídeos LNA" refere-se a um oligonucleotídeo contendo um ou mais análogos nucleosídeos bicíclicos. O ácido nucléico fechado (LNA) usado nos compostos oligonucleotídeos da invenção tem a estrutura da fórmula geral



X e Y são selecionados independentemente entre os grupos -O-, -S-, -N(H)-, N(R)-, -CH<sub>2</sub> ou -CH- (se parte de uma ligação dupla), -CH<sub>2</sub>-O-, -CH<sub>2</sub>S-, -CH<sub>2</sub>N(H)-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub> ou -CH<sub>2</sub>-CH- (se parte de uma ligação dupla), -CH=CH-, onde R é selecionado de hidrogênio e C<sub>1-4</sub> alquila; Z e Z\* são selecionados independentemente entre uma ligação internucleosídeo, um grupo terminal ou um grupo de proteção; B constitui uma nucleobase natural ou não-natural; e os grupos assimétricos podem ser encontrados em qualquer orientação.

15 Preferivelmente, o ácido nucléico fechado (LNA) usado no composto oligonucleotídeo da invenção compreende pelo menos uma unidade ácido nucléico fechado (LNA) de acordo com qualquer uma das fórmulas



onde Y é -O-, -S-, -NH-, ou N(R<sup>H</sup>); Z e Z\* são selecionados independentemente entre uma ligação internucleosídeo, um grupo terminal ou um grupo de proteção; B constitui uma nucleobase natural ou não-natural, e R<sup>H</sup> é selecionado de hidrogênio e C<sub>1-4</sub> alquila.

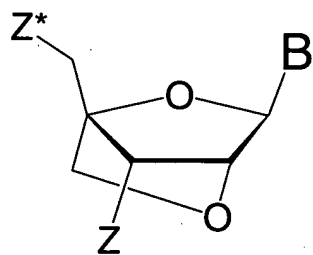
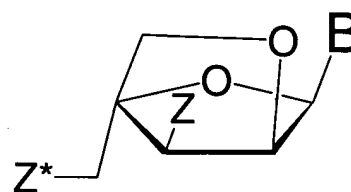
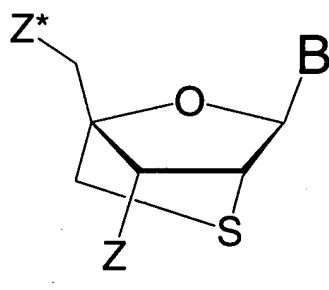
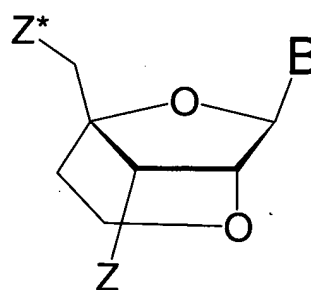
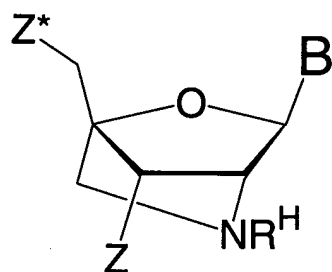
20 Preferivelmente, o ácido nucléico fechado (LNA) usado no composto oligonucleotídeo da invenção compreende ligações internucleosídeo selecionadas do grupo consistindo em -O-P(O)<sub>2</sub>-O-, -O-P(O,S)-O-, -O-

$P(S)_2-O-$ ,  $-S-P(O)_2-O-$ ,  $-S-P(O,S)-O-$ ,  $-S-P(S)_2-O-$ ,  $-O-P(O)_2-S-$ ,  $-O-P(O,S)-S-$ ,  $-S-P(O)_2-S-$ ,  $-O-PO(R^H)-O-$ ,  $O-PO(OCH_3)-O-$ ,  $-O-PO(NR^H)-O-$ ,  $-O-PO(O-CH_2CH_2S-R)-O-$ ,  $-O-PO(BH_3)-O-$ ,  $-O-PO(NHR^H)-O-$ ,  $-O-P(O)_2-NR^H-$ ,  $-NR^H-P(O)_2-O-$ ,  $-NR^H-CO-O-$ , onde  $R^H$  é selecionado de hidrogênio e  $C_{1-4}$  alquila.

- 5 Como estabelecido, em uma modalidade interessante da invenção, os compostos oligonucleotídeos contêm pelo menos uma unidade de química chamada LNA (ácido nucléico fechado)

Unidades LNA especificamente preferidas são mostradas em esquema 2.

10

Esquema 2 $\beta$ -D-óxi-LNA $\alpha$ -L-óxi-LNA $\beta$ -D-tio-LNA $\beta$ -D-ENA $\beta$ -D-amino-LNA

O termo "tio-LNA" compreende um nucleotídeo fechado no qual pelo menos um de X e Y na fórmula geral acima é selecionado de S ou  $-CH_2-S-$ . Tio-LNA pode estar em ambas configurações beta-D e alfa-L.

O termo "amino-LNA" compreende um nucleotídeo fechado no qual pelo menos um de X ou Y na fórmula geral acima  $-N(H)-$ ,  $N(R)-$ ,  $CH_2-N(R)-$  onde R é selecionado de hidrogênio e  $C_{1-4}$  alquila. Amino-LNA pode estar em ambas configurações beta-D e alfa-L.

5 O termo "óxi-LNA" compreende um nucleotídeo fechado no qual pelo menos um de X ou Y na fórmula geral acima representa  $-O-$  ou  $-CH_2-O-$ . Óxi-LNA pode estar em ambas configurações beta-D e alfa-L.

O termo "ena-LNA" compreende um nucleotídeo fechado no qual Y na fórmula geral acima é  $-CH_2-O-$  (onde o átomo de oxigênio de  $-CH_2-O-$  está ligado à posição 2' em relação à núcleo base B).

10 Em uma modalidade preferida LNA é selecionado de beta-D-óxi-LNA, alfa-L-óxi-LNA, beta-D-amino-LNA e beta-D-tio-LNA, em particular beta-D-óxi-LNA. Os nucleosídeos e/ou LNAs são tipicamente ligados juntos por meio de grupos fosfato e/ou por meio de grupos fosforotioato.

15 O termo "pelo menos um" compreende os inteiros maiores que ou iguais a 1, tal como 1,2,3,4,5,6,7,8,9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 e assim por diante.

20 Como aqui usado, o termo "ácido nucléico alvo" abrange DNA codificando a Apo-B100, RNA (incluindo pré-mRNA e mRNA e mRNA edit) transcrito de tal DNA, e também cADN derivado de tal RNA.

A "proteína alvo" é apolipoproteína B mamífera, preferivelmente apolipoproteína B humana. Será reconhecido que como ApoB-100 e ApoB-48 ambas originam da mesma seqüência genética, que os compostos oligoméricos de acordo com a invenção podem ser usados para regulação descendente de qualquer, ou ambas as formas de apolipoproteína B, e ambos mRNA codificando ApoB-100, e a forma editada de RNA, que codifica Apo-B48.

30 Como aqui usado, o termo "gene" significa o gene incluindo éxons, íntrons, regiões 5' e 3' não-codificantes e elementos reguladores e todas suas variantes correntemente conhecidas e ainda quaisquer variantes, que possam ser elucidadas.

Como aqui usado, o termo "mRNA" significa o transcrito(s) de

mRNA presentemente conhecido de um gene alvejado, e ainda quaisquer transcritos, que possam ser identificados.

Como aqui usado, o termo "modulação" significa tanto um aumento (estimulação) como uma diminuição (inibição) na expressão de um gene. Na presente invenção, inibição é a forma preferida de modulação de expressão de gene e mRNA é o alvo preferido.

Como aqui usado, o termo "alvejando" um composto anti-sentido para um particular ácido nucléico alvo significa provendo o oligonucleotídeo anti-sentido para a célula, animal ou humana de modo que o composto anti-sentido seja capaz de se ligar e modular a função de seu alvo pretendido.

Um análogo de nucleotídeo preferido é LNA.

Ainda um análogo de nucleotídeo preferido é onde a ligação fosfato internucleosídeo é um fosforotioato.

Ainda um análogo nucleotídeo preferido é onde o nucleotídeo é LNA com uma ligação fosforotioato internucleosídeo.

Em uma modalidade interessante, a extremidade 3' do composto da invenção compreende um nucleotídeo, antes que um análogo de nucleotídeo.

Preferivelmente, o composto oligomérico, tal como um oligonucleotídeo anti-sentido, de acordo com a invenção compreende pelo menos uma unidade ácido nucléico fechado (LNA), tal como 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ou 10 unidades ácido nucléico fechado (LNA), preferivelmente 4 a 9 unidades LNA, tal como 6-9 unidades LNA, mais preferivelmente 6, 7 ou 8 unidades LNA. Preferivelmente as unidades LNA compreendem pelo menos uma unidade beta-D-óxi-LNA tal como 4, 5, 6, 7, 8, 9, ou 10 unidades beta-D-óxi-LNA. Todas as unidades LNA podem ser unidades beta-D-óxi-LNA, embora seja considerado que os compostos oligoméricos, como o oligonucleotídeo anti-sentido, podem compreender mais de um tipo de unidade LNA. Apropriadamente, o composto oligomérico pode compreender ambos, beta-D-óxi-LNA e uma ou mais de uma das seguintes unidades LNA: tio-LNA, amino—LNA, óxi-LNA, ena-LNA e/ou alfa-LNA em qualquer das configurações D-beta ou L-alfa ou suas combinações.

Em uma modalidade do composto da invenção que compreende análogos nucleotídeos, tais como análogos de nucleotídeos LNA, a subsequência tipicamente pode compreender um estiramento de 2-6 análogos de nucleotídeos, tais como análogos de nucleotídeos LNA, como aqui definidos, seguido por um estiramento de 4-12 nucleotídeos, que é seguido por um estiramento de 2-6 análogos de nucleotídeos, tais como os análogos de nucleotídeos de LNA, como aqui definidos.

Subseqüências compreendendo um estiramento de análogos de nucleotídeos, tais como análogos de nucleotídeos de LNA, seguido por um estiramento de nucleotídeos, seguido por um estiramento de análogos de nucleotídeos LNAs são conhecidos como gapmers.

Apropriadamente, em uma modalidade de tal "gapmer", a dita subsequência compreende um estiramento de 4 análogos de nucleotídeos, como análogos de nucleotídeos LNA, como aqui definidos, seguido por um estiramento de 8 nucleotídeos, que é seguido por um estiramento de 4 análogos de nucleotídeos, tais como análogos de nucleotídeos LNA como aqui definidos, opcionalmente com um nucleotídeo simples na extremidade 3'.

Ainda em uma modalidade 'gapmer', a dita subsequência compreende um estiramento de 3 análogos de nucleotídeos, tais como análogos de nucleotídeos LNA, como aqui definidos, seguido por um estiramento de 9 nucleotídeos, que é seguido por um estiramento de 3 análogos de nucleotídeos, tais como análogos de nucleotídeos LNA aqui definidos, opcionalmente com um nucleotídeo simples na extremidade 3'. Um tal desenho foi surpreendentemente verificado ser muito eficaz.

Ainda em uma modalidade "gapmer", a dita subsequência compreende um estiramento de 4 análogos de nucleotídeos, tais como análogos de nucleotídeos LNA, como aqui definidos, seguido por um estiramento de 8 nucleotídeos, que é seguido por um estiramento de 3 análogos de nucleotídeos, tais como análogos de nucleotídeos LNA como aqui definidos, opcionalmente com um nucleotídeo simples na extremidade 3'.

Preferivelmente, o composto oligomérico, tal como um oligonucleotídeo anti-sentido, pode compreender ambas unidades LNA e DNA. Pre-

ferivelmente o total combinado de unidades LNA e DNA está entre 14-20, tal como entre 15-18, mais preferivelmente 16 ou 17 unidades LNA/DNA. Preferivelmente a razão de LNA para DNA presente no composto oligomérico da invenção está entre 0,3 e 1, mais preferivelmente entre 0,4 e 0,9, tal como  
5 entre 0,6 e 0,8.

Preferivelmente o composto oligomérico, tal como oligonucleotídeo anti-sentido, de acordo com a invenção é um gapmer, compreendendo uma seqüência de polinucleotídeo de fórmula (5' para 3'), A-B-C (e opcionalmente D), onde; A (região 5') consiste ou compreende pelo menos uma  
10 unidade LNA, tal como entre 1-6 unidades LNA, preferivelmente entre 2-5 unidades LNA, mais preferivelmente 4 unidades LNA e; B (domínio central), preferivelmente imediatamente 3' para A, consiste ou compreende pelo menos uma unidade açúcar DNA, tal como 1-12 unidades DNA, preferivelmente entre 4-12 unidades DNA, mais preferivelmente entre 6-10 unidades DNA,  
15 tal como entre 7-9 unidades DNA, mais preferivelmente 8 unidades DNA, e; C (região 3') preferivelmente imediatamente 3' para B, consiste ou compreende pelo menos uma unidade LNA, tal como entre 1-6 unidades LNA, preferivelmente entre 2-5 unidades LNA, mais preferivelmente 4 unidades LNA. Desenhos de gapmer preferidos são mostrados no WO2004/046160.

20 Em um oligonucleotídeo gapmer, é preferível que quaisquer desemparelhamentos não estejam dentro do domínio central (C) acima, que preferivelmente compreende ou consiste em unidades DNA. Para digestão RNase H é tipicamente verificado pelo menos 5 nucleotídeos consecutivos (ou análogos que são capazes de recrutarem RnaseH para o híbrido oligo/alvo) são requeridos no domínio central. Por isso, para gapmers, onde o  
25 domínio central excede 5 nucleotídeos consecutivos, é imaginado que um, ou possivelmente dois desemparelhamentos podem ser aceitáveis, embora não preferível.

Em uma modalidade de oligonucleotídeos gapmer, pode ser preferido que quaisquer desemparelhamentos estejam localizados na direção dos terminis 5' ou 3' do gapmer. Em uma tal modalidade, é preferido que em  
30 um oligonucleotídeo gapmer que compreende desemparelhamentos com o

mRNA alvo, que tais desemparelhamentos estejam localizados em regiões 5' e/ou 3', e/ou os ditos desemparelhamentos estejam entre a unidade nucleotídeo terminal 5' ou 3' do dito oligonucleotídeo gapmer e molécula alvo.

5 Em uma modalidade, dentro do composto oligomérico de acordo com a invenção, tal como um oligonucleotídeo anti-sentido, que compreende LNA, todos os resíduos C LNA são 5'-metil citosina.

Em uma modalidade particularmente interessante, o composto tem a fórmula 5'-[(LNA)<sub>3-4</sub>-(DNA/RNA)<sub>8-9</sub>-(LNA)<sub>3</sub>-(DNA/RNA)<sub>1</sub>]-3' onde "LNA" designa um nucleotídeo LNA e "DNA" e "RNA" designam um desoxirribonucleotídeo e um ribonucleotídeo, respectivamente.

10

Mais particularmente, o composto pode ser selecionado do grupo consistindo em SEQ ID NOS: 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46 e 47. Compostos preferidos podem ser selecionados do grupo consistindo em SEQ ID NOS: 29, 30, 31, 32, 36, 37, 38, 40, 41 e 42, ou do grupo consistindo em SEQ ID NO: 30 e 31, e/ou do grupo consistindo em SEQ ID NOS: 36, 37 e 38, e/ou do grupo consistindo em SEQ ID NO: 41 e 42. Correntemente compostos mais preferidos são aqueles selecionados do grupo consistindo em SEQ ID NO: 29, 30 e 37.

15

Apropriadamente, os ditos nucleotídeos e/ou ditos LNAs podem ser ligados por meio de grupos fosfato e/ou grupos fosforotioatos ou suas combinações.

20

Em uma modalidade, os ditos nucleotídeos e/ou ditos LNAs são preferivelmente ligados por meio de grupos fosforotioatos.

Em uma modalidade, a invenção provê um composto oligonucleotídeo compreendendo ou consistindo em SEQ ID NO: 29.

25

Em uma modalidade, a invenção provê um composto oligonucleotídeo compreendendo ou consistindo em SEQ ID NO: 30.

Em uma modalidade, a invenção provê um composto oligonucleotídeo compreendendo ou consistindo em SEQ ID NO: 31.

Em uma modalidade, a invenção provê um composto oligonucleotídeo compreendendo ou consistindo em SEQ ID NO: 32.

30

Em uma modalidade, a invenção provê um composto oligonu-

cleotídeo compreendendo ou consistindo em SEQ ID NO: 33.

Em uma modalidade, a invenção provê um composto oligonucleotídeo compreendendo ou consistindo em SEQ ID NO: 34.

5 Em uma modalidade, a invenção provê um composto oligonucleotídeo compreendendo ou consistindo em SEQ ID NO: 35.

Em uma modalidade, a invenção provê um composto oligonucleotídeo compreendendo ou consistindo em SEQ ID NO: 36.

Em uma modalidade, a invenção provê um composto oligonucleotídeo compreendendo ou consistindo em SEQ ID NO: 37.

10 Em uma modalidade, a invenção provê um composto oligonucleotídeo compreendendo ou consistindo em SEQ ID NO: 38.

Em uma modalidade, a invenção provê um composto oligonucleotídeo compreendendo ou consistindo em SEQ ID NO: 39.

15 Em uma modalidade, a invenção provê um composto oligonucleotídeo compreendendo ou consistindo em SEQ ID NO: 40.

Em uma modalidade, a invenção provê um composto oligonucleotídeo compreendendo ou consistindo em SEQ ID NO: 41.

Em uma modalidade, a invenção provê um composto oligonucleotídeo compreendendo ou consistindo em SEQ ID NO: 42.

20 Em uma modalidade, a invenção provê um composto oligonucleotídeo compreendendo ou consistindo em SEQ ID NO: 43.

Em uma modalidade, a invenção provê um composto oligonucleotídeo compreendendo ou consistindo em SEQ ID NO: 44.

25 Em uma modalidade, a invenção provê um composto oligonucleotídeo compreendendo ou consistindo em SEQ ID NO: 45.

Em uma modalidade, a invenção provê um composto oligonucleotídeo compreendendo ou consistindo em SEQ ID NO: 46.

Em uma modalidade, a invenção provê um composto oligonucleotídeo compreendendo ou consistindo em SEQ ID NO: 47.

30 Em uma modalidade, quando o oligonucleotídeo de acordo com a invenção é um oligonucleotídeo RNA, tal como SEQ ID NOS: 48, 49, 50 ou 51, o terminal 3' contém duas unidades ribonucleotídeo modificada com 2'-

O-metila coligadas, imediatamente adjacentes ao ribonucleotídeo terminal.

Preparação de compostos oligonucleotídeos

Os blocos de construção de análogo de nucleotídeo LNA ( $\beta$ -D-óxi-LNA,  $\beta$ -D-tio-LNA,  $\beta$ -D-amino-LNA e  $\alpha$ -L-óxi-LNA) podem ser preparados seguindo procedimentos e referências publicadas citadas, ver, por exemplo, WO 03/095467 A1; D.S. Pedersen, C. Rosenbohm, T. Koch (2002) Preparation of LNA Phosphoramidites, *Synthesis* 6, 802-808; M.D. Sorensen, L. Kvaerno, T. Bryld, A.E. Hakansson, B. Verbeure, G. Gaubert, P. Herdewijn, J. Wengel (2002)  $\alpha$ -L-ribo-configured Locked Nucleic Acid ( $\alpha$ -L-LNA): Synthesis and Properties, *J. Am. Chem. Soc.*, 124, 2164-2176; S.K. Singh, R. Kumar, J. Wengel (1998) Synthesis of Novel Bicyclo[2.2.1]Ribonucleosides: 2'-Amino- and 2'-Thio-LNA Monomeric Nucleosides, *J. Org. Chem.* 1998, 63, 6078-6079; C. Rosenbohm, S.M. Christensen, M.D. Sorensen, D.S. Pedersen, L.E. Larsen, J. Wengel, T. Koch (2003) Synthesis of 2'-amino-LNA: a new strategy, *Org. Biomol. Chem.* 1, 655-663; e WO 2004/069991 A2.

Um particular exemplo de um monômero LNA timidina é (1S,3R,4R,7S)-7-hidróxi-1-hidróxi metil-3-(timin-1-il)-2,5-dioxa biciclo[2: 2: 1] heptano.

Os oligonucleotídeos LNA podem ser preparados como descrito nos Exemplos e nos WO 99/14226, WO 00/56746, WO 00/56748, WO 00/66604, WO 00/125248, WO 02/28875, WO 2002/094250 e WO 03/006475. Assim, os oligonucleotídeos LNA podem ser produzidos usando as técnicas de oligomerização de química de ácido nucléico bem conhecidas por aqueles versados na técnica de química orgânica. Geralmente, ciclos de oligomerização padrão da abordagem fosforamídito (S.L. Beaucage e R.P. Iyer, *Tetrahedron*, 1993, 49, 6123; S. L. Beaucage e R.P. Iyer, *Tetrahedron*, 1992, 48, 2223) são usados, mas, por exemplo, química H-fosfonato, química fosfotriéster também podem ser usadas.

Para alguns monômeros, tempo de acoplamento mais longo, e/ou repetidos acoplamentos e/ou uso de reagentes de acoplamento mais concentrados pode ser necessário ou benéfico.

Os fosforamíditos empregados acoplam tipicamente com satisfa-

tórios rendimentos em etapas de >95%. Oxidação do fosforoso (III) a fosforoso (V) é normalmente feita com por exemplo, iodo/piridina/H<sub>2</sub>O. Isto rende após desproteção a ligação internucleosídeo fósforo diéster nativa. No caso de uma ligação internucleosídeo fosforotioato ser preparada uma etapa de tiolação é realizada através de troca de oxidação normal, por exemplo, iodo/piridina/H<sub>2</sub>O usada para síntese de ligações internucleosídeo fósforo diéster com uma oxidação usando o reagente ADTT (hidreto de xantano (0,01 M em acetonitrila : piridina 9: 1; v/v)). Outros reagentes de tiolação também são possíveis de serem usados, tal como Beaucage e PADS. Os oligonucleotídeos LNA fosforotioato foram eficientemente sintetizados com rendimentos de acoplamento em etapas  $\geq 98\%$ .

Oligonucleotídeos LNA compreendendo  $\beta$ -D-amino-LNA,  $\beta$ -D-tio-LNA, e/ou  $\alpha$ -L-LNA também podem ser eficientemente sintetizados com rendimentos de acoplamento em etapas  $\geq 98\%$  usando os procedimentos fosforamidito.

Purificação de oligonucleotídeos LNA pode ser realizada usando cartuchos de purificação de fase reversa descartáveis e/ou HPLC de fase reversa e/ou precipitação a partir de etanol ou butanol. Eletroforese de gel capilar, HPLC de fase reversa, MALDI-MS, e ESI-MS foram usados para verificar a pureza dos oligonucleotídeos LNA sintetizados. Sais

Os oligonucleotídeos LNA podem ser empregados em uma variedade de sais farmacologicamente aceitáveis. Como aqui usado, o termo refere-se a sais que retêm a desejada atividade biológica do oligonucleotídeo LNA e exibem mínimos efeitos toxicológicos indesejados. Exemplos de não-limitantes de tais sais podem ser formados com aminoácidos orgânicos e sais de adição de base formados com cátions metálicos tais como zinco, cálcio, bismuto, bário, magnésio, alumínio, cobre, cobalto, níquel, cádmio, sódio, potássio e semelhantes, ou com um cátion formado a partir de amônia, N,N-dibenzil etileno diamina, D-glucosamina, tetra etil amônio, ou etilenodiamina; ou combinações, por exemplo, um sal tanato de zinco ou semelhantes.

Tais sais são formados, a partir de oligonucleotídeos LNA que

possuem grupo fósforo diéster e/ou grupos fosforotioato, e são, por exemplo, sais com bases apropriadas. Estes sais incluem, por exemplo, sais de metais não-tóxicos que são derivados de metais de grupos Ia, Ib, IIa, e IIb do Sistema Periódico dos Elementos, em particular sais de metais alcalinos apropriados, por exemplo, sais de lítio, sódio ou potássio, ou sais de metais alcalino-terrosos, por exemplo, sais de magnésio ou cálcio. Eles além disso incluem sais de zinco e amônio e também sais que são formados com apropriadas aminas orgânicas, tais como mono-, di- ou trialquil aminas não-substituídas ou substituídas com hidroxila, em particular mono-, di- ou trialquil aminas, ou com compostos amônio quaternários, por exemplo, com N-metil-N-etil amina, dietilamina, trietilamina, mono-, bis- ou tris-(2-hidróxi alquil inferior) aminas, tais como mono-, bis- ou tris-(2-hidróxi etil) amina, 2-hidróxi-t-butil amina ou tris(hidróxi metil) metil amina, N,N-d-alkil inferior-N-(hidróxi alquil inferior) aminas, tais como N,N-dimetil-N-(2-hidróxi etil) amina ou tri(2-hidróxi etil) amina, ou N-metil-D-glucamina, ou compostos de amônio quaternário como sais de tetra butil amônio. Sais de lítio, sais de sódio, sais de magnésio, sais de zinco ou sais de potássio são preferidos, com sais de sódio sendo particularmente preferidos.

#### Pró-drogas

Em uma modalidade, o oligonucleotídeo LNA pode estar na forma de uma pró-droga. Oligonucleotídeos são por virtude íons carregados negativamente. Devido à natureza lipofílica de membranas de células, a tomada celular de oligonucleotídeos é reduzida comparada a equivalentes neutros ou lipofílicos. Este "impedimento" de polaridade pode ser evitado através do uso de abordagem de pró-droga (ver, por exemplo, Crooke, R.M. (1998) em Crooke, S.T. Antisense research and Application. Springer-Verlag, Berlin, Germany, vol. 131, pp. 103-140). Nesta abordagem, os oligonucleotídeos LNA são preparados em uma maneira protegida de modo que os oligonucleotídeos LNA são neutros quando administrados. Estes grupos de proteção são desenhados de modo que eles podem ser removidos quando o oligonucleotídeo LNA é tomado pelas células. Exemplos de tais grupos de proteção são S-acetil tioetila (SATE) ou S-pivaloil tio etila (t-butil-SATE). Es-

tes grupos de proteção são resistentes à nuclease e são seletivamente removidos intracelularmente.

### Conjugados

5 Ainda um aspecto da invenção refere-se a um conjugado compreendendo o composto como definido aqui pelo menos uma metade não-nucleotídeo ou não-polinucleotídeo ligada covalentemente ao dito composto.

Em um aspecto relacionado da invenção, o composto da invenção é ligado a ligantes de modo a formar um conjugado, os ditos ligantes pretendidos para aumento de tomada celular do conjugado em relação aos  
10 oligonucleotídeos anti-sentido.

Os compostos ou conjugados da invenção também podem ser conjugados ou ainda conjugados a substâncias drogas ativas, por exemplo, aspirina, ibuprofeno, uma droga sulfa, um agente de diminuição de colesterol, um agente antidiabético, um agente antibacteriano, um agente quimioterapêutico, ou um antibiótico.  
15

No presente contexto, o termo "conjugado" é pretendido indicar uma molécula heterogênea formada através de ligação covalente de um oligonucleotídeo LNA como aqui descrito (isto é, um composto compreendendo uma seqüência de nucleosídeos e análogos de nucleosídeos LNA) a uma ou  
20 mais metades não-nucleotídeos ou não-polinucleotídeo.

Assim, os oligonucleotídeos LNA podem, por exemplo, ser conjugados ou formarem quimera com metades não-nucleotídeo ou não-polinucleotídeo incluindo ácidos nucléicos peptídeo (PNA), proteínas (por exemplo, anticorpos para uma proteína alvo), macromoléculas, substâncias  
25 drogas de baixo peso molecular, cadeias de ácidos graxos, resíduos de açúcar, glicoproteínas, polímeros (por exemplo, polietileno glicol), grupos de formação de micelas, anticorpos, carboidratos, grupos de ligação de receptor, esteróides como colesterol, polipeptídeos, agentes intercalantes como um derivado de acridina, um álcool de cadeia longa, um dendrímero, um fosfolípídeo, e outros grupos lipofílicos ou suas combinações, etc., justo como  
30 os oligonucleotídeos podem ser arranjados em estruturas diméricas ou dendríticas. Os oligonucleotídeos LNA ou conjugados também podem ser conju-

gados ou ainda conjugados a substâncias drogas ativas, por exemplo, aspirina, ibuprofeno, uma droga sulfa, um antidiabético, um agente antibacteriano, um composto quimioterapêutico ou um antibiótico.

5 Conjugação desta maneira confere propriedades vantajosas com relação às características fármaco-cinéticas dos oligonucleotídeos LNA. Em particular, conjugação desta maneira obtém aumentada tomada celular.

Em uma modalidade, um oligonucleotídeo LNA é ligado a ligantes de modo a formar um conjugado, os ditos ligantes pretendidos para aumento de tomada celular do conjugado em relação aos oligonucleotídeos LNA anti-sentido. Esta conjugação pode ocorrer nas posições terminais 5'/3'-OH, mas os ligantes também podem tomar lugar nos açúcares e/ou as bases. Em particular, o fator de crescimento ao qual o oligonucleotídeo LNA anti-sentido pode ser conjugado, pode compreender transferrina ou folato. Complexos de transferrina – polilisina – oligonucleotídeo ou complexos de folato – polilisina – oligonucleotídeo podem ser preparados para tomada por células expressando altos níveis de receptor transferrina ou folato. Outros exemplos de conjugados/ligantes são metades colesterol, intercaladores dúplex como acridina, poli-L-lisina, "capeamento de extremidade" com um ou mais grupos de ligação resistentes à nuclease como fósforo mono tioato, e  
10  
15  
20 semelhantes.

A preparação de complexos de transferrina como veículos de tomada de oligonucleotídeo em células é descrita por Wagner et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 3410-3414 (1990). Liberação celular de conjugados de float – macromolécula via endocitose de receptor de float, incluindo liberação de um oligonucleotídeo anti-sentido, é descrita por Low et al., Patente US 5 108 921. Ver também, Leamon et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 88, 5572 (1991).

#### Composição Farmacêutica

Um aspecto particularmente interessante da invenção é direcionado a uma composição farmacêutica compreendendo um composto como aqui definido ou um conjugado como aqui definido, e um diluente, veículo ou adjuvante farmacêuticamente aceitável. Em uma modalidade particularmente  
30

interessante, a composição farmacêutica é adaptada para administração oral.

Instruções para a preparação de composições farmacêuticas podem ser encontradas em "Remington: The Science and Practice of Pharmacy" por Alfonso R. Gennaro, e no que se segue.

Deve ser entendido que a presente invenção também é particularmente relevante para uma composição farmacêutica, que compreende pelo menos uma construção de oligonucleotídeo anti-sentido da invenção como um ingrediente ativo. Deve ser entendido que a composição farmacêutica de acordo com a invenção opcionalmente compreende um veículo farmacêutico, e que a composição farmacêutica opcionalmente ainda compreende compostos anti-sentido, agentes quimioterapêuticos, agentes de diminuição de colesterol, compostos antiinflamatórios, compostos antivirais, e/ou compostos de imunomodulação.

Como estabelecido, a composição farmacêutica da invenção ainda pode compreender pelo menos um composto terapêutico/profilático. O composto é tipicamente selecionado do grupo consistindo em resinas de seqüestro de sal de bile (por exemplo, colestiramina, colestipol e cloridrato de colesvelam), inibidores de HMGCoA-redutase (por exemplo, lovastatina, cerivastatina, prevastatina, atorvastatina, simvastatina, e fluvastatina), ácido nicotínico, derivados de ácido fíbrico (por exemplo, clofibrato, gemfibrozil, fenofibrato, bezafibrato, e ciprofibrato), probucol, neomicina, dextrotiroxina, ésteres de estanol de planta, inibidores de absorção de colesterol (por exemplo, ezetimibe), implitapide, inibidores de transportadores de ácido de bile (transportadores de ácido de bile dependentes de sódio apical), reguladores de CYP7a hepático, terapêuticos de substituição de estrogênio (por exemplo, tamoxifen), e antiinflamatórios (por exemplo, glucocorticóides).

O composto oligonucleotídeo ou conjugado compreendido nesta invenção pode ser empregado em uma variedade de sais farmacêuticamente aceitáveis. Como usado aqui, o termo refere-se a sais que retêm a desejada atividade biológica dos compostos aqui identificados e exibem mínimos indesejados efeitos toxicológicos, cf. "Conjugados".

Em uma modalidade da invenção, o composto ou conjugado oligonucleotídeo pode estar na forma de uma pró-droga, cf. "Pró-drogas".

A invenção também inclui a formulação de um ou mais composto ou conjugado oligonucleotídeo como aqui mostrado. Agentes de ligação e adjuvantes farmacologicamente aceitáveis podem compreender parte da droga formulada. Cápsulas, comprimidos e pílulas, etc., podem conter por exemplo os seguintes compostos: celulose microcristalina, goma ou gelatina como ligantes; amido ou lactose como excipientes; estearatos como lubrificantes; vários agentes adoçantes ou aromatizantes. Para cápsulas a unidade de dosagem pode conter um veículo líquido como óleos graxos. Da mesma maneira revestimentos de açúcar ou agentes entéricos podem ser parte da dosagem unitária. As formulações de oligonucleotídeos também podem ser emulsões dos ingredientes farmacêuticos ativos e um lipídeo formando uma emulsão micelular. Tais formulações são particularmente úteis para administração oral.

Um oligonucleotídeo da invenção pode ser misturado com qualquer material que não prejudique a ação desejada, ou com material que suplementa a desejada ação. Estes podem incluir outras drogas incluindo outros compostos nucleotídeos.

Para administração parenteral, subcutânea, intradérmica ou tópica, a formulação pode incluir um diluente estéril, tampões, reguladores de tonicidade e antibacterianos. O composto ativo pode ser preparado com veículos que protejam contra degradação ou imediata eliminação do corpo, incluindo implantes ou microcápsulas com propriedades de liberação controlada. Para administração intravenosa os veículos preferidos são solução salina fisiológica ou solução salina tamponada com fosfato.

Preferivelmente, um composto oligonucleotídeo é incluído em uma formulação unitária tal como em um veículo ou diluente farmacologicamente aceitável em uma quantidade suficiente para liberar para um paciente uma quantidade terapêuticamente eficaz sem causar sérios efeitos colaterais no paciente tratado.

As composições farmacêuticas da presente invenção podem ser

administradas em um número de maneiras dependendo de se é desejado tratamento local ou sistêmico e da área a ser tratada. Administração pode ser (a) oral (b) pulmonar, por exemplo, através de inalação ou insuflação de pulverizados ou aerossóis, incluindo através de nebulizador; intratraqueal, intranasal, (c) tópica incluindo epidérmica, transdérmica, oftálmica e para membranas de mucosa incluindo liberação vaginal e retal; ou (d) injeção ou infusão parenteral incluindo intravenosa, intra-arterial, subcutânea, intraperitoneal, ou intramuscular; ou intracranial, por exemplo, administração intratecal ou intraventricular. Em uma modalidade o oligonucleotídeo LNA ativo é administrado IV, IP, oralmente, topicamente ou como uma injeção de quantidade relativamente grande ou administrado diretamente para o órgão alvo.

Composições e formulações farmacêuticas para administração tópica podem incluir emplastos transdérmicos, pomadas, loções, loções, cremes, géis, gotas, espargimentos, supositórios, líquidos e pulverizados. Veículos farmacêuticos convencionais, aquosos, pulverizados ou bases oleosas, espessantes e semelhantes podem ser necessários ou desejáveis. Conservantes revestidos, luvas e semelhantes também podem ser úteis. Formulações tópicas preferidas incluem aquelas nas quais os oligonucleotídeos da invenção estão em mistura com um agente de liberação tópica como lipídeos, lipossoma, ácidos graxos, ésteres de ácido graxo, esteróides, agentes quelantes e tensoativos.

Composições e formulações para administração oral incluem, mas não são restritos a pulverizados ou grânulos, micropartículas, nanopartículas, suspensões ou soluções em água ou meios não-aquosos, cápsulas, cápsulas de gel, sachês, comprimidos ou minicomprimidos. Tipicamente,

Composições e formulações para administração parenteral, intratecal ou intraventricular podem incluir soluções aquosas estéreis que também podem conter tampões, diluentes e outros aditivos apropriados tais como, mas não limitado a, aperfeiçoadores de penetração, compostos veículos e outros veículos ou excipientes farmacêuticamente aceitáveis.

Composições farmacêuticas da presente invenção incluem, mas não são limitadas a, soluções, emulsões, e formulações contendo liposso-

mas. Estas composições podem ser geradas a partir de uma variedade de componentes que incluem, mas não são limitados a, líquidos pré-formados, sólidos de auto-emulsificação e semi-sólidos de auto-emulsificação. Liberação de droga para tecido de fígado pode ser aperfeiçoada por liberação mediada por veículo incluindo, mas não limitado a, lipossomas catiônicas, ciclo dextrinas, derivados de porfirina, dendrímeros de cadeia ramificada, polímeros polietileno imina, nanopartículas e microesferas (DassCR. J Pharm Pharmacol 2002; 54(1): 3-27).

As formulações farmacêuticas da presente invenção, que podem ser convenientemente apresentadas em forma de dosagem unitária, podem ser preparadas de acordo com técnicas convencionais bem conhecidas na indústria farmacêutica. Tais técnicas incluem a etapa de colocação em associação os ingredientes ativos com o veículo(es) ou excipiente(s) farmacêutico. Em geral, as formulações são preparadas colocando em associação uniforme e íntima os ingredientes ativos com veículos líquidos ou veículos sólidos finamente divididos ou ambos, e então, se necessário, conformando o produto.

As composições da presente invenção podem ser formuladas em qualquer uma de muitas possíveis formas de dosagem como, mas não limitado a, comprimidos, cápsulas, cápsulas de gel, xaropes líquidos, géis moles, e supositórios. As composições da presente invenção também podem ser formuladas como suspensões em meios aquosos, não-aquosos ou mistos. Suspensões aquosas ainda podem conter substâncias que aumentam a viscosidade da suspensão incluindo, por exemplo, sódio carbóxi metil celulose, sorbitol e/ou dextrano. A suspensão também pode conter estabilizantes.

Compostos oligonucleotídeos contendo LNA são úteis para um número de aplicações terapêuticas como indicado acima. Em geral, métodos terapêuticos da invenção incluem administração de uma quantidade terapêuticamente eficaz de um oligonucleotídeo modificado com LNA a um mamífero, particularmente um ser humano.

Em uma certa modalidade, a presente invenção provê composi-

ções farmacêuticas contendo (a) um ou mais compostos anti-sentido e (b) um ou mais outros agentes de diminuição de colesterol que funcionam através de um mecanismo não-anti-sentido. Quando usados com os compostos da invenção, tais agentes de diminuição de colesterol podem ser usados individualmente (por exemplo, atorvastatina e oligonucleotídeo), seqüencialmente (por exemplo, atorvastatina e oligonucleotídeo por um período de tempo seguido por um outro agente e oligonucleotídeo), ou em combinação com um ou mais outros tais agentes de diminuição de colesterol. Todos os agentes de diminuição de colesterol conhecidos por aqueles versados na técnica são aqui incorporados como tratamentos combinação com composto de acordo com a invenção.

Drogas antiinflamatórias, incluindo, mas não limitado a drogas antiinflamatórias não-esteroidais e corticosteróides, drogas antivirais, e drogas de imunomodulação também podem ser combinadas em composições da invenção. Dois ou mais compostos combinados podem ser usados juntos ou seqüencialmente.

Em uma outra modalidade, composições da invenção podem conter um ou mais compostos anti-sentido, particularmente oligonucleotídeos, alvejados para um primeiro ácido nucléico e um ou mais compostos adicionais anti-sentido alvejados para um segundo ácido nucléico alvo. Dois ou mais compostos combinados podem ser usados juntos ou seqüencialmente.

Dosagem é dependente da severidade e capacidade de resposta do estado de doença a ser tratado, e o curso de tratamento demorando de vários dias a vários meses, ou até uma cura ser efetuada ou uma diminuição do estado de doença ser obtida. Ótimos esquemas de dosagem podem ser calculados a partir de medições de acumulação de droga no corpo do paciente.

Dosagens ótimas podem variar dependendo da relativa potência de oligonucleotídeos individuais. Geralmente elas podem ser estimadas baseado em  $EC_{50}$ s verificadas serem eficazes in vitro e in vivo em modelos animais. Em geral, dosagem é de 0,01  $\mu$ g a 1 g por kg de peso de corpo, e

pode ser dada uma vez ou mais ao dia, semanalmente, mensalmente ou anualmente, mesmo uma vez cada 2 a 10 anos ou através de infusão contínua por horas até vários meses. As taxas de repetição para dosagem podem ser estimadas baseado em tempos de residência medidos e concentrações da droga em fluidos ou tecidos corpóreos. Seguindo tratamento bem-sucedido, pode ser desejável se ter o paciente sofrendo terapia de manutenção para prevenir a recorrência do estado de doença.

#### Processo de tratamento

Aqueles versados na técnica apreciarão que compostos oligonucleotídeos contendo LNA podem ser usados para combate de doenças ligadas à apolipoproteína B (Apo-B100) através de muitos princípios diferentes, que assim caem dentro do espírito da presente invenção.

Os compostos oligonucleotídeos LNA podem ser desenhados como siRNAs que são pequenas moléculas de RNA de fita dupla que são usadas por células para silenciar específicos genes endógenos ou exógenos através de um mecanismo "semelhante a anti-sentido" ainda pouco entendido.

Foi mostrado que  $\beta$ -D-óxi-LNA não suporta atividade RnaseH. Entretanto, isto pode ser alterado de acordo com a invenção através de criação de oligonucleotídeos quiméricos compostos por  $\beta$ -D-óxi-LNA e DNA, chamado gapmers. Um gapmer é baseado em um estiramento central de 4-12 nt DNA ou monômeros modificados reconhecíveis e cliváveis pela (RnaseH (o hiato) tipicamente flanqueada por 1 a 6 resíduos de  $\beta$ -óxi-LNA (os flancos). Os flancos também podem ser construídos com derivados de LNA. Existem outros constructos quiméricos de acordo com a invenção que são capazes de atuar via um mecanismo mediado por RnaseH. Um "headmer" é definido por um estiramento contíguo de  $\beta$ -D-óxi-LNA ou derivados de LNA na extremidade-5' seguido por um estiramento contíguo de DNA ou monômeros modificados reconhecíveis e cliváveis pela RnaseH na direção da extremidade 3', e um "tailmer" é definido por um estiramento contínuo de DNA ou monômeros modificados reconhecíveis e cliváveis pela RnaseH na extremidade 5' seguido por um estiramento contíguo de  $\beta$ -D-óxi-LNA ou derivados

- de LNA na direção de extremidade 3'. Outras quimeras de acordo com a invenção, chamadas "mixmers" consistindo em uma composição alternativa de DNA ou monômeros modificados reconhecíveis e cliváveis por RnaseH e  $\beta$ -D-óxi-LNA e/ou derivados de LNA também podem ser capazes de mediar
- 5 ligação e clivagem mediadas por RnaseH. Uma vez que  $\alpha$ -L-LNA recruta atividade RnaseH em uma certa extensão, menores hiatos de DNA ou monômeros modificados reconhecíveis e cliváveis pela RnaseH para a construção de gapmer podem ser requeridos, e mais flexibilidade na construção mixmer pode ser introduzida.
- 10 A eficácia clínica de oligonucleotídeos anti-sentido depende em uma significativa extensão de suas fármaco-cinéticas, por exemplo, absorção, distribuição, tomada celular, metabolismo e excreção. Por sua vez estes parâmetros são significativamente guiados pela química subjacente e o tamanho e estrutura tridimensional do oligonucleotídeo.
- 15 Modulação das propriedades fármaco-cinéticas de um oligonucleotídeo LNA de acordo com a invenção ainda pode ser obtida através de ligação de uma variedade de metades diferentes. Por exemplo, a habilidade dos oligonucleotídeos em passar a membrana de célula pode ser aperfeiçoada através de ligação, por exemplo, de metades lipídeo como uma metade
- 20 colesterol, um tioéter, uma cadeia lipídica, um fosfolipídeo ou uma poliamina ao oligonucleotídeo. Da mesma maneira, tomada de oligonucleotídeos LNA em células pode ser aperfeiçoada através de conjugação de metades ao oligonucleotídeo que interagem com moléculas na membrana, o que media transporte no citoplasma.
- 25 As propriedades fármaco-cinéticas de acordo com a invenção podem ser aperfeiçoadas com grupos que aperfeiçoam tomada de oligômero, aperfeiçoam bioestabilidade, tal como aperfeiçoam resistência de oligômero à degradação e/ou aumentam a especificidade e afinidade de características de hibridização de oligonucleotídeos com seqüência alvo, por exemplo,
- 30 uma seqüência de mRNA.
- A composição farmacêutica de acordo com a invenção pode ser usada para o tratamento de condições associadas com níveis anormais de

ApoB-100.

Exemplos de tais condições são hiperlipoproteinemia, hiperlipoproteinemia tipo 3 familiar (dis-beta lipoproteinemia familiar), e hiper-alfa-lipoproteinemia familiar; hiperlipidemia, hiperlipidemias mistas, hiperlipidemia do tipo lipoproteína múltipla, e hiperlipidemia combinada familiar; hipertrigliceridemia, hipertrigliceridemia familiar, e lipoproteína lipase familiar; hipercolesterolemia, hipercolesterolemia resistente à estatina, hipercolesterolemia familiar, hipercolesterolemia poligênica, e apolipoproteína B defeituosa familiar; distúrbios cardiovasculares incluindo aterosclerose e doença de artéria coronária; trombose; doença vascular periférica; doença de von Gierke (doença de estocagem de glicogênio, tipo I); lipodistrofias (formas congênitas e adquiridas); síndrome de Cushing; nanismo ateloítico sexual (deficiência de hormônio de crescimento isolada); diabetes melitus; hipertiroidismo; hipertensão; anorexia nervosa; síndrome de Werner; porfíria intermitente aguda; cirrose biliar primária; obstrução biliar extra-hepática; hepatite aguda; hepatoma; lupus sistêmico eritematoso; gamopatias monoclonais (incluindo mieloma, mieloma múltiplo, macroglobulinemia, e linfoma); endocrinopatias; obesidade; síndrome nefrótica; síndrome metabólica; inflamação; hipotiroidismo; uremia (hiperurecemia); impotência; doença obstrutiva de fígado; hipercalemia idiopática; disglobulinemia; níveis elevados de insulina; síndrome-X; contratura de Dupuytren; AIDS; e mal de Alzheimer e demência.

A invenção também provê métodos de redução de risco de uma condição compreendendo a etapa de administração a um indivíduo de uma quantidade de composto da invenção suficiente para inibir expressão de apolipoproteína B, a dita condição selecionada de gravidez; claudicação intermitente; gota; e toxidez de mercúrio e doença de amálgama. A invenção ainda provê métodos de inibição de ligação de partícula de colesterol a endotélio vascular compreendendo a etapa de administração a um indivíduo de uma quantidade de um composto da invenção suficiente para inibir expressão de apolipoproteína B, e como um resultado, a invenção também provê métodos de redução de risco de: (i) oxidação de partícula de colesterol; (ii) ligação de monócito e endotélio vascular; (iii) diferenciação de monócitos em

macrófagos; (iv) ingestão de macrófagos de partículas de lipídeo 30 oxidadas e liberação de citocinas (incluindo, mas não limitado a IL-1, TNF-alfa, TGF-beta); (v) formação de plaqueta de lesões fibro-graxas fibrosas e inflamação; (vi) lesões do endotélio conduzindo a coágulos; e (vii) coágulos conduzindo a infartação miocárdial ou acidente vascular cerebral, também compreendendo a etapa de administração a um indivíduo de uma quantidade de um composto da invenção suficiente para inibir expressão de apolipoproteína B.

10 A invenção também provê processos de redução de hiperlipidemia associada com alcoolismo, fumo, uso de contraceptivos orais, uso de glucocorticóides, uso de agentes de bloqueio beta-adrenérgicos, ou uso de isotretiniona (ácido 13-cis retinóico) compreendendo a etapa de administração a um indivíduo de uma quantidade de um composto da invenção suficiente para inibir expressão de apolipoproteína B.

15 A invenção ainda prove uso de um composto da invenção na fabricação de um medicamento para o tratamento de qualquer uma e todas as condições aqui mostradas.

20 Geralmente estabelecido, um aspecto da invenção é direcionado a um método de tratamento de um mamífero sofrendo de ou suscetível a condições associadas com níveis anormais de ApoB-100, compreendendo administração ao mamífero de uma quantidade terapêuticamente eficaz de um oligonucleotídeo alvejado para Apo-B100 que compreende uma ou mais unidades LNA.

25 Um interessante aspecto da invenção é direcionado ao uso de um composto como aqui definido ou um conjugado como aqui definido para a preparação de um medicamento para o tratamento de uma condição de acordo com acima.

30 Os métodos da invenção são preferivelmente empregados para tratamento ou profilaxia contra doenças causadas por níveis anormais de ApoB-100.

Além disso, a invenção aqui descrita abrange um método de prevenção ou tratamento de uma doença compreendendo uma quantidade

terapeuticamente eficaz de um composto oligonucleotídeo modulando Apo-B100, incluindo, mas não limitada a altas doses do oligômero, a um ser humano em necessidade de tal terapia. A invenção ainda abrange o uso de um curto período de administração de um composto oligonucleotídeo modulando Apo-B100.

Em uma modalidade da invenção o composto oligonucleotídeo é ligado a ligantes/conjugados. É uma maneira para aumentar tomada celular de oligonucleotídeos anti-sentido.

Compostos oligonucleotídeos da invenção também podem ser conjugados a substâncias drogas ativas, por exemplo, aspirina, ibuprofeno, uma droga sulfa, um agente antidiabético, antibacteriano ou antibiótico.

Alternativamente estabelecido, a invenção é além disso direcionada a um processo para tratamento de níveis anormais de ApoB-100, o dito processo compreendendo administração de um composto como aqui definido, ou conjugado como aqui definido ou uma composição farmacêutica como aqui definida a um paciente em sua necessidade e ainda compreendendo a administração de ainda um agente quimioterapêutico. Ainda tal administração pode ser tal que o ainda agente quimioterapêutico seja conjugado ao composto da invenção, está presente na composição farmacêutica, ou é administrado em uma formulação separada.

Os compostos oligonucleotídeos contendo LNA da presente invenção também podem ser utilizados como reagentes de pesquisa para diagnósticos, terapêuticas e profilaxia. Em pesquisa, os oligonucleotídeos anti-sentido podem ser usados para inibirem especificamente a síntese de genes Apo-B100 em células e animais experimentais pelo que facilitando análise funcional do alvo ou uma avaliação de sua utilidade como um alvo para intervenção terapêutica. Em diagnósticos os oligonucleotídeos anti-sentido podem ser usados para detecção e quantificação de expressão de Apo-B100 em células e tecidos através de Northern blotting, hibridização in situ ou técnicas similares. Para terapêuticas, um animal ou ser humano, suspeito de ter uma doença ou distúrbio, que pode ser tratada através de modulação de expressão de Apo-B100 é tratado através de administração de compostos

anti-sentido de acordo com esta invenção. Ainda são providos métodos de tratamento de um animal, em particular camundongo e rato e tratamento de um ser humano, suspeito de ter ou sendo propenso a uma doença ou condição, associada com expressão de Apo-B100 através de administração de uma quantidade terapêutica ou profilaticamente eficaz de um ou mais dos compostos anti-sentido ou composições da invenção.

A invenção também refere-se a um composto ou um conjugado como aqui definido para uso como um medicamento.

A invenção ainda refere-se ao uso de um composto ou um conjugado como aqui definido para a fabricação de um medicamento para o tratamento de níveis anormais de Apo-B100. Tipicamente, tais níveis anormais de Apo-B100 estão na forma de aterosclerose, hipercolesterolemia ou hiperlipidemia.

Além disso, a invenção refere-se a um processo de tratamento de um indivíduo sofrendo de uma doença ou condição selecionada de aterosclerose, hipercolesterolemia, e hiperlipidemia, o processo compreendendo a etapa de administração de uma composição farmacêutica como aqui definida ao sujeito em sua necessidade. Preferivelmente a composição farmacêutica é administrada oralmente.

#### Algumas Modalidades da Invenção

1. Um composto consistindo em um total de 12-50 nucleotídeos e/ou análogos de nucleotídeos, onde o dito composto compreendendo uma subsequência de pelo menos 10 nucleotídeos ou análogos de nucleotídeos, a dita subsequência estando localizada dentro de uma seqüência selecionada do grupo consistindo em SEQ ID NOS: 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 27, 28, 48 e 50 onde o dito composto compreende pelo menos 3 análogos de nucleotídeos.

2. Um composto de acordo com a reivindicação 1, consistindo em um oligonucleotídeo de fita dupla, onde cada fita compreende um total de 16-30 nucleotídeos e/ou análogos de nucleotídeos, onde o dito composto compreende uma subsequência de pelo menos 10 nucleotídeos ou análogos de nucleotídeos, a dita subsequência estando localizada dentro de uma se-

quência selecionada de SEQ ID NOS: 27, 28, (e/ou 48 ou 50) e, onde o dito composto compreende pelo menos 3 análogos de nucleotídeos.

3. O composto de acordo com a modalidade 1 consistindo em 12-25 nucleotídeos ou análogos de nucleotídeos.

5 4. O composto de acordo com a modalidade 3 consistindo em 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, ou 22 nucleotídeos ou análogos de nucleotídeos.

5. O composto de acordo com a modalidade 4 consistindo em 16 nucleotídeos ou análogos de nucleotídeos.

6. O composto de acordo com qualquer uma das modalidades 1-  
10 5, onde os ditos nucleotídeos compreendem um grupo de ligação selecionado do grupo consistindo em um grupo fosfato, um grupo fosforotioato, e um grupo boranofosfato, a ligação internucleosídeo pode ser  $-O-P(O)_2-O-$ ,  $-O-P(O,S)-O-$ .

7. O composto de acordo com a modalidade 6, onde a dita ligação  
15 ção é um grupo fosfato.

8. O composto de acordo com a modalidade 6, onde a dita ligação é um grupo fosforotioato.

9. O composto de acordo com a modalidade 6, onde todos os nucleotídeos compreendem um grupo fosforotioato.

20 10. O composto de acordo com a modalidade 9 compreendendo de 3-12 análogos de nucleotídeos.

11. O composto de acordo com a modalidade 10 compreendendo 6 análogos de nucleotídeos.

12. O composto de acordo com qualquer uma das modalidades  
25 10-11, onde pelo menos um dos ditos análogos de nucleotídeo é um ácido nucléico fechado (LNA).

13. O composto de acordo com a modalidade 12, onde LNA é selecionado de beta-D-óxi-LNA, alfa-L-óxi-LNA, beta-D-amino-LNA ou beta-D-tio-LNA.

30 14. O composto de acordo com a modalidade 13, onde os ditos nucleotídeos e/ou LNAs são ligados juntos por meio de grupos fosfato.

15. O composto de acordo com a modalidade 14, onde os ditos

nucleosídeos e/ou os ditos LNAs são ligados por meio de grupos fosforotioato.

16. O composto de acordo com a modalidade 12, onde a subsequência é SEQ ID NO: 2.

5 17. O composto de acordo com a modalidade 12, onde a subsequência é SEQ ID NO: 3.

18. O composto de acordo com qualquer uma de modalidades 16-17, onde o LNA de extremidade 3' é substituído com o correspondente nucleosídeo natural.

10 19. Um composto consistindo em SEQ ID NO: 29.

20. Um composto consistindo em SEQ ID NO: 30.

21. Um conjugado compreendendo o composto de acordo com qualquer uma de modalidades 1-20 e pelo menos uma metade não-nucleotídeo ou não-polinucleotídeo ligada covalentemente ao dito composto.

15 22. Uma composição farmacêutica compreendendo um composto como definido em qualquer uma das modalidades 1-20 ou um conjugado como definido na modalidade 21, e um diluente, veículo ou adjuvante farmacêuticamente aceitável.

20 23. A composição farmacêutica de acordo com a modalidade 22 ainda compreendendo pelo menos um composto para diminuição de colesterol.

25 24. A composição farmacêutica de acordo com a modalidade 23, onde o dito composto é selecionado do grupo consistindo em resinas sequestrantes de sal de bile (por exemplo, colestiramina, colestipol, e cloridrato de colesvelam), inibidores de HMGCoA-redutase (por exemplo, lovastatina, cerivastatina, prevastatina, atorvastatina, simvastatina, e fluvastatina), ácido nicotínico, derivados de ácido fibríco (por exemplo, clofibrato, gemfibrozil, fenofibrato, bezafibrato, e ciprofibrato), probucol, neomicina, dextrotiroxina, ésteres de estanol de planta, inibidores de absorção de colesterol (por exemplo, ezetimibe), implitapide, inibidores de transportadores de ácido de bile (transportadores de ácido de bile dependentes de sódio apical), reguladores de CYP7a hepática, terapêutica de substituição de estrogênio (por

30

exemplo, tamoxifeno), e antiinflamatórios (por exemplo, glucocorticóides).

25. Um composto como definido em qualquer uma das modalidades 1-20 ou um conjugado como definido na modalidade 21 para uso como um medicamento.

5                    26. Uso de um composto como definido em qualquer uma das modalidades 1-20 ou como conjugado como definido na modalidade 21 para a fabricação de um medicamento para o tratamento de níveis anormais de Apo-B100.

10                   27. Uso de acordo com a modalidade 26, onde os ditos níveis anormais de Apo-B100 estão na forma de aterosclerose, hipercolesterolemia ou hiperlipidemia.

A invenção é ainda ilustrada em uma maneira não-limitante pelos exemplos que se seguem.

#### Exemplos

##### 15    Exemplo 1: Síntese de monômero

Os blocos de construção de monômero LNA e seus derivados foram preparados seguindo procedimentos publicados e referências ali citadas, ver:

WO 03/095467 A1

20                    D. S. Pedersen, C. Rosenbohm, T. Koch (2002) Preparation of LNA Phosphoramidites, *Synthesis* 6, 802-808.

                      M. D. Sørensen, L. Kværnø, T. Bryld, A. E. Håkansson, B. Verbeure, G. Gaubert, P. Herdewijn, J. Wengel (2002)  $\alpha$ -L-*ribo*-configured Locked Nucleic Acid ( $\alpha$ -l-LNA): Synthesis and Properties, *J. Am. Chem. Soc.*,  
25    124, 2164-2176.

                      S. K. Singh, R. Kumar, J. Wengel (1998) Synthesis of Novel Bicyclo[2.2.1] Ribonucleosides: 2'-Amino- and 2'-Thio-LNA Monomeric Nucleosides, *J. Org. Chem.* 1998, 63, 6078-6079.

30                    C. Rosenbohm, S. M. Christensen, M. D. Sørensen, D. S. Pedersen, L. E. Larsen, J. Wengel, T. Koch (2003) Synthesis of 2'-amino-LNA: a new strategy, *Org. Biomol. Chem.* 1, 655-663.

D. S. Pedersen, T. Koch (2003) Analogues of LNA (Locked Nucleic Acid). Synthesis of the 2'-Thio-LNA Thymine and 5-Methyl Cytosine Phosphoramidites, *Synthesis* 4, 578-582.

#### Exemplo 2: Síntese de oligonucleotídeo

5 Oligonucleotídeos foram sintetizados usando a abordagem fosforamidito em um Expedite 8900/MOSS Synthesizer (Multiple Oligonucleotide Synthesis System) em escala de 1  $\mu\text{mol}$  ou 15  $\mu\text{moles}$ . Para sínteses de maior escala foi usado um Äkta Oligo Pilot. No fim da síntese (DMT-on), os oligonucleotídeos foram clivados do dito suporte sólido usando amônia aquosa por 1-2 horas em temperatura ambiente, e ainda desprotegidos por 4  
10 horas a 65°C. Os oligonucleotídeos foram purificados por HPLC de fase reversa (RP-HPLC). Após a remoção do grupo DMT, os oligonucleotídeos foram caracterizados por AE-HPLC, RP-HPLC, e CGE e a massa molecular foi ainda confirmada por ESI-MS. Ver abaixo para mais detalhes.

#### 15 Preparação do suporte sólido de LNA:

##### Preparação do succinil hemi-éster de LNA

Monômero 5'-O-Dmt-3'-hidróxi-LNA (500 mg), anidrido succínico (1,2 eq.) e DMAP (1,2 eq.) foram dissolvidos em DCM (35 mL). A reação foi agitada em temperatura ambiente por toda noite. Após extrações com  
20  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,1 M pH 5,5 (2x) e salmoura (1x), a camada orgânica foi ainda secada com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro, filtrada e evaporada. O derivado hemi-éster foi obtido em 95% de rendimento e foi usado sem ainda qualquer purificação.

##### Preparação do suporte de LNA

O derivado de hemi-éster preparado acima (90  $\mu\text{moles}$ ) foi dissolvido em uma quantidade mínima de DMF, DIEA e pyBOP (90  $\mu\text{moles}$ ) foram adicionados e misturados por 1 minuto. Esta mistura pré-ativada foi combinada com LCAA-CPG (500 Angströms, 80-120 de tamanho de tela, 300 mg) em um sintetizador manual e agitados. Após 1,5 hora em temperatura ambiente, o suporte foi filtrado e lavado com DMF, DCM e MeOH. Após se-  
25 cagem, a carga foi determinada ser de 57  $\mu\text{moles/g}$  (ver Tom Brown, Dorcas J.S. Brown. Modern machine-aided methods of oligodeoxyribonucleotide synthesis. In: F. Eckstein, editor. Oligonucleotides and Analogues A Practical  
30

Approach. Oxford: IRL Press, 1991: 13-14).

#### Alongamento do oligonucleotídeo

O acoplamento de fosforamiditos (A(bz), G(ibu), 5-metil-C(bz)) ou T-β-ciano etil fosforamidito) é realizado através do uso de uma solução 0,1 M do amidito protegido com 5'-O-DMT- em acetonitrila e DCI (4,5-diciano imidazol) em acetonitrila (0,25 M) como ativador. A tiolação é realizada usando cloreto de xantano (0,01 M em acetonitrila : piridina 10%). O resto dos reagentes são os tipicamente usados para síntese de oligonucleotídeos. O protocolo provido pelo fornecedor foi convenientemente otimizado.

#### 10 Purificação por RP-HPLC:

Coluna: Xterra RP<sub>18</sub>

Taxa de fluxo: 3 mL/minuto

Tampões: acetato de amônio 0,1 M pH 8 e acetonitrila

#### Abreviaturas

15 DMT: dimetóxi tritila

DCI: 4,5-diciano amino piridina

DMAP: 4-dimetil amino piridina

DCM: dicloro metano

DMF: dimetil formamida

20 THF: tetraidrofurano

DIEA: N,N-diisopropil etil amina

PyBOP: hexa flúor fosfato de benzotriazol-1-il óxi-tris-pirrolidino fosfônio

Bz: benzoíla

25 Ibu: isobutirila

#### Exemplo 3: Desenho do composto oligonucleotídeo

O siRNA é uma fita sentido de 21-nucleotídeos (SEQ ID NO: 27) e uma fita anti-sentido de 23 nucleotídeos (SEQ ID NO: 28) – resultando em uma projeção de dois nucleotídeos na extremidade 3' da fita anti-sentido.

30 siRNA-ApoB sentido 5'-GUCAUCACACUGAAUACCAA\*U-3' (SEQ ID NO: 48), siRNA - ApoB-1 fita anti-sentido 5'-AUUGGUAUUCAGU GUGAUGAc\*a\*C-3 (SEQ ID NO: 49) e siARN-Chol-ApoB fita sentido: 5'-

GUCAUCACACUGAAUACCAU\*Chol-3' (SEQ ID NO: 50) foram sintetizados por RNATEC (Leuven).

- Em uma modalidade da invenção, SEQ ID NOS: 2-26 contêm pelo menos 3 nucleotídeos LNA, tal como 6 ou 7 nucleotídeos LNA como em
- 5 SEQ ID NOS: 29-47.

Tabela 1: Composto oligonucleotídeo da invenção

Em SEQ ID NOS: 27, 28, 48, 49, 50, letras em caixa superior indicam unidades ribonucleotídeo e subscritos "s" representam ligação fosforotioato.

Substância Teste	Seqüência	Sítio Alvo	
SEQ ID NO: 2	5'-GGTATTCAGTGTGATG-3'	10169	Motivo anti-sentido
SEQ ID NO: 3	5'-ATTGGTATTCAGTGTG-3'	10172	Motivo anti-sentido
SEQ ID NO: 4	5'-TTGTTCTGAATGTCCA-3'	3409	Motivo anti-sentido
SEQ ID NO: 5	5'-TCTTGTCTGAATGTC-3'	3411	Motivo anti-sentido
SEQ ID NO: 6	5'-TGGTATTCAGTGTGAT-3'		Motivo anti-sentido
SEQ ID NO: 7	5'-TTGGTATTCAGTGTGA-3'		Motivo anti-sentido
SEQ ID NO: 8	5'-CATTGGTATTCAGTGT-3'	10173	Motivo anti-sentido
SEQ ID NO: 9	5'-GCATTGGTATTCAGTG-3'	10174	Motivo anti-sentido
SEQ ID NO: 10	5'-AGCATTGGTATTCAGT-3'	10175	Motivo anti-sentido
SEQ ID NO: 11	5'-CAGCATTGGTATTCAG-3'	10176	Motivo anti-sentido
SEQ ID NO: 12	5'-TCAGCATTGGTATTCA-3'		Motivo anti-sentido
SEQ ID NO: 13	5'-TTCAGCATTGGTATTC-3'		Motivo anti-sentido
SEQ ID NO: 14	5'-GTTTCAGCATTGGTATT-3'		Motivo anti-sentido
SEQ ID NO: 15	5'-AGTTCAGCATTGGTAT-3'		Motivo anti-sentido
SEQ ID NO: 16	5'-AAGTTCAGCATTGGTA-3'		Motivo anti-

Substância Teste	Seqüência	Sítio Alvo	
			sentido
SEQ ID NO: 17	5'-AAAGTTCAGCATTGGT-3'		Motivo anti-sentido
SEQ ID NO: 18	5'-ATTTCCATTAAGTTCT-3'	10454	Motivo anti-sentido
SEQ ID NO: 19	5'-GGTATTTCCATTAAGT-3'	10457	Motivo anti-sentido
SEQ ID NO: 20	5'-GACTCAATGGAAAAGT-3'	10594	Motivo anti-sentido
SEQ ID NO: 21	5'-ATGACTCAATGGAAAA-3'	10596	Motivo anti-sentido
SEQ ID NO: 22	5'-GCTAACACTAAGAACC-3'	10998	Motivo anti-sentido
SEQ ID NO: 23	5'-CACTAAGAACCAGAAG-3'	11003	Motivo anti-sentido
SEQ ID NO: 24	5'-CTAAGAACCAGAAGAT-3'	11005	Motivo anti-sentido
SEQ ID NO: 25	5'-TGAATCGGGTCGCATC-3'	252	Motivo anti-sentido
SEQ ID NO: 26	5'-TGAATCGGGTCGCATT-3'	252	Motivo anti-sentido
SEQ ID NO: 27	5'-GUCAUCACACUGAAUACCAU-3'		siRNA
SEQ ID NO: 28	5'-AUUGGUUUUUGUGUGAUGACAC-3'		
SEQ ID NO: 29	5'-G <sub>s</sub> G <sub>s</sub> T <sub>s</sub> a <sub>s</sub> t <sub>s</sub> t <sub>s</sub> c <sub>s</sub> a <sub>s</sub> g <sub>s</sub> t <sub>s</sub> g <sub>s</sub> t <sub>s</sub> G <sub>s</sub> A <sub>s</sub> T <sub>s</sub> g-3'		Motivo Nº 2
SEQ ID NO: 30	5'-A <sub>s</sub> T <sub>s</sub> T <sub>s</sub> g <sub>s</sub> g <sub>s</sub> t <sub>s</sub> a <sub>s</sub> t <sub>s</sub> t <sub>s</sub> c <sub>s</sub> a <sub>s</sub> g <sub>s</sub> T <sub>s</sub> G <sub>s</sub> T <sub>s</sub> g-3'		Motivo Nº 3
SEQ ID NO: 31	5'-A <sub>s</sub> T <sub>s</sub> T <sub>s</sub> G <sub>s</sub> g <sub>s</sub> t <sub>s</sub> a <sub>s</sub> t <sub>s</sub> t <sub>s</sub> c <sub>s</sub> a <sub>s</sub> g <sub>s</sub> T <sub>s</sub> G <sub>s</sub> T <sub>s</sub> g-3'		Motivo Nº 3
SEQ ID NO: 32	5'-T <sub>s</sub> T <sub>s</sub> G <sub>s</sub> T <sub>s</sub> t <sub>s</sub> c <sub>s</sub> t <sub>s</sub> g <sub>s</sub> a <sub>s</sub> t <sub>s</sub> g <sub>s</sub> T <sub>s</sub> <sup>Me</sup> C <sub>s</sub> <sup>Me</sup> C <sub>s</sub> a-3'		Motivo Nº 4
SEQ ID NO: 33	5'-T <sub>s</sub> <sup>Me</sup> C <sub>s</sub> T <sub>s</sub> T <sub>s</sub> g <sub>s</sub> t <sub>s</sub> t <sub>s</sub> c <sub>s</sub> t <sub>s</sub> g <sub>s</sub> a <sub>s</sub> T <sub>s</sub> G <sub>s</sub> T <sub>s</sub> c-3'		Motivo Nº 5
SEQ ID NO: 34	5'- <sup>Me</sup> C <sub>s</sub> A <sub>s</sub> T <sub>s</sub> T <sub>s</sub> g <sub>s</sub> g <sub>s</sub> t <sub>s</sub> a <sub>s</sub> t <sub>s</sub> t <sub>s</sub> c <sub>s</sub> a <sub>s</sub> G <sub>s</sub> T <sub>s</sub> G <sub>s</sub> t-3'		Motivo Nº 8
SEQ ID NO: 35	5'-G <sub>s</sub> <sup>Me</sup> C <sub>s</sub> A <sub>s</sub> T <sub>s</sub> t <sub>s</sub> g <sub>s</sub> g <sub>s</sub> t <sub>s</sub> a <sub>s</sub> t <sub>s</sub> t <sub>s</sub> c <sub>s</sub> A <sub>s</sub> G <sub>s</sub> T <sub>s</sub> g-3'		Motivo Nº 9
SEQ ID NO: 36	5'-A <sub>s</sub> G <sub>s</sub> <sup>Me</sup> C <sub>s</sub> A <sub>s</sub> t <sub>s</sub> t <sub>s</sub> g <sub>s</sub> g <sub>s</sub> t <sub>s</sub> a <sub>s</sub> t <sub>s</sub> t <sub>s</sub> <sup>Me</sup> C <sub>s</sub> A <sub>s</sub> G <sub>s</sub> t-3'		Motivo Nº 10
SEQ ID NO: 37	5'- <sup>Me</sup> C <sub>s</sub> A <sub>s</sub> G <sub>s</sub> c <sub>s</sub> a <sub>s</sub> t <sub>s</sub> t <sub>s</sub> g <sub>s</sub> g <sub>s</sub> t <sub>s</sub> a <sub>s</sub> T <sub>s</sub> <sup>Me</sup> C <sub>s</sub> A <sub>s</sub> g-3'		Motivo Nº 11
SEQ ID NO: 38	5'- <sup>Me</sup> C <sub>s</sub> A <sub>s</sub> G <sub>s</sub> <sup>Me</sup> C <sub>s</sub> a <sub>s</sub> t <sub>s</sub> t <sub>s</sub> g <sub>s</sub> g <sub>s</sub> t <sub>s</sub> a <sub>s</sub> T <sub>s</sub> <sup>Me</sup> C <sub>s</sub> A <sub>s</sub> g-3'		Motivo Nº 11

Substância Teste	Seqüência	Sítio Alvo	
SEQ ID NO: 39	5'-A <sub>s</sub> T <sub>s</sub> T <sub>s</sub> T <sub>s</sub> c <sub>s</sub> c <sub>s</sub> a <sub>s</sub> t <sub>s</sub> t <sub>s</sub> a <sub>s</sub> a <sub>s</sub> g <sub>s</sub> T <sub>s</sub> T <sub>s</sub> <sup>Me</sup> C <sub>s</sub> t-3'		Motivo Nº 19
SEQ ID NO: 40	5'-G <sub>s</sub> G <sub>s</sub> T <sub>s</sub> A <sub>s</sub> t <sub>s</sub> t <sub>s</sub> c <sub>s</sub> c <sub>s</sub> a <sub>s</sub> t <sub>s</sub> t <sub>s</sub> A <sub>s</sub> A <sub>s</sub> G <sub>s</sub> t-3'		Motivo Nº 19
SEQ ID NO: 41	5'-G <sub>s</sub> A <sub>s</sub> <sup>Me</sup> C <sub>s</sub> T <sub>s</sub> c <sub>s</sub> a <sub>s</sub> t <sub>s</sub> g <sub>s</sub> a <sub>s</sub> a <sub>s</sub> A <sub>s</sub> A <sub>s</sub> G <sub>s</sub> t-3'		Motivo Nº 20
SEQ ID NO: 42	5'-A <sub>s</sub> T <sub>s</sub> G <sub>s</sub> A <sub>s</sub> c <sub>s</sub> t <sub>s</sub> c <sub>s</sub> a <sub>s</sub> t <sub>s</sub> g <sub>s</sub> A <sub>s</sub> A <sub>s</sub> a-3'		Motivo Nº 21
SEQ ID NO: 43	5'-G <sub>s</sub> <sup>Me</sup> C <sub>s</sub> T <sub>s</sub> A <sub>s</sub> a <sub>s</sub> c <sub>s</sub> a <sub>s</sub> c <sub>s</sub> t <sub>s</sub> a <sub>s</sub> a <sub>s</sub> g <sub>s</sub> A <sub>s</sub> A <sub>s</sub> <sup>Me</sup> C <sub>s</sub> c-3'		Motivo Nº 22
SEQ ID NO: 44	5'- <sup>Me</sup> C <sub>s</sub> A <sub>s</sub> <sup>Me</sup> C <sub>s</sub> T <sub>s</sub> a <sub>s</sub> a <sub>s</sub> g <sub>s</sub> a <sub>s</sub> c <sub>s</sub> a <sub>s</sub> G <sub>s</sub> A <sub>s</sub> g-3'		Motivo Nº 23
SEQ ID NO: 45	5'- <sup>Me</sup> C <sub>s</sub> T <sub>s</sub> A <sub>s</sub> A <sub>s</sub> g <sub>s</sub> a <sub>s</sub> c <sub>s</sub> c <sub>s</sub> a <sub>s</sub> g <sub>s</sub> a <sub>s</sub> A <sub>s</sub> G <sub>s</sub> A <sub>s</sub> t-3'		Motivo Nº 24
SEQ ID NO: 46	5'-T <sub>s</sub> G <sub>s</sub> A <sub>s</sub> A <sub>s</sub> t <sub>s</sub> c <sub>s</sub> g <sub>s</sub> g <sub>s</sub> g <sub>s</sub> t <sub>s</sub> c <sub>s</sub> g <sub>s</sub> <sup>Me</sup> C <sub>s</sub> A <sub>s</sub> T <sub>s</sub> c-3'		Motivo Nº 25
SEQ ID NO: 47	5'-T <sub>s</sub> G <sub>s</sub> A <sub>s</sub> A <sub>s</sub> t <sub>s</sub> c <sub>s</sub> g <sub>s</sub> g <sub>s</sub> g <sub>s</sub> t <sub>s</sub> c <sub>s</sub> g <sub>s</sub> <sup>Me</sup> C <sub>s</sub> A <sub>s</sub> T <sub>s</sub> t-3'		Motivo Nº 26
SEQ ID NO: 48 SEQ ID NO: 49 ApoB-siRNA (RNA-TEC290.3/ RNA-TEC290.5)	5'-GUCAUCACACUGAAUACCAA <sub>s</sub> U-3' (290.3) 5'-AUUGGUAUUCAGUGUGAUGAc <sub>s</sub> a <sub>s</sub> C-3' (290.5)		Unconjugated siRNA
SEQ ID NO: 50 ApoB-siRNA-Chol (SEQ ID NO: 51 RNA-TEC290.4/ RNA-TEC290.5)	5'-GUCAUCACACUGAAUACCAA <sub>s</sub> - Chol-3' (290.4) 5'-AUUGGUAUUCAGUGUGAUGAc <sub>s</sub> a <sub>s</sub> C-3' (290.5)		Cholesteryl conjugated siRNA

SEQ ID NO: 30 é um composto interessante de acordo com a invenção.

#### Exemplo 4: Estabilidade de compostos LNA em plasma humano ou de rato

Estabilidade de oligonucleotídeo LNA foi testada em plasma de seres humanos ou ratos (também podendo ser plasma de camundongo, macaco ou cão). Em 45 µL de plasma, 5 µL de oligonucleotídeo são adicionados (uma concentração final de 20 µM). Os oligos são incubados em plasma por tempos variando de 0 h – 96 h a 37°C (o plasma é testado para atividade nuclease até 96 h e não mostra diferença em padrão de clivagem de nuclea-  
5 se). No tempo indicado a amostra foi congelada instantânea em nitrogênio líquido. 2 µL (igual a 40 pmoles) de oligonucleotídeo em plasma foram diluídos pela adição de 15 µL de água e 3 µL de 6x corante de carga (Invitro-  
10

gen). Como marcador uma escada de 10 pb (Invitrogen 10821-015) é usado. A 1  $\mu$ L de escada, 1  $\mu$ L de 6x carga e 4  $\mu$ L de água foram adicionados. As amostras foram misturadas, aquecidas a 65°C por 10 minutos e carregadas para um gel de pré-corrída (acrilamida 16%, uréia 7 M, 1x TBE, pré-corrída em 50 Watt por 1 h) e corrída em 50-60 Watt por 2 ½ h. Subseqüentemente o gel foi manchado com 1x SyBR gold (molecular probes) em 1x TBE por 15 minutos. As bandas foram visualizadas usando um phosphoimager de Bio-rad.

#### Exemplo 5: Modelo in vitro: Cultura de células

10 O efeito de compostos anti-sentido sobreexpressão de ácido nucléico alvo pode ser testado em qualquer um de uma variedade de tipos de células contanto que o ácido nucléico alvo esteja presente em níveis mensuráveis. Alvo pode ser expresso endogenamente ou através de transfecção estável ou transiente de um ácido nucléico codificando o dito ácido nucléico.

15 O nível de expressão de ácido nucléico alvo pode ser rotineiramente determinado usando, por exemplo, análises Northern blot, PCR quantitativa, ensaios de proteção de ribonuclease. Os seguintes tipos de células são providos para propósitos ilustrativos, mas outros tipos de células podem ser rotineiramente usados, contanto que o alvo seja expresso no tipo de célula escolhido.

20 Células foram cultivadas no meio apropriado como descrito abaixo e mantidas a 37°C em 95-98% de umidade e 5% de CO<sub>2</sub>. Células foram rotineiramente passadas 2-3 vezes por semana.

25 BNCL-2: linha de células de fígado de camundongo BNCL-2 foi adquirida de ATCC e cultivada em DMEM (Sigma) com FBS 10% + Glutamax I + aminoácidos não-essenciais + gentamicina.

Hepa1-6: linha de células de fígado de camundongo Hepa1-6 foi adquirida de ATCC e cultivada em DMEM (Sigma) com FBS 10% + Glutamax I + aminoácidos não-essenciais + genatamicina.

30 HepG2: linha de células de fígado humano HepG2 foi adquirida de ATCC e cultivada em Eagle MEM (Sigma) com FBS 10% + Glutamax I + aminoácidos não-essenciais + gentamicina.

#### Exemplo 6: Modelo in vitro: Tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido

Cultura e transfecção de células: células BNCL-2 ou Hepa1-6 foram semeadas em placas de 12 cavidades a 37°C (5% CO<sub>2</sub>) em meios de crescimento suplementados com FBS 10%, Glutamax I e gentamicina.

5 Quando as células foram 60-70% confluentes, elas foram transfectadas em duplicatas com diferentes concentrações de oligonucleotídeos (0,04-25 nM) usando Lipofectamina 2000 (5 µg/mL). Transfecções foram realizadas essencialmente como descrito por Dean et al. (1994, JBC 269: 16416-16424). Em resumo, células foram incubadas por 10 minutos com lipofectamina em

10 OptiMEM seguido por adição de oligonucleotídeo para um volume total de 0,5 mL de mistura de transfecção por cavidade. Após 4 horas, a mistura de transfecção foi removida, células foram lavadas e crescidas a 37°C por aproximadamente 20 horas (análises de mRNA e análises de proteínas no apropriado meio de crescimento. Células foram então colhidas para análises

15 de RNA e proteínas.

#### Exemplo 7: Modelo in vitro: Extração de RNA e síntese de cADN

##### Isolamento de RNA total

RNA total foi isolado usando mini kit RNeasy (qiagen). Células foram lavadas com PBS, e tampão de lise de célula (RTL, Qiagen) suplementado com mercaptoetanol 1% foi adicionado diretamente às cavidades.

20 Após uns poucos minutos, as amostras foram processadas de acordo com as instruções do fabricante.

##### Síntese de primeira fita

Síntese de primeira fita foi realizada usando OmniScript Reverse

25 Transcriptase kit ou M-MLV Reverse transcriptase (essencialmente como descrito pelo fabricante (Ambion)) de acordo com as instruções do fabricante (Qiagen). Quando usando OmniScript Reverse Transcriptase, 0,5 µg de RNA total de cada amostra, foi ajustado para 12 µL e misturados com 0,2 µL de poli(dT)<sub>12-18</sub> (0,5 µg/µL) (Life Technologies), 2 µL de mistura de dNTP (5

30 mM cada), 2 µL 10x tampão RT, 0,5 µL inibidor RNAGuard Rnase (33 unidades/mL, Amersham) e 1 µL OmniScript Reverse Transcriptase seguido por incubação a 37°C por 60 minutos, e inativação térmica a 93°C por 5 minutos.

Quando síntese de primeira fita foi realizada usando decâmeros randômicos e M-MLV-transcriptase reversa (essencialmente como descrito pelo fabricante (Ambion)), 0,25 µg de RNA total de cada amostra foi ajustado para 10,8 µL em H<sub>2</sub>O. 2 µL de decâmeros e 2 µL de mistura de dNTP (2,5 mM cada) foram adicionados. Amostras foram aquecidas a 70°C por 3 minutos e imediatamente resfriadas em água e gelo e adicionados 3,25 µL de uma mistura contendo (2 µL 10x tampão RT; 1 µL M-MLV transcriptase reversa; 0,25 µL inibidor de Rnase). cADN é sintetizado a 42°C por 60 minutos seguido por etapa de inativação com aquecimento a 95°C por 10 minutos e finalmente resfriado para 4°C.

Exemplo 8: Modelo in vitro e in vivo: Análises de inibição de oligonucleotídeo de expressão de Apo-B100 através de PCR de tempo real

Modulação anti-sentido de expressão de Apo-B100 pode ser ensaiada em uma variedade de maneiras conhecidas na técnica. Por exemplo, níveis de mRNA de Apo-B100 podem ser quantificados através de, por exemplo, análises de Northern blot, reação de polimerase competitiva (PCR), ou PCR de tempo real. PCR quantitativa de tempo real é presentemente preferida. Análises de RNA podem ser realizadas sobre RNA celular total ou mRNA.

Métodos de isolamento de RNA e análises de RNA tais como análises de Northern blot é rotina na técnica e é ensinada em, por exemplo, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons.

PCR quantitativa de tempo real pode ser convenientemente realizada usando o iQ Multi-Color Real Time PCR Detection System comercialmente disponível de BioRAD. PCR quantitativa de tempo real é uma técnica bem conhecida e é ensinada, por exemplo, em Heid et al. Real time quantitative PCR, Genome Research (1996), 6: 986-994.

Análises PCR quantitativas de tempo real de níveis de mRNA de Apo-B100

Para determinar o nível relativo de mRNA de ApoB de camundongo em amostras tratadas e não-tratadas, o cADN gerado foi usado em análises PCR quantitativas usando um iCycler de BioRad.

A 8 µL de cADN diluído 5 vezes (Gapdh and Beta-Actin) foram

adicionados 52  $\mu\text{L}$  de uma mistura contendo 29,5  $\mu\text{L}$  de Platinum qPCR.

Supermix-UDG (Invitrogen), 1030 nM de cada iniciador, 0,57 X SYBR Verde (Molecular Probes) e 11,4 nM de fluoresceína (Molecular Probes).

5 Duplicatas de 25  $\mu\text{L}$  foram usadas para qPCR: 50°C por 120 segundos, 95°C por 120 segundos e 40 ciclos [95°C por 30 segundos e 60°C por 60 segundos].

Expressão de ApoB foi quantificada usando um cADN diluído 50 vezes e um protocolo Q-PCR padrão. Os iniciadores (conc. final de respectivamente primers dianteiro e reverso de 0,6  $\mu\text{M}$  e 0,9  $\mu\text{M}$ ) e sonda (conc. final de 0,1  $\mu\text{M}$ ) foram misturados com 2 x Platinum Quantitative PCR SuperMix UDG (cat. # 11730, Invitrogen) e adicionados a 3,3  $\mu\text{L}$  de cADN para um volume final de 25  $\mu\text{L}$ . cada amostra foi analisada em duplicatas. Programa de PCR: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos seguido por 40 ciclos de  
10  
15 95°C, 15 segundos, 60°C, 1 minuto.

Expressão de mRNA de ApoB foi normalizada para mRNA Gapdh ou beta-actina de camundongo que foi similarmente quantificado usando Q-PCR.

Iniciadores:

20 mGapdh: 5'-agcctcgctcccgtagacaaaat-3' (SEQ ID NO: 51) and 5'-gttgatggcaacaatctccacttt-3' (SEQ ID NO: 52)

m $\beta$ -actin: 5'-ccttccttctgggatggaa-3' (SEQ ID NO: 53) and 5'-gctcaggaggagcaatgatct-3' (SEQ ID NO: 54)

mApoB: 5'-gccattgtggacaagttgatc-3' (SEQ ID NO: 55) and 5'-ccaggactggaggctcttga-3' (SEQ ID NO: 56)  
25

mApoB Taqman probe: 5'-fam-aagccagggcctatctccgcatcc-3' (SEQ ID NO: 57)

sonda Taqman mApoB: 5'-fam-..... (SEQ ID NO: 57).

Diluições de 2 vezes de cADN sintetizado de linha de células  
30 hepatócitos de camundongos não-tratados (células Hepa1-6) (diluída 5 vezes e expressando ApoB e beta-actina ou Gapdh) foram usadas para preparação de curvas padrão para os ensaios. Quantidades relativas de mRNA

ApoB foram determinadas a partir do calculado ciclo Limite usando o iCycler iQ Real Time Detection System software.

Exemplo 9: Análises in vitro: Análises Western blot de níveis de proteínas Apo-B100

5 O efeito in vitro de oligos Apo-B100 sobre níveis de proteína Apo-B100 em células transfectadas foi determinado por Western blotting.

Células foram colhidas e lisadas em Tris-HCl 50 mM pH 6,8, glicérol 10%, SDS 2,5%, DTT 5 mM e uréia 6 M suplementada com coquetel inibidor de protease (Roche). Concentrações de proteína total foram medi-  
10 das usando um kit de ensaio de proteína BCA (Pierce). 50 µg de proteína total foram corridos sobre géis Bis-Tris 10-12% em tampão MOPS ou sobre géis Tris Acetato 3-8% e manchados sobre membranas PVDF de acordo com instruções do fabricante (Invitrogen). Após incubação por toda noite em tampão de bloqueio (PBS-T suplementado com pulverizado de leite de baixa  
15 gordura 5%), as membranas foram incubadas por toda noite com anticorpo primário detectando ApoB-100. Como controle de carga, tubulina ou actina foram detectadas usando anticorpos monoclonais de Neomarker. Membranas foram então incubadas com anticorpos secundários e ApoB-100 foi visualizada usando um kit de imuno-deteccção cromogênica (Invitrogen) ou um  
20 kit de detecccção ECL<sup>+</sup> de quimioluminescência (Amersham).

Exemplo 10: Análises in vitro: Inibição anti-sentido de expressão de Apo-B100 humana usando oligonucleotídeos anti-sentido

De acordo com a presente invenção, uma série de oligonucleotí-  
25 deos foram desenhados para alvejar diferentes regiões do RNA Apo-B100 humano. Ver Tabela 1 compostos oligonucleotíceos foram avaliados para seu potencial para mRNA Apo-B100 nocaute em hepatócitos de camundongo (células Hepa1-6) seguindo tomada assistida por lipídeo de SEQ ID NO: 29, siRNA (não-modificado) ou siRNA modificado com colesterila (Figura 1A) e comparação de nocaute de ApoB-100 em BNLCL2 pelos dois oligonucleo-  
30 tídeos LNA SEQ ID NO: 29 e SEQ ID NO: 30 (Figura 1B) e em células Hepa1-6 por SEQ ID NO: 29 e SEQ ID NO: 37 (Figura 4).

Os dados são apresentados como porcentagem de regulação

descendente em relação a células transfectadas falsas. Estado estável de transcrito foi monitorado por PCR de tempo real e normalizado com o estado estável transcrito GAPDH.

Exemplo 11: Regulação descendente de alvo in vivo de compostos oligonucleotídeos contendo LNA

5 Camundongos C57BL/6 (20 g) receberam 6,25, 12,5, 25 ou 50 mg/kg i.v. em três dias consecutivos (tamanho de grupo de 7 camundongos). Nós dosamos com menos oligonucleotídeo anti-sentido uma vez que o peso molecular de um siRNA-Chol comparado a um oligonucleotídeo anti-sentido é aproximadamente 3:1. Todos oligonucleotídeos anti-sentido e siRNA foram dissolvidos em solução salina 0,9% (NaCl) e dados em 10 mL/kg de peso de corpo (~0,2 mL por injeção). No sacrifício o peso do fígado foi anotado. Te-  
10 cidos para medição de expressão de mRNA de ApoB foram estocados em RNA posterior (Ambion) a -20°C até uso. Análises de mRNA sobre jejuno e fígado e colesterol total em plasma foram realizadas 24 horas após injeção i.v. (ver Figuras 2A e 2B).  
15

Exemplo 12: Níveis de colesterol em plasma

Nível total de colesterol foi medido em plasma usando um ensaio colorimétrico Cholesterol CP de ABX Pentra. O colesterol é medido seguindo  
20 hidrólise enzimática e oxidação. 21,5 µL de água foram adicionados a 1,5 µL de plasma. 250 µL de reagente são adicionados e dentro de 5 minutos o teor de colesterol é medido em um comprimento de onda de 540 nM. Medições em cada animal são feitas em duplicata. A sensibilidade e linearidade foram testadas com composto controle diluído 2 vezes (ABX Pentra N control). O  
25 nível relativo de colesterol foi determinado através de subtração do fundo e apresentado em relação aos níveis de colesterol em plasma de camundongos tratados com solução salina (ver Figura 3).

Exemplo 13: Regulação descendente de alvo in vivo de compostos oligonucleotídeos LNA

30 Camundongos C57BL/6 (20 g) receberam 6,25, 12, ou 25 mg/kg i.v. em três dias consecutivos (tamanho de grupo de 7 camundongos). Os oligonucleotídeos anti-sentido (SEQ ID NO: 29 e 37) foram dissolvidos em

solução salina 0,9% (NaCl) e dados em 10 mL/kg de peso de corpo (~0,2 mL por injeção). Tecidos para medição de expressão de mRNA ApoB foi estocado em RNA posterior (Ambion) a  $-20^{\circ}\text{C}$  até uso. Análises de mRNA em jejuno e fígado, colesterol total e LDL em plasma foram realizadas 24 horas após última injeção i.v. (ver Figuras 5A, 5B, 6A e 6B).

Exemplo 14: Administração roal de compostos oligonucleotídeo LNA a camundongos

Camundongos C57BL/6 920 g) receberam 10 mL/kg, isto é, 0,2 mL, de uma formulação preparada recentemente de 1, 0 mL de oligonucleotídeo (SEQ ID NOS: 29 ou 37) em  $\text{H}_2\text{O}$  estéril (7,5 mg/mL), 0,1 mL de Tween 80, 1,9 mL de óleo de oliva. A concentração final de composto oligonucleotídeo: 2,5 mg/mL. A formulação foi agitada por 1 minuto; sonificada com ultrassom por 5 minutos (repetido 3 vezes). Nenhum efeito negativo foi observado.

Exemplo 15: Análises in vitro: Resposta a dose em cultura de células (hepatócito humano Huh-7)/Inibição Anti-sentido de expressão de Apo-B100 Humana

De acordo com a presente invenção, uma série de oligonucleotídeos foi desenhada para alvejar diferentes regiões do mRNA Apo-B100 humano. Ver Tabela 1 Compostos oligonucleotídeos foram avaliados por seu potencial para nocaute de mRNA Apo-B100 em hepatócitos humanos (células Huh-7) seguindo tomada auxiliada por lipídeo de SEQ ID NOS: 31-32, 36-38, e 40-42 (Figura 8). O experimento foi realizado como descrito em exemplos 5-8. Os resultados mostraram regulação descendente muito potente (>80%) com 25 nM para todos os compostos. Entretanto, em 1 nM somente 2 compostos resultaram em uma regulação descendente de mRNA ApoB-100 tão alta quanto 70% (SEQ ID NO: 37 e 40, a qual é uma regulação descendente muito potente (Figura 8).

Exemplo 16:  $\text{IC}_{50}$  para 7 oligonucleotídeos anti-sentido LNA selecionados em cultura de células (hepatócitos humanos Huh-7)

Os 7 oligonucleotídeos anti-sentido com a melhor regulação descendente in vitro foram selecionados para um estudo de  $\text{IC}_{50}$  para determinar a concentração do oligonucleotídeo anti-sentido para render uma inibi-

ção 50% de expressão de mRNA ApoB-100. O experimento foi feito como descrito em exemplos 5-8. Somente SEQ ID NO: 36 e 37 tiveram uma IC50 de cerca de 1 nM, enquanto SEQ ID NO: 38 teve IC 50 tão alta quanto 5,7 (figura 9). Uma IC50 de 0,5 nM indica um composto muito potente, que para SEQ ID NO; 37 foi confirmado por dados in vivo (exemplos 17 e 18).

Exemplo 17: Duração de ação de dosagem de SEQ ID NO: 37 uma vez, duas vezes ou três vezes

Camundongos C57BL/6 (20 g) receberam 6,25 ou 25 mg/kg/ dose i.p. em um, dois ou três dias consecutivos (tamanho de grupo de 5 camundongos). Todos os oligonucleotídeos anti-sentido foram dissolvidos em solução salina 0,9% (NaCl) e administrados em 10 mL/kg de peso de corpo (~0,2 mL por injeção). No sacrifício (dias 3, 5, 8, 13 e 21) o peso do fígado foi anotado. Tecidos para medição de expressão de mRNA ApoB foi estocado em RNA posterior (Ambion) a -20°C até uso. Análises de mRNA no fígado foram realizadas no sacrifício enquanto colesterol LDL e total em plasma foram realizadas 24 h, e ou 3 e, 6, 11, e 19 dias após última injeção i.p. (ver Figura 11). Este estudo mostrou uma regulação descendente muito potente de mRNA ApoB-100 seguindo dosagem com SEQ ID NO: 37. Uma dose resultou em expressão de mRNA ApoB de 45-60% a partir de dia 3 para dia 8 após dosagem, enquanto 3 doses resultaram em 85-90% de regulação descendente no dia 13 e cerca de 70% no dia 21, mostrando uma duração de ação mais longa que 20 dias no fígado quando 2 ou 3 doses foram administradas. Expressão de mRNA ApoB-100 e colesterol total foram medidas como descrito em exemplos 8 e 12.

Exemplo 18: Regimes de doses de SEQ ID NO 37

Camundongos C57BL/6 (20 g) receberam 2 mg/kg/dose i.p. duas vezes por semana por 4 semanas ou 5 mg/kg/dose uma vez por semana por 4 semanas (tamanho de grupo de 5 camundongos) para examinar o efeito sobre regulação descendente de mRNA ApoB-100 alvo e sobre nível de colesterol em plasma (coletado uma vez por semana). O oligonucleotídeo anti-sentido foi dissolvido em solução salina 0,9% (NaCl) e administrado em 10 mL/kg de peso de corpo (~0,2 mL por injeção). No sacrifício (dia 28) o

peso do fígado foi anotado. Tecidos para medição de expressão de mRNA ApoB foram estocados em RNA posterior (Ambion) a -20°C até uso. Análises de mRNA no fígado foram realizadas no sacrifício enquanto nível de colesterol LDL em plasma foi determinado dias 7, 14, 21 e 28 (ver Figura 10). Os resultados mostraram uma diminuição linear em nível de colesterol LDL sobre o tempo resultando em uma redução de 30% no dia 28 comparado ao dia 7 e o grupo de solução salina após dosagem de 2,5 mg/kg/dose duas vezes por semanas. Resultados similares foram obtidos dosando a mesma quantidade total de oligonucleotídeo anti-sentido, mas dosando 5 mg/kg/dose somente uma vez por semana. Além disso, o nível de mRNA ApoB-100 no fígado no sacrifício (dia 28) mostrou uma regulação descendente de 30-40% após dosagem 20 mg/kg sobre 28 dias independente do regime de dose (uma ou duas doses semanalmente). Estes resultados mostram que uma significativa regulação descendente de mRNA ApoB-100 mesmo em baixas doses de SEQ ID NO: 37, e que esta regulação descendente tem um impacto sobre a leitura terapêutica medida como uma redução de 30% em colesterol LDL em plasma. Expressão de mRNA ApoB-100 e níveis de colesterol em plasma foram medidos como descrito em exemplos 8 e 12.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

<110> Santaris A/S  
 <120> COMPOSTOS ANTAGONISTAS DE RNA PARA A INIBIÇÃO DE EXPRESSÃO DE APO-B100  
 5 <130> 16513PCT00  
 <160> 68  
 <170> PatentIn version 3.3  
 <210> 1  
 <211> 16  
 10 <212> DNA  
 <213> artificial  
 <220>  
 <223> Controle oligonucleotídeo LNA scrambled  
 <400> 1  
 15 cgtcagtatg cgaatc 16  
 <210> 2  
 <211> 16  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 20 <220>  
 <223> Motivo anti-sentido  
 <400> 2  
 ggtattcagt gtgatg 16  
 <210> 3  
 25 <211> 16  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Motivo anti-sentido  
 30 <400> 3  
 attggtattc agtgtg 16  
 <210> 4

<211> 16  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 5 <223> Motivo anti-sentido  
 <400> 4  
 ttgttctgaa tgtcca 16  
 <210> 5  
 <211> 16  
 10 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Motivo anti-sentido  
 <400> 5  
 15 tcttgttctg aatgctc 16  
 <210> 6  
 <211> 16  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 20 <220>  
 <223> Motivo anti-sentido  
 <400> 6  
 tggattcag tgtgat 16  
 <210> 7  
 25 <211> 16  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Motivo anti-sentido  
 30 <400> 7  
 ttggattca gtgtga 16  
 <210> 8

	<211>	16	
	<212>	DNA	
	<213>	Artificial	
	<220>		
5	<223>	Motivo anti-sentido	
	<400>	8	
	cattggtatt	cagtgt	16
	<210>	9	
	<211>	16	
10	<212>	DNA	
	<213>	Artificial	
	<220>		
	<223>	Motivo anti-sentido	
	<400>	9	
15	gcattggtat	tcagtg	16
	<210>	10	
	<211>	16	
	<212>	DNA	
	<213>	Artificial	
20	<220>		
	<223>	Motivo anti-sentido	
	<400>	10	
	agcattggta	ttcagt	16
	<210>	11	
25	<211>	16	
	<212>	DNA	
	<213>	Artificial	
	<220>		
	<223>	Motivo anti-sentido	
30	<400>	11	
	cagcattggt	attcag	16
	<210>	12	

	<211>	16	
	<212>	DNA	
	<213>	Artificial	
	<220>		
5	<223>	Motivo anti-sentido	
	<400>	12	
	tcagcattgg	tattca	16
	<210>	13	
	<211>	16	
10	<212>	DNA	
	<213>	Artificial	
	<220>		
	<223>	Motivo anti-sentido	
	<400>	13	
15	ttcagcattg	gtattc	16
	<210>	14	
	<211>	16	
	<212>	DNA	
	<213>	Artificial	
20	<220>		
	<223>	Motivo anti-sentido	
	<400>	14	
	gttcagcatt	ggtatt	16
	<210>	15	
25	<211>	16	
	<212>	DNA	
	<213>	Artificial	
	<220>		
	<223>	Motivo anti-sentido	
30	<400>	15	
	agttcagcat	tggtat	16
	<210>	16	

	<211>	16	
	<212>	DNA	
	<213>	Artificial	
	<220>		
5	<223>	Motivo anti-sentido	
	<400>	16	
	aagttcagca	ttggta	16
	<210>	17	
	<211>	16	
10	<212>	DNA	
	<213>	Artificial	
	<220>		
	<223>	Motivo anti-sentido	
	<400>	17	
15	aaagttcagc	attggt	16
	<210>	18	
	<211>	16	
	<212>	DNA	
	<213>	Artificial	
20	<220>		
	<223>	Motivo anti-sentido	
	<400>	18	
	atttcatta	agttct	16
	<210>	19	
25	<211>	16	
	<212>	DNA	
	<213>	Artificial	
	<220>		
	<223>	Motivo anti-sentido	
30	<400>	19	
	ggtattcca	ttaagt	16
	<210>	20	

	<211>	16	
	<212>	DNA	
	<213>	Artificial	
	<220>		
5	<223>	Motivo anti-sentido	
	<400>	20	
		gactcaatgg aaaagt	16
	<210>	21	
	<211>	16	
10	<212>	DNA	
	<213>	Artificial	
	<220>		
	<223>	Motivo anti-sentido	
	<400>	21	
15		atgactcaat ggaaaa	16
	<210>	22	
	<211>	16	
	<212>	DNA	
	<213>	Artificial	
20	<220>		
	<223>	Motivo anti-sentido	
	<400>	22	
		gctaacta agaacc	16
	<210>	23	
25	<211>	16	
	<212>	DNA	
	<213>	Artificial	
	<220>		
	<223>	Motivo anti-sentido	
30	<400>	23	
		cactaagaac cagaag	16
	<210>	24	

	<211>	16	
	<212>	DNA	
	<213>	Artificial	
	<220>		
5	<223>	Motivo anti-sentido	
	<400>	24	
		ctaagaacca gaagat	16
	<210>	25	
	<211>	16	
10	<212>	DNA	
	<213>	Artificial	
	<220>		
	<223>	Motivo anti-sentido	
	<400>	25	
15		tgaatcgggt cgcatt	16
	<210>	26	
	<211>	16	
	<212>	DNA	
	<213>	Artificial	
20	<220>		
	<223>	Motivo anti-sentido	
	<400>	26	
		tgaatcgggt cgcatt	16
	<210>	27	
25	<211>	21	
	<212>	RNA	
	<213>	Artificial	
	<220>		
	<223>	siRNA	
30	<400>	27	
		gucaucacac ugaauaccaa u	21
	<210>	28	

	<211>	23	
	<212>	RNA	
	<213>	Artificial	
	<220>		
5	<223>	siRNA	
	<400>	28	
		auugguauuc aguguga cac	23
	<210>	29	
	<211>	16	
10	<212>	DNA	
	<213>	Artificial	
	<220>		
	<223>	Motivo N° 2	
	<220>		
15	<221>	oligonucleotídeo modificado LNA	
	<222>	(1)..(3)	
	<220>		
	<221>	Ligação fosforotioato	
	<222>	(1)..(15)	
20	<220>		
	<221>	oligonucleotídeo modificado LNA	
	<222>	(13)..(15)	
	<400>	29	
		ggtattcagt gtgatg	16
25	<210>	30	
	<211>	16	
	<212>	DNA	
	<213>	Artificial	
	<220>		
30	<223>	Motivo N° 3	
	<220>		
	<221>	Nucleotídeo modificado LNA	

	<222>	(1)..(3)	
	<220>		
	<221>	Ligação fosforotioato	
	<222>	(1)..(15)	
5	<220>		
	<221>	Nucleotídeo modificado LNA	
	<222>	(13)..(15)	
	<400>	30	
		attggatttc agtgtg	16
10	<210>	31	
	<211>	16	
	<212>	DNA	
	<213>	Artificial	
	<220>		
15	<223>	Motivo N° 3	
	<220>		
	<221>	Nucleotídeo modificado LNA	
	<222>	(1)..(4)	
	<220>		
20	<221>	Ligação fosforotioato	
	<222>	(1)..(15)	
	<220>		
	<221>	Nucleotídeo modificado LNA	
	<222>	(13)..(15)	
25	<400>	31	
		attggatttc agtgtg	16
	<210>	32	
	<211>	16	
	<212>	DNA	
30	<213>	Artificial	
	<220>		
	<223>	Motivo N° 4	

<220>  
 <221> Nucleotídeo modificado LNA  
 <222> (1)..(4)  
 <220>  
 5 <221> Ligação fosforotioato  
 <222> (1)..(15)  
 <220>  
 <221> Nucleotídeo modificado LNA  
 <222> (13)..(15)  
 10 <220>  
 <221> Citosina LNA modificada com 5-metila  
 <222> (14)..(15)  
 <400> 32  
 ttgttctgaa tgtcca  
 15 <210> 33  
 <211> 16  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 20 <223> Motivo N° 5  
 <220>  
 <221> Ligação fosforotioato  
 <222> (1)..(15)  
 <220>  
 25 <221> Nucleotídeo modificado LNA  
 <222> (1)..(4)  
 <220>  
 <221> Citosina LNA modificada com 5-metila  
 <222> (2)..(2)  
 30 <220>  
 <221> Nucleotídeo modificado LNA  
 <222> (13)..(15)

<400> 33  
 tcttggtctg aatgct 16  
 <210> 34  
 <211> 16  
 5 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Motivo N° 8  
 <220>  
 10 <221> Citosina LNA modificada com 5-metila  
 <222> (1)..(1)  
 <220>  
 <221> Nucleotídeo modificado LNA  
 <222> (1)..(4)  
 15 <220>  
 <221> Ligação fosforotioato  
 <222> (1)..(15)  
 <220>  
 <221> Nucleotídeo modificado LNA  
 20 <222> (13)..(15)  
 <400> 34  
 cattggtatt cagtgt 16  
 <210> 35  
 <211> 16  
 25 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Motivo N° 9  
 <220>  
 30 <221> Nucleotídeo modificado LNA  
 <222> (1)..(4)  
 <220>

	<221>	Ligação fosforotioato	
	<222>	(1)..(15)	
	<220>		
	<221>	Citosina LNA modificada com 5-metila	
5	<222>	(2)..(2)	
	<220>		
	<221>	Nucleotídeo modificado LNA	
	<222>	(13)..(15)	
	<400>	35	
10		gcattggtat tcagtg	16
	<210>	36	
	<211>	16	
	<212>	DNA	
	<213>	Artificial	
15	<220>		
	<223>	Motivo Nº 10	
	<220>		
	<221>	Ligação fosforotioato	
	<222>	(1)..(15)	
20	<220>		
	<221>	Nucleotídeo modificado LNA	
	<222>	(1)..(4)	
	<220>		
	<221>	Citosina LNA modificada com 5-metila	
25	<222>	(3)..(3)	
	<220>		
	<221>	Nucleotídeo modificado LNA	
	<222>	(13)..(15)	
	<220>		
30	<221>	Citosina LNA modificada com 5-metila	
	<222>	(13)..(13)	
	<400>	36	

	agcattggta ttcagt	16
	<210> 37	
	<211> 16	
	<212> DNA	
5	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Motivo Nº 11	
	<220>	
	<221> Cytosina LNA modificada com 5-metila	
10	<222> (1)..(1)	
	<220>	
	<221> Nucleotídeo modificado LNA	
	<222> (1)..(3)	
	<220>	
15	<221> Ligação fosforotioato	
	<222> (1)..(15)	
	<220>	
	<221> Nucleotídeo modificado LNA	
	<222> (13)..(15)	
20	<220>	
	<221> Cytosina LNA modificada com 5-metila	
	<222> (14)..(14)	
	<400> 37	
	cagcattggt attcag	16
25	<210> 38	
	<211> 16	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
30	<223> Motivo Nº 11	
	<220>	
	<221> Cytosina LNA modificada com 5-metila	

<222> (1)..(1)  
 <220>  
 <221> Nucleotídeo modificado LNA  
 <222> (1)..(4)  
 5 <220>  
 <221> Ligação fosforotioato  
 <222> (1)..(15)  
 <220>  
 <221> Citosina LNA modificada com 5-metila  
 10 <222> (4)..(4)  
 <220>  
 <221> Nucleotídeo modificado LNA  
 <222> (13)..(15)  
 <220>  
 15 <221> Citosina LNA modificada com 5-metila  
 <222> (14)..(14)  
 <400> 38  
 cagcattggt attcag 16  
 <210> 39  
 20 <211> 16  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Motivo N° 19  
 25 <220>  
 <221> Nucleotídeo modificado LNA  
 <222> (1)..(4)  
 <220>  
 <221> Ligação fosforotioato  
 30 <222> (1)..(15)  
 <220>  
 <221> Nucleotídeo modificado LNA

<222> (13)..(15)  
 <220>  
 <221> Citosina LNA modificada com 5-metila  
 <222> (15)..(15)  
 5 <400> 39  
 atttccatta agttct 16  
 <210> 40  
 <211> 16  
 <212> DNA  
 10 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Motivo N° 19  
 <220>  
 <221> Nucleotídeo modificado LNA  
 15 <222> (1)..(4)  
 <220>  
 <221> Ligação fosforotioato  
 <222> (1)..(15)  
 <220>  
 20 <221> Nucleotídeo modificado LNA  
 <222> (13)..(15)  
 <400> 40  
 ggtatttcca ttaagt 16  
 <210> 41  
 25 <211> 16  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Motivo N° 20  
 30 <220>  
 <221> Nucleotídeo modificado LNA  
 <222> (1)..(4)

	<220>		
	<221>	Ligação fosforotioato	
	<222>	(1)..(15)	
	<220>		
5	<221>	Citosina LNA modificada com 5-metila	
	<222>	(3)..(3)	
	<220>		
	<221>	Nucleotídeo modificado LNA	
	<222>	(13)..(15)	
10	<400>	41	
		gactcaatgg aaaagt	16
	<210>	42	
	<211>	16	
	<212>	DNA	
15	<213>	Artificial	
	<220>		
	<223>	Motivo Nº 21	
	<220>		
	<221>	Nucleotídeo modificado LNA	
20	<222>	(1)..(4)	
	<220>		
	<221>	Ligação fosforotioato	
	<222>	(1)..(15)	
	<220>		
25	<221>	Nucleotídeo modificado LNA	
	<222>	(13)..(15)	
	<400>	42	
		atgactcaat ggaaaa	16
	<210>	43	
30	<211>	16	
	<212>	DNA	
	<213>	Artificial	

<220>  
 <223> Motivo Nº 22  
 <220>  
 <221> Nucleotídeo modificado LNA  
 5 <222> (1)..(4)  
 <220>  
 <221> Citosina LNA modificada com 5-metila  
 <222> (2)..(2)  
 <220>  
 10 <221> Nucleotídeo modificado LNA  
 <222> (13)..(15)  
 <220>  
 <221> Ligação fosforotioato  
 <222> (1)..(15)  
 15 <220>  
 <221> Citosina LNA modificada com 5-metila  
 <222> (15)..(15)  
 <400> 43  
 gctaacacta agaacc

16

20 <210> 44  
 <211> 16  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>

25 <223> Motivo Nº 23  
 <220>  
 <221> Citosina LNA modificada com 5-metila  
 <222> (1)..(1)  
 <220>  
 30 <221> Nucleotídeo modificado LNA  
 <222> (1)..(4)  
 <220>

	<221>	Ligação fosforotioato	
	<222>	(1)..(15)	
	<220>		
	<221>	Citosina LNA modificada com 5-metila	
5	<222>	(3)..(3)	
	<220>		
	<221>	Nucleotídeo modificado LNA	
	<222>	(13)..(15)	
	<400>	44	
10		cactaagaac cagaag	16
	<210>	45	
	<211>	16	
	<212>	DNA	
	<213>	Artificial	
15	<220>		
	<223>	Motivo Nº 24	
	<220>		
	<221>	Citosina LNA modificada com 5-metila	
	<222>	(1)..(1)	
20	<220>		
	<221>	Nucleotídeo modificado LNA	
	<222>	(1)..(4)	
	<220>		
	<221>	Nucleotídeo modificado LNA	
25	<222>	(13)..(15)	
	<220>		
	<221>	Ligação fosforotioato	
	<222>	(1)..(15)	
	<400>	45	
30		ctaagaacca gaagat	16
	<210>	46	
	<211>	16	

<212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Motivo Nº 25  
 5 <220>  
 <221> Nucleotídeo modificado LNA  
 <222> (1)..(4)  
 <220>  
 <221> Citosina LNA modificada com 5-metila  
 10 <222> (13)..(13)  
 <220>  
 <221> Nucleotídeo modificado LNA  
 <222> (13)..(15)  
 <220>  
 15 <221> Ligação fosforotioato  
 <222> (1)..(15)  
 <400> 46  
 tgaatcgggt cgcac 16  
 <210> 47  
 20 <211> 16  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Motivo Nº 26  
 25 <220>  
 <221> Nucleotídeo modificado LNA  
 <222> (1)..(4)  
 <220>  
 <221> Ligação fosforotioato  
 30 <222> (1)..(15)  
 <220>  
 <221> Citosina LNA modificada com 5-metila

	<222>	(13)..(13)	
	<220>		
	<221>	Nucleotídeo modificado LNA	
	<222>	(13)..(15)	
5	<400>	47	
		tgaatcgggt cgcatt	16
	<210>	48	
	<211>	21	
	<212>	RNA	
10	<213>	Artificial	
	<220>		
	<223>	SiRNA não-conjugado	
	<400>	48	
		gucaucacac ugaauaccaa u	21
15	<210>	49	
	<211>	23	
	<212>	RNA	
	<213>	Artificial	
	<220>		
20	<223>	SiRNA não-conjugado	
	<400>	49	
		auugguauuc agugugauga cac	23
	<210>	50	
	<211>	21	
25	<212>	RNA	
	<213>	Artificial	
	<220>		
	<223>	SiRNA conjugado com colesterol	
	<400>	50	
30		gucaucacac ugaauaccaa u	21
	<210>	51	
	<211>	23	

	<212>	RNA	
	<213>	Artificial	
	<220>		
	<223>	siRNA conjugado com colesterol	
5	<400>	51	
		auugguauuc aguguga cac	23
	<210>	52	
	<211>	22	
	<212>	DNA	
10	<213>	Artificial	
	<220>		
	<223>	Iniciador oligonucleotídeo	
	<400>	52	
		agcctcgtcc cgtagacaaa at	22
15	<210>	53	
	<211>	24	
	<212>	DNA	
	<213>	Artificial	
	<220>		
20	<223>	Iniciador oligonucleotídeo	
	<400>	53	
		gttgatggca acaatctcca cttt	24
	<210>	54	
	<211>	21	
25	<212>	DNA	
	<213>	Artificial	
	<220>		
	<223>	Iniciador oligonucleotídeo	
	<400>	54	
30		ccttccttct tgggtatgga a	21
	<210>	55	
	<211>	21	

	<212>	DNA	
	<213>	Artificial	
	<220>		
	<223>	Iniciador oligonucleotídeo	
5	<400>	55	
		gctcaggagg agcaatgac t	21
	<210>	56	
	<211>	22	
	<212>	DNA	
10	<213>	Artificial	
	<220>		
	<223>	Iniciador oligonucleotídeo	
	<400>	56	
		gccattgtg gacaagttga tc	22
15	<210>	57	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	Artificial	
	<220>		
20	<223>	Iniciador oligonucleotídeo	
	<400>	57	
		ccaggacttg gaggtcttgg a	21
	<210>	58	
	<211>	24	
25	<212>	DNA	
	<213>	Artificial	
	<220>		
	<223>	Sonda mApoB Taqman	
	<400>	58	
30		aagccagggc ctatctccgc atcc	24
	<210>	59	
	<211>	8	

	<212>	DNA	
	<213>	Artificial	
	<220>		
	<223>	Motivo alvo	
5	<400>	59	
		gtattcag	8
	<210>	60	
	<211>	8	
	<212>	DNA	
10	<213>	Artificial	
	<220>		
	<223>	Motivo alvo	
	<400>	60	
		ggtattca	8
15	<210>	61	
	<211>	8	
	<212>	DNA	
	<213>	Artificial	
	<220>		
20	<223>	Motivo alvo	
	<400>	61	
		tcagcatt	8
	<210>	62	
	<211>	8	
25	<212>	DNA	
	<213>	Artificial	
	<220>		
	<223>	Motivo alvo	
	<400>	62	
30		gcattggt	8
	<210>	63	
	<211>	29	

<212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Motivo alvo  
 5 <400> 63  
 aaagttcagc attggtattc agtgtgatg 29  
 <210> 64  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 10 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Motivo alvo  
 <400> 64  
 ggtatttcca ttaagttct 19  
 15 <210> 65  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 20 <223> Motivo alvo  
 <400> 65  
 atgactcaat ggaaaagt 18  
 <210> 66  
 <211> 24  
 25 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Motivo alvo  
 <400> 66  
 30 cactaagaac cagaaccaga agat 24  
 <210> 67  
 <211> 16

<212> DNA  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Motivo alvo  
5 <400> 67  
tgaatcgggt cgcaty 16  
<210> 68  
<211> 18  
<212> DNA  
10 <213> Artificial  
<220>  
<223> Subseqüência/motivo oligo preferido  
<400> 68  
tcttgttctg aatgtcca 18

## REIVINDICAÇÕES

1. Composto oligomérico consistindo em um total de 12-50 nucleotídeos e/ou análogos de nucleotídeos, caracterizado pelo fato de que o dito composto compreende uma subsequência de pelo menos 10 nucleotídeos ou análogos de nucleotídeos, a dita subsequência correspondo a uma seqüência selecionada do grupo consistindo em SEQ ID NOS: 59, 60, 61, 62, 63, 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 e 17, em que o dito composto compreende pelo menos 3 análogos de nucleotídeos.
2. Composto de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que consiste em um oligonucleotídeo de fita dupla, em que cada fita compreende um total de 16-30 nucleotídeos e/ou análogos de nucleotídeos, em que o dito composto compreende uma subsequência de pelo menos 10 nucleotídeos ou análogos de nucleotídeos, a dita subsequência estando localizada dentro de uma seqüência selecionada de SEQ ID NOS: 59, 60, 61, 62, 63, 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 e 17, em que o dito composto compreende pelo menos 3 análogos de nucleotídeos.
3. Composto de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a dita subsequência compreende os ditos pelo menos três análogos de nucleotídeos.
4. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que a dita subsequência compreende um estiramento de 2-6 análogos de nucleotídeos, seguido por um estiramento de 4-12 nucleotídeos, que é seguido por um estiramento de 2-6 análogos de nucleotídeos.
5. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que a dita subsequência compreende 1 ou 2 desemparelhamentos quando comparada com a correspondente seqüência na dita seqüência selecionada do grupo consistindo em SEQ ID NOS: 59, 60, 61, 62, 63, 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 e 17.
6. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que consiste em 12-25 nucleotídeos ou análogos de nucleotídeos.

7. Composto de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que consiste em 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, ou 22 nucleotídeos ou análogos de nucleotídeos.

5 8. Composto de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que consiste em 15 ou 16 nucleotídeos ou análogos de nucleotídeos.

9. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que os ditos nucleotídeos compreendem um grupo de ligação selecionado do grupo consistindo em um grupo fosfato, um grupo fosforotioato, e um grupo boranofosfato, a ligação internucleosídeo  
10 podendo ser  $-O-P(O)_2-O-$ ,  $-O-P(O,S)-O-$ .

10. Composto de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que a dita ligação é um grupo fosfato.

11. Composto de acordo com a reivindicação 9, caracterizado  
15 pelo fato de que a dita ligação é um grupo fosforotioato.

12. Composto de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que todas as ligações são grupos fosforotioato.

13. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, caracterizado pelo fato de que compreende de 3-12 análogos de nucleotídeos.  
20

14. Composto de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que compreende 6 ou 7 análogos de nucleotídeos.

15. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, caracterizado pelo fato de que pelo menos um dos ditos análogos de nucleotídeos é um ácido nucléico fechado (LNA), assim como pelo menos  
25 três, ou todos os análogos de nucleotídeos são LNA.

16. Composto de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que o LNA é selecionado de beta-D-óxi-LNA, alfa-L-óxi-LNA, beta-D-amino-LNA e beta-D-tio-LNA.

17. Composto de acordo com a reivindicação 16, caracterizado  
30 pelo fato de que os ditos nucleosídeos e/ou LNAs são ligados por meio de grupo fosfato ou fosforotioato.

18. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, caracterizado pelo fato de que a subsequência é selecionada do grupo consistindo em: SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 e SEQ ID NO: 11.

5 19. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 18, caracterizado pelo fato de que a subsequência é selecionada do grupo consistindo em: SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, e SEQ ID NO: 12.

10 20. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 19, caracterizado pelo fato de que apresenta a fórmula

5'-[(LNA)2-6-(DNA/RNA)4-12-(LNA)2-6-(AND-RNA)0-1]-3' ou

5'-[(LNA)3-4-(DNA/RNA)8-9-(LNA)3-(AND/RNA)1]-3'

em que "LNA" designa um nucleotídeo LNA e "DNA" e "RNA" designam um desoxirribonucleotídeo e um ribonucleotídeo, respectivamente.

15 21. Composto, caracterizado pelo fato de que é selecionado do grupo consistindo em SEQ ID NOS: 29, 30, 31, 34, 35, 36, 37, ou 38.

22. Composto de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que é SEQ ID NO: 29.

20 23. Composto de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que é SEQ ID NO: 30.

24. Composto de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que é SEQ ID NO: 37.

25 25. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 24, caracterizado pelo fato de que consiste em 13 ou 14 nucleotídeos ou análogos de nucleotídeos.

26. Conjugado, caracterizado pelo fato de que compreende o composto como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 25, e pelo menos uma porção não-nucleotídeo ou não-polinucleotídeo ligada covalentemente ao dito composto.

30 27. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende um composto como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 25 ou um conjugado como definido na reivindicação 26, e um dilu-

ente, veículo ou adjuvante farmacêuticamente aceitável.

28. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 27, caracterizada pelo fato de que é adaptada para administração oral.

29. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 27  
5 ou 28, caracterizada pelo fato de que ainda compreende pelo menos um composto de diminuição de colesterol.

30. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 29, caracterizada pelo fato de que o dito composto é selecionado do grupo consistindo em resinas seqüestrantes de sal de bile (por exemplo, colestiramina, colestipol, e cloridrato de colesevelam), inibidores de HMGCoA redutase (por  
10 exemplo, lovastatina, cerivastatina, prevastatina, atorvastatina, simvastatina, e fluvastatina), ácido nicotínico, derivados de ácido fibríco (por exemplo, clofibrato, gemfibrozil, fenofibrato, bezafibrato e ciprofibrato), probucol, neomicina, dextrotiroxina, ésteres de estanol de planta, inibidores de absorção de  
15 colesterol (por exemplo, ezetimibe), implitapide, inibidores de transportadores de ácido de bile (transportadores de ácido de bile dependentes de sódio apical), reguladores de CYP7a hepática, terapêuticas de substituição de estrogênio (por exemplo, tamoxifeno), e antiinflamatórios (por exemplo, glucocorticóides).

20 31. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 25 ou um conjugado como definido na reivindicação 26, caracterizado pelo fato de que é para uso como um medicamento.

32. Uso de um composto como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 25 ou um conjugado como definido na reivindicação 26,  
25 caracterizado pelo fato de que é para a fabricação de um medicamento para o tratamento de níveis anormais de Apo-B100.

33. Uso de acordo com a reivindicação 32, caracterizado pelo fato de que os ditos níveis anormais de Apo-B100 estão correlacionados à presença de uma condição médica selecionada do grupo consistindo em:  
30 aterosclerose, hipercolesterolemia ou hiperlipidemia.

34. Método de tratamento de um sujeito sofrendo de uma doença ou condição selecionada de aterosclerose, hipercolesterolemia, e hiperli-

pidemia, caracterizado pelo fato de que compreende a etapa de administração de um conjugado como definido na reivindicação 26 ou uma composição farmacêutica como definida em qualquer uma das reivindicações 27 a 30, ao sujeito em sua necessidade.

5                   35. Método de acordo com a reivindicação 34, caracterizado pelo fato de que o conjugado ou a composição farmacêutica é administrada oralmente.

10                   36. Método para regulação descendente de apolipoproteína B, caracterizado pelo fato de que compreende a etapa de administração de um conjugado como definido na reivindicação 26 ou uma composição farmacêutica como definida em qualquer uma das reivindicações 27 a 30, a um sujeito, tal como o sujeito definido na reivindicação 34.

Fig.1A

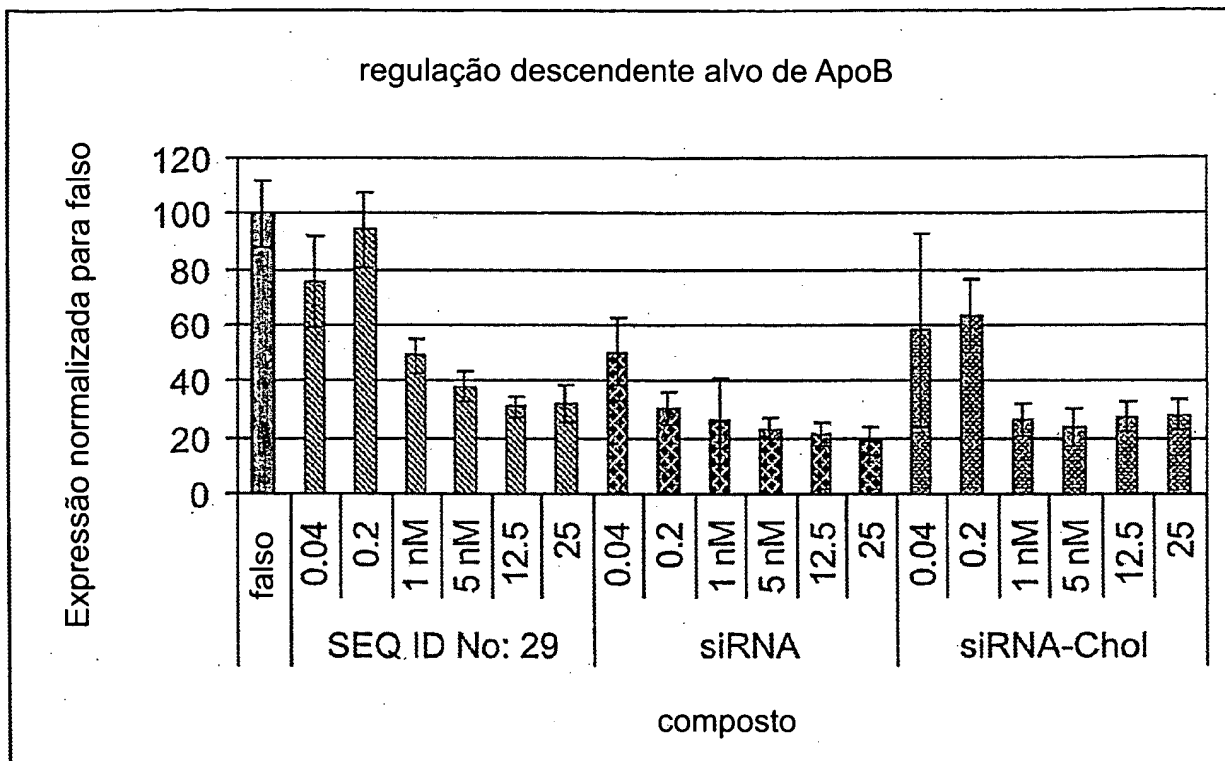


Fig.1B

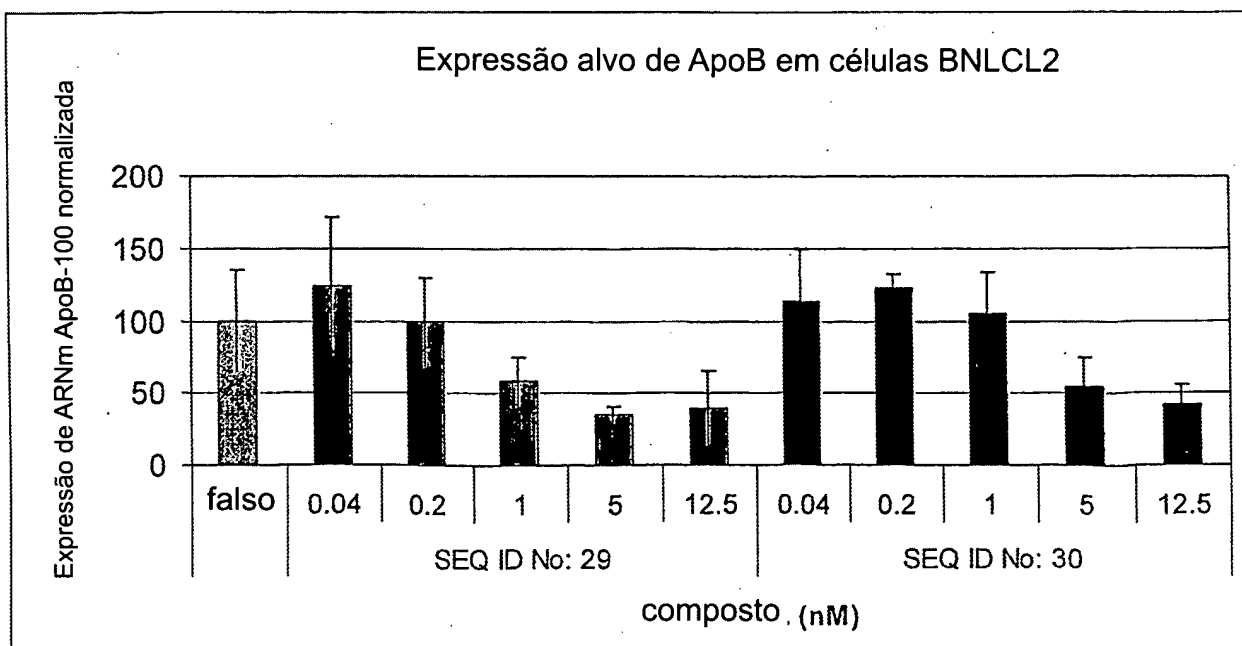


Fig.2A

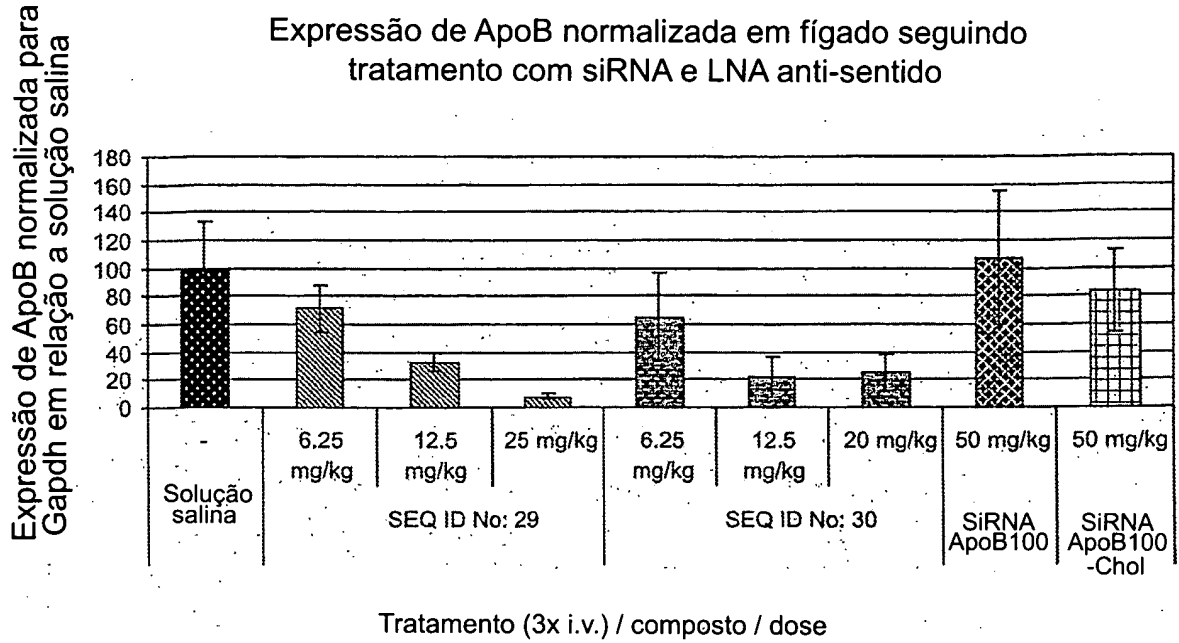


Fig.2B

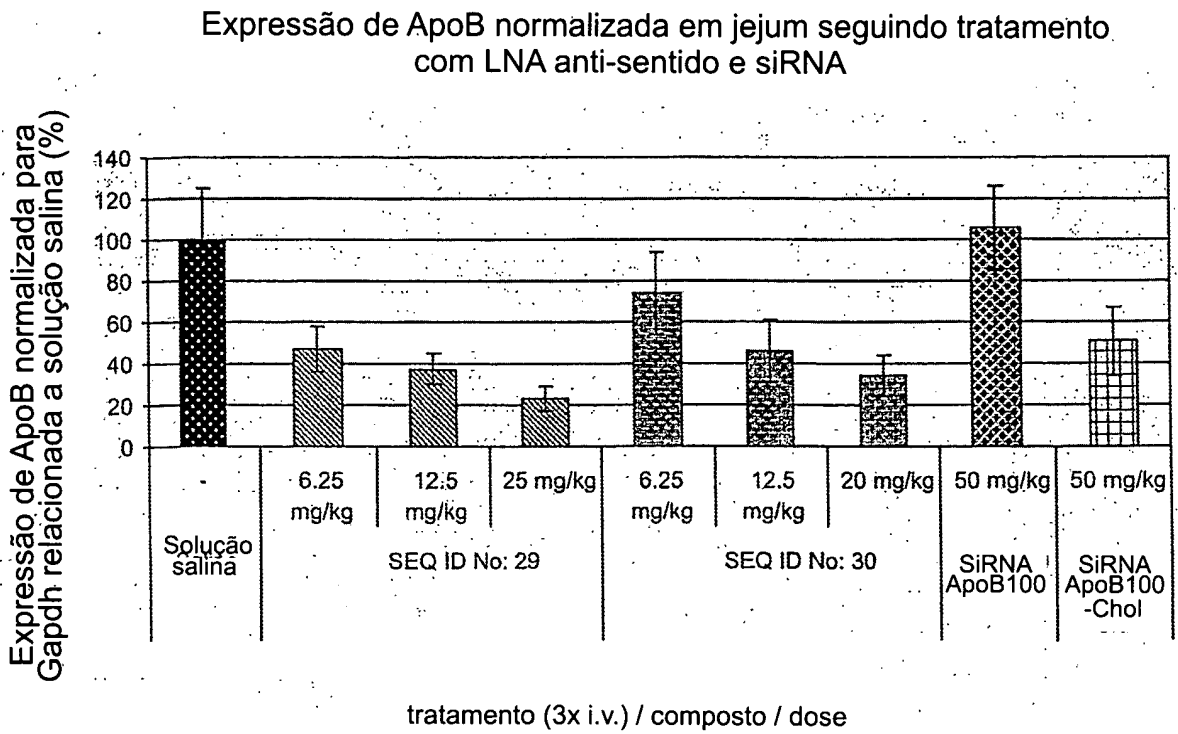


Fig.3

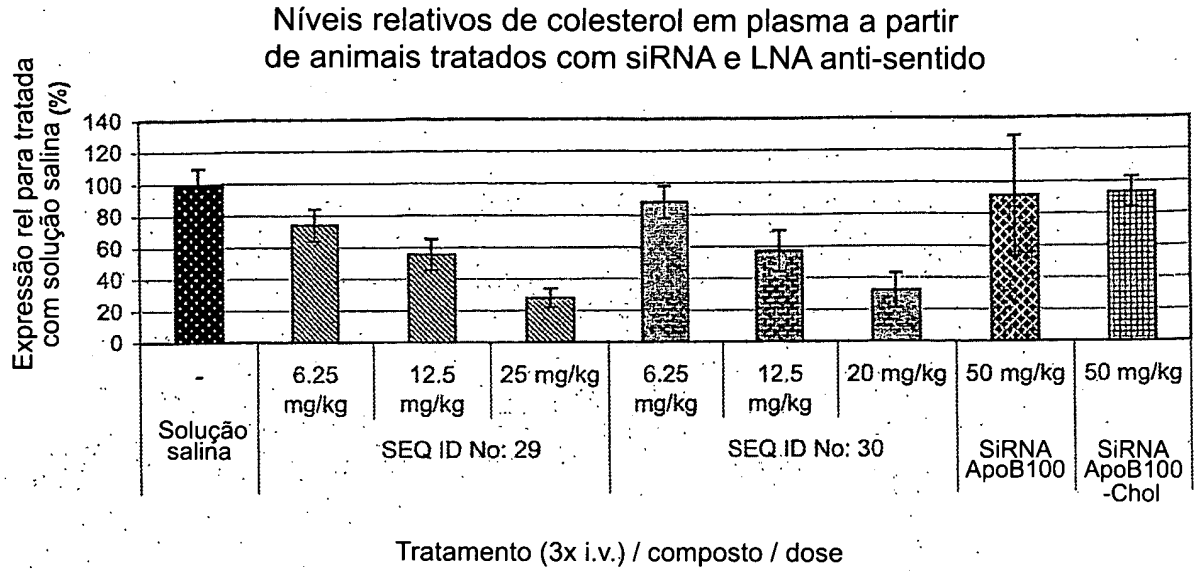


Fig.4

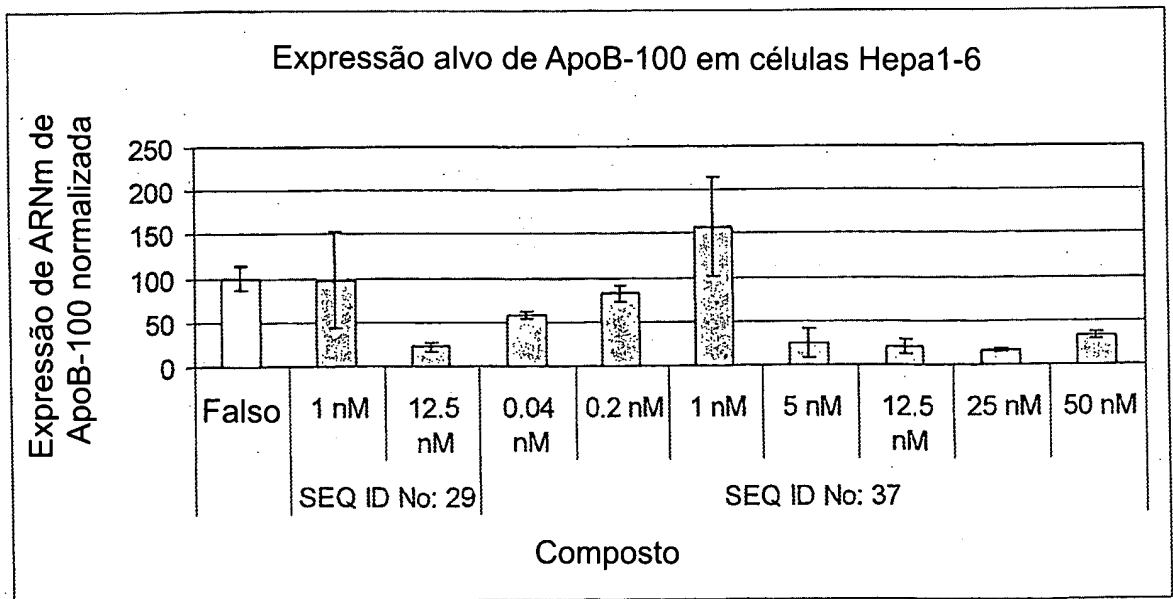


Fig.5A

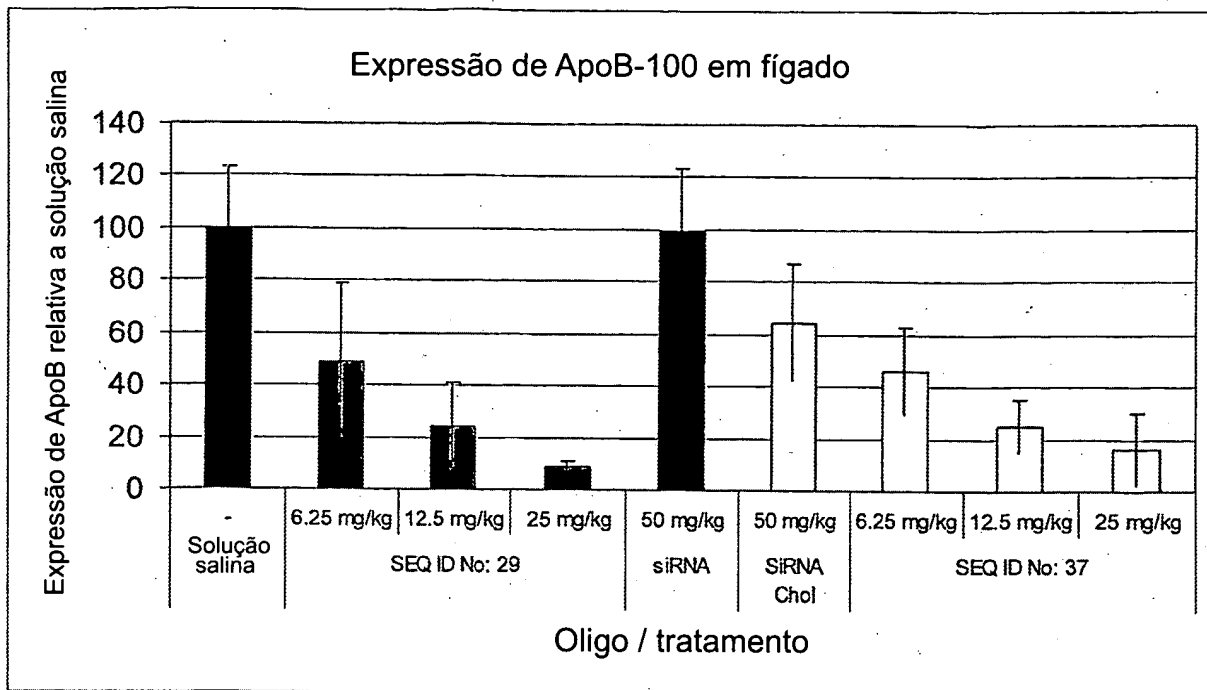


Fig.5B

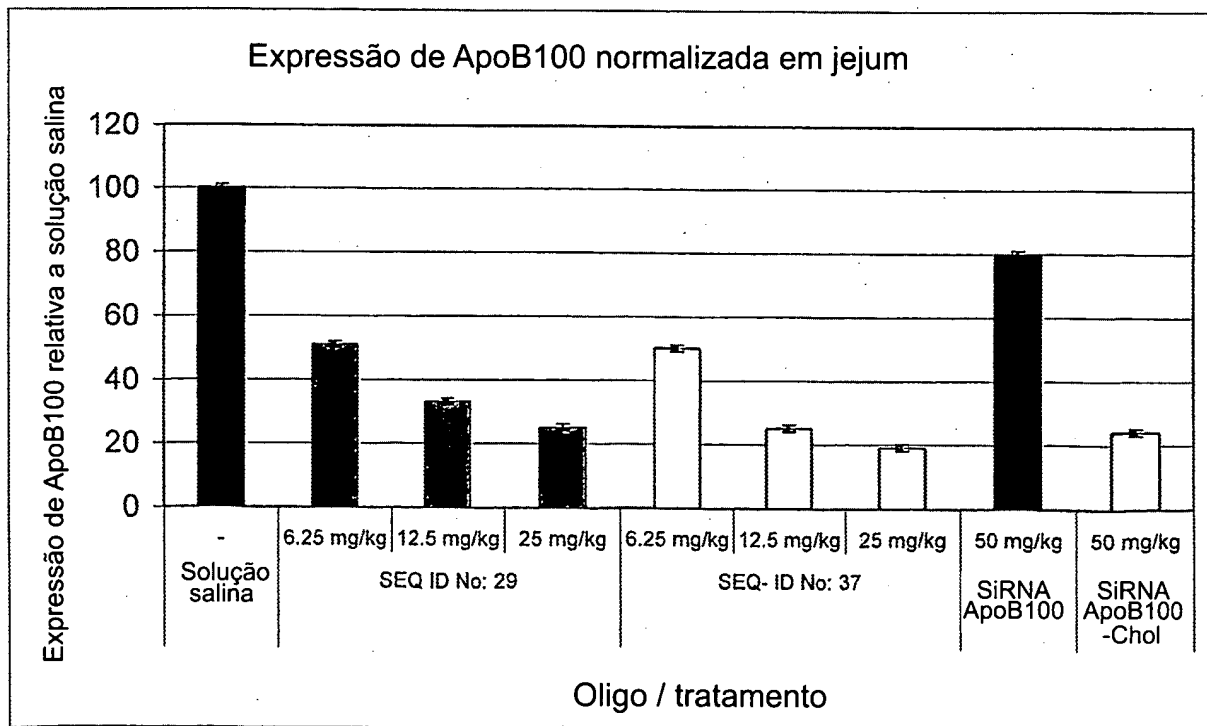


Fig.6A

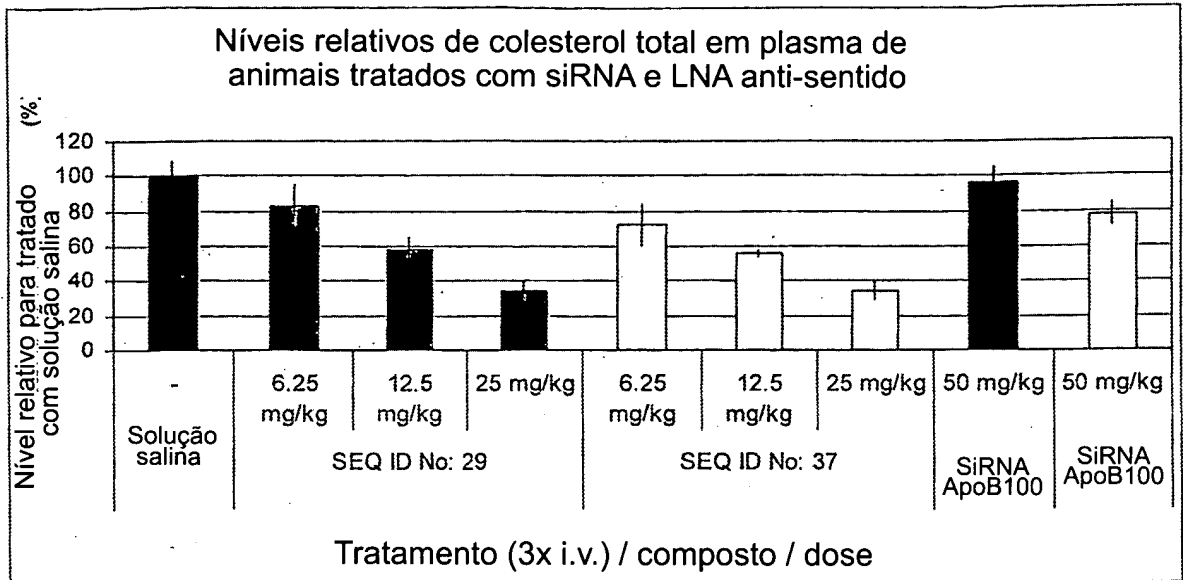


Fig.6B

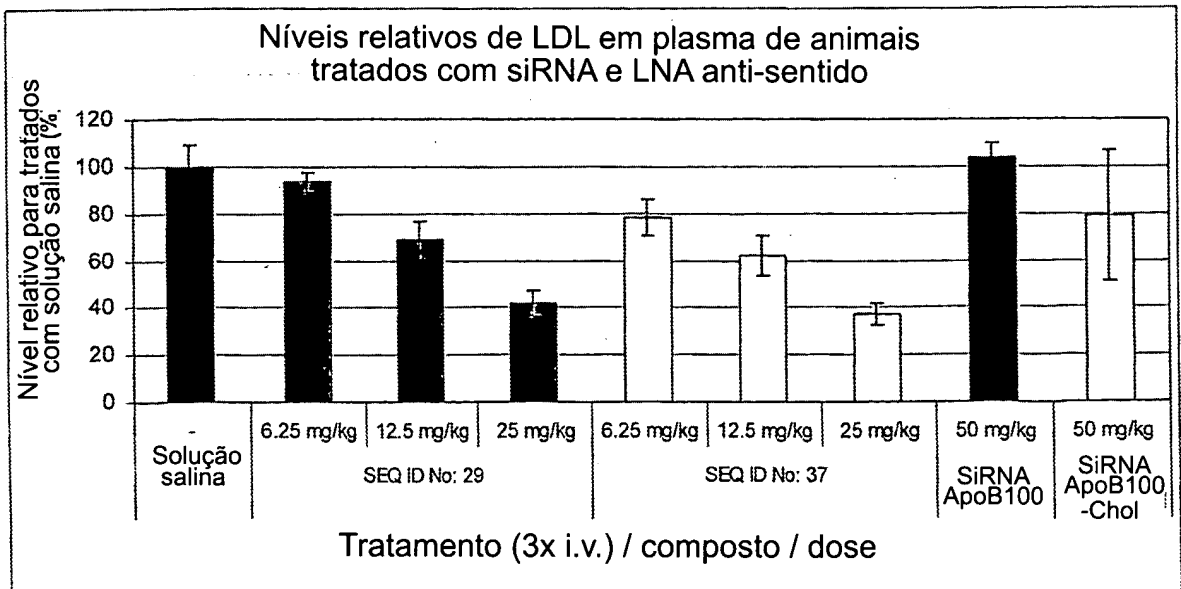


Fig.7

GTATTCAG	SEQ ID No. 59
GGTATTCA	SEQ ID No. 60
TCAGCATT	SEQ ID No. 61
GCATTGGT	SEQ ID No. 62
AAAGTTCAGCATTGGTATTCAGTGTGATG	SEQ ID No. 63
GGTATTCAGTGTGATG	SEQ ID No. 2
ATTGGTATTCAGTGTG	SEQ ID No. 3
CAGCATTGGTATTCAG	SEQ ID No. 11
TGGTATTCAGTGTGAT	SEQ ID No. 6
TTGGTATTCAGTGTGA	SEQ ID No. 7
CATTGGTATTCAGTGT	SEQ ID No. 8
GCATTGGTATTCAGTG	SEQ ID No. 9
AGCATTGGTATTCAGT	SEQ ID No. 10
CAGCATTGGTATTCAG	SEQ ID No. 11
TCAGCATTGGTATTCA	SEQ ID No. 12
TTCAGCATTGGTATTC	SEQ ID No. 13
GTTCAGCATTGGTATT	SEQ ID No. 14
AGTTCAGCATTGGTAT	SEQ ID No. 15
AAGTTCAGCATTGGTA	SEQ ID No. 16
AAAGTTCAGCATTGGT	SEQ ID No. 17
GGTATTTCCATTAAGTTCT	SEQ ID No. 64
ATTTCCATTAAGTTCT	SEQ ID No. 18
GGTATTTCCATTAAGT	SEQ ID No. 19
ATGACTCAATGGAAAAGT	SEQ ID No. 65
GACTCAATGGAAAAGT	SEQ ID No. 20
ATGACTCAATGGAAAA	SEQ ID No. 21
CACTAAGAACCAGAACCAGAAGAT	SEQ ID No. 66
GCTAACACTAAGAACC	SEQ ID No. 22
CACTAAGAACCAGAAG	SEQ ID No. 23
CTAAGAACCAGAAGAT	SEQ ID No. 24
TGAATCGGGTCCGATY	SEQ ID No. 67
TGAATCGGGTCCGATC	SEQ ID No. 25
TGAATCGGGTCCGATT	SEQ ID No. 26
TCTTGTTCTGAATGTCCA	SEQ ID No. 68
TTGTTCTGAATGTCCA	SEQ ID No 4.
TCTTGTTCTGAATGTC	SEQ ID No 5.

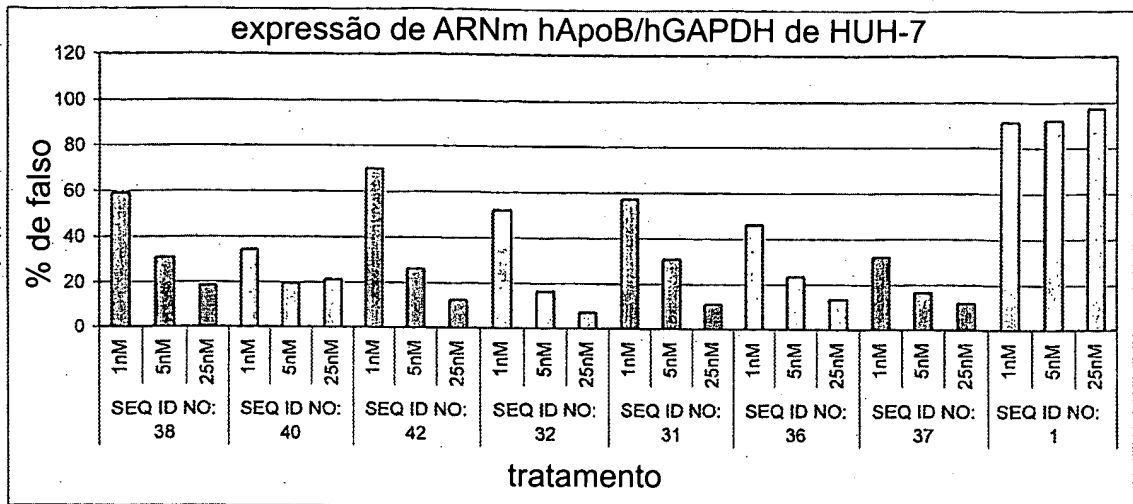


Fig.8

IC <sub>50</sub> / ASO	SEQ ID NO: 38	SEQ ID NO: 40	SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO: 32	SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 36	SEQ ID NO: 37
nM	5.7	1.5	3.5	3.5	1	0.5	0.5

Fig.9

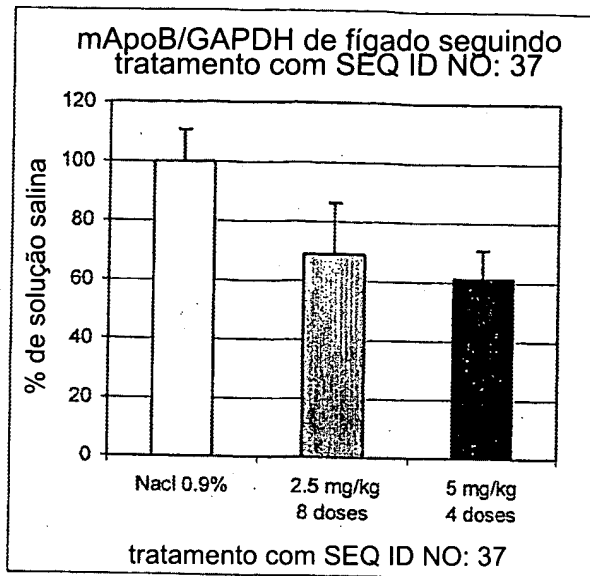


Fig.10A

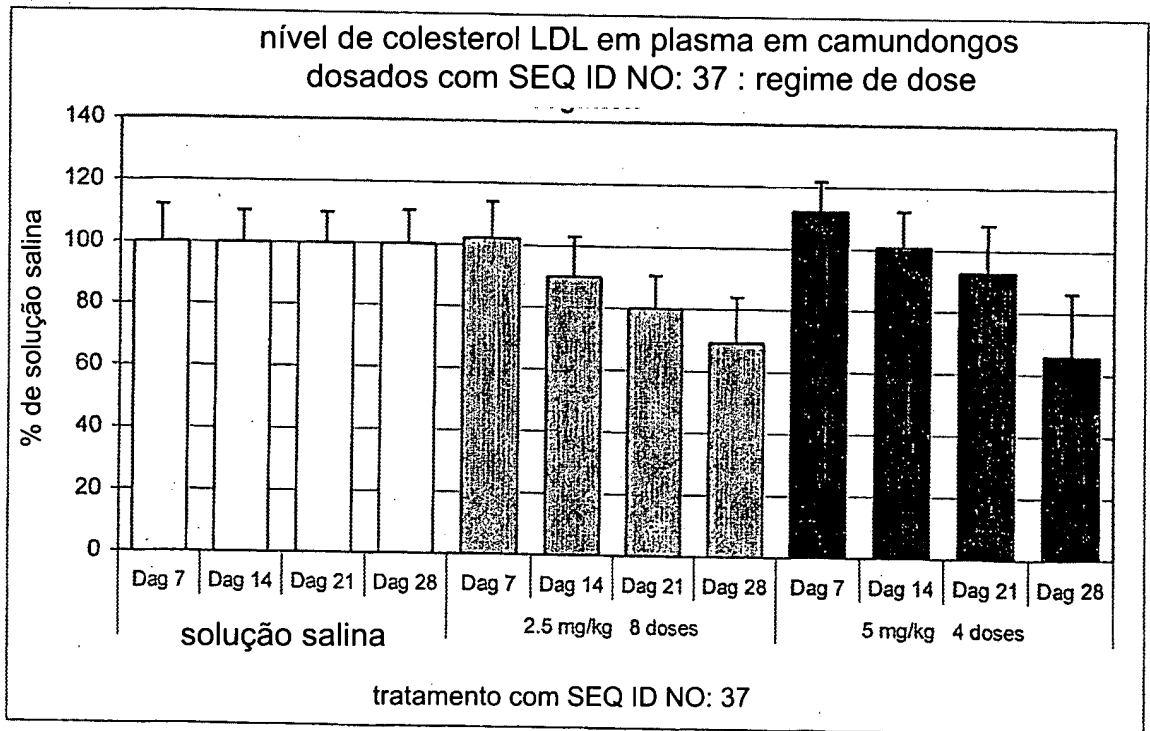


Fig.10B

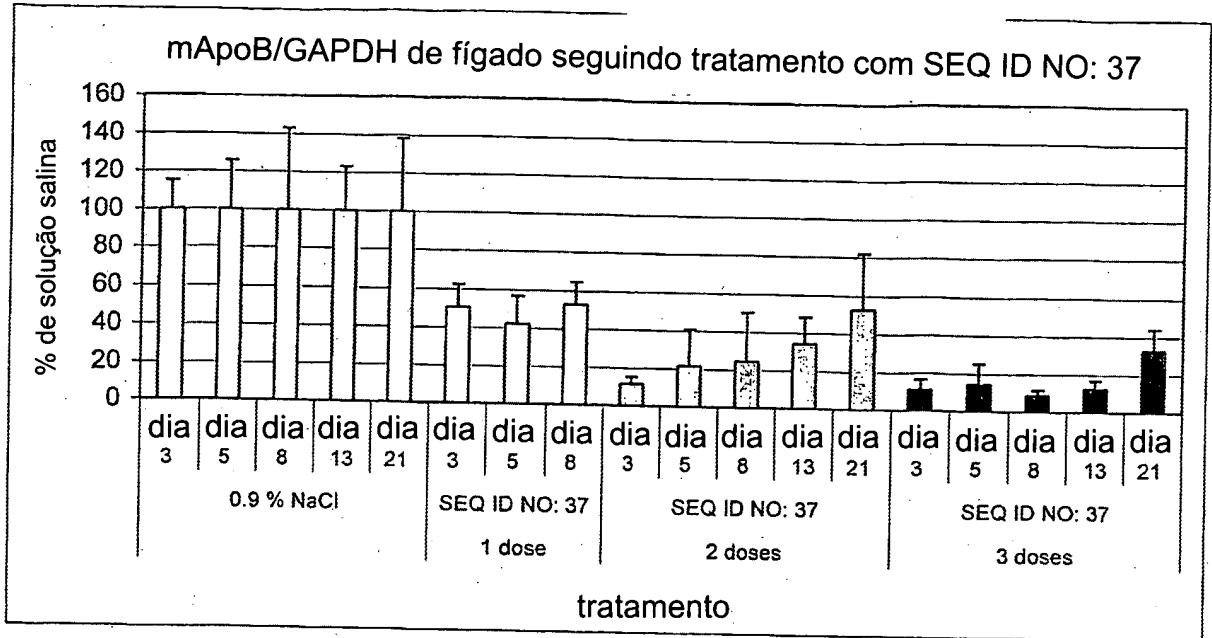


Fig.11A

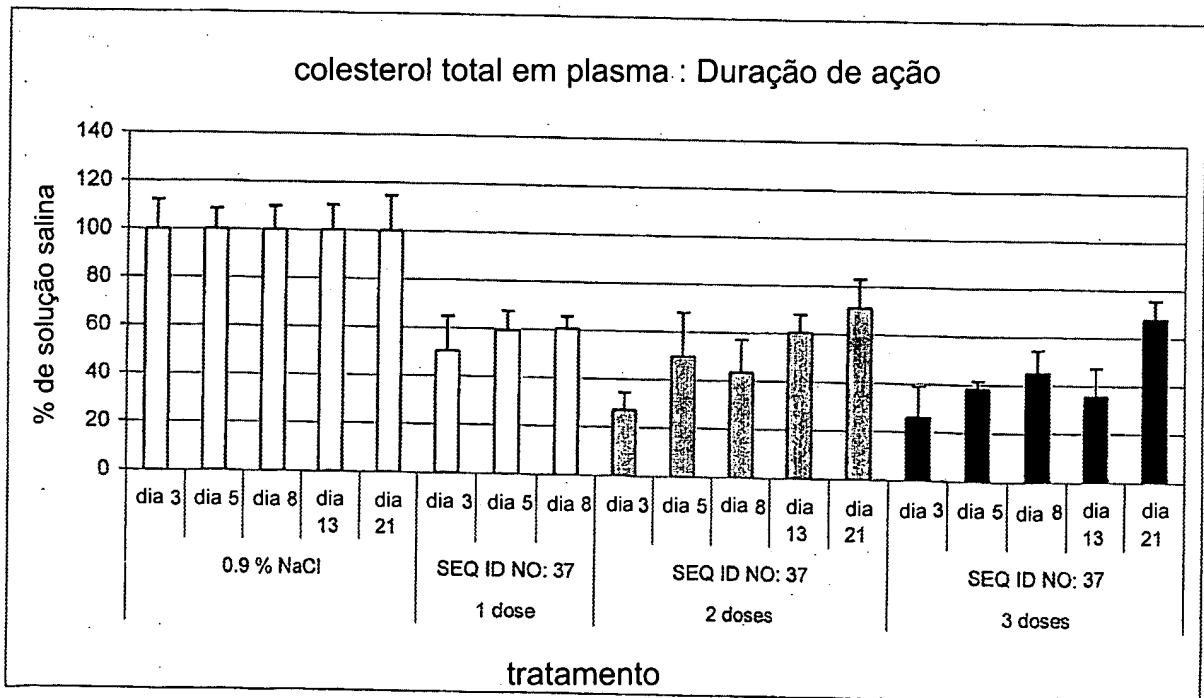


Fig.11B

**RESUMO**

Patente de Invenção: **"COMPOSTOS ANTAGONISTAS DE RNA PARA A INIBIÇÃO DE EXPRESSÃO DE APO-B100"**.

A presente invenção refere-se a oligonucleotídeos direcionados  
5 contra o gene Apo-B100 são providos para modulação de expressão de  
Apo-B100. As composições compreendem oligonucleotídeos, particularmen-  
te oligonucleotídeos anti-sentido, alvejados para ácidos nucléicos codifican-  
do Apo-B100. Métodos de utilização destes compostos para modulação de  
expressão de Apo-B100 e para o tratamento de doenças associadas com  
10 superexpressão de Apo-B100, expressão de Apo-B100 com mutação ou  
ambas são providos. Exemplos de doenças são câncer tais como cânceres  
de pulmão, mama, cólon, próstata, pâncreas, pulmão, fígado, tiróide, rim,  
cérebro, testículos, estômago, intestinos, cordão espinhal, sinos, bexiga, tra-  
to urinário ou ovário. Os oligonucleotídeos podem ser compostos por deso-  
15 xirribonucleosídeos ou um análogo de ácido nucléico tal como por exemplo,  
ácido nucléico fechado ou uma combinação dos mesmos.