

(11) *Número de Publicação:* **PT 788366 E**

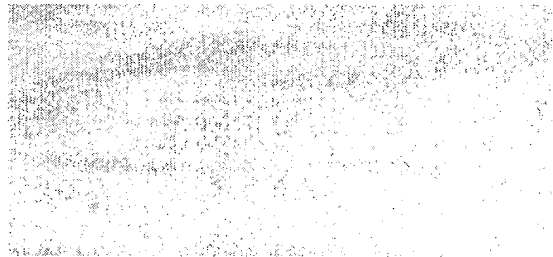
(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 6 )  
A61K031/70 A

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

<p>(22) <i>Data de depósito:</i> 1995.10.17</p> <p>(30) <i>Prioridade:</i> 1994.10.25 US 328520</p> <p>(43) <i>Data de publicação do pedido:</i> 1997.08.13</p> <p>(45) <i>Data e BPI da concessão:</i> 1999.12.15</p>	<p>(73) <i>Titular(es):</i> HYBRIDON, INC. 155 FORTUNE BOULEVARD MILFORD, MA 01757 US</p> <p>(72) <i>Inventor(es):</i> ROBERT B. DIASIO US RUIWEN ZHANG US SUDHIR AGRAWAL US</p> <p>(74) <i>Mandatário(s):</i> ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA RUA DAS FLORES 74 4/AND. 1294 LISBOA PT</p>
--	---

(54) *Epígrafe:* URILIZAÇÃO DE OLIGONUCLEÓTIDOS SUBSTITUÍDOS EM 2' PARA A REGULAÇÃO NO SENTIDO DE REDUZIR DA EXPRESSÃO DE GENES

(57) *Resumo:*





## DESCRIÇÃO

**“Utilização de oligonucleótidos substituídos em 2’ para a regulação, no sentido de reduzir, da expressão de genes”**

### ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se ao controlo da expressão de genes. Mais particularmente, a presente invenção refere-se à utilização de oligonucleótidos sintéticos para regular no sentido de reduzir a expressão de um gene num animal.

O potencial para o desenvolvimento de uma abordagem terapêutica à base de oligonucleótidos anti-sentido foi primeiro sugerido em três artigos publicados em 1977 e 1978. Paterson *et al.* (*Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* (1977) **74**:4370-4374) revelam que a tradução de ARNm isento de células pode ser inibida através da ligação de um oligonucleótido complementar ao ARNm. Zamecnik *et al.* (*Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* (1978) **75**:280-284 e 285-288) revelam que um oligonucleótido 13-mero sintético que é complementar a uma parte do genoma do vírus do sarcoma de Rous (RSV) inibe a replicação do RSV em fibroblastos de frango infectados e inibe a transformação mediada por RSV de fibroblastos primários de frango em células malignas de sarcoma.

Estas primeiras indicações de que se poderiam utilizar oligonucleótidos sintéticos para inibir a propagação de vírus e a neoplasia foram seguidas pela utilização de oligonucleótidos sintéticos para inibir uma vasta variedade de vírus, tais como HIV (veja-se, *e.g.*, Patente dos E.U.A. No. 4 806 463); vírus de influenza (veja-se, *e.g.*, Laiter *et al.* (1990) (*Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **87**:3430-3434); vírus da estomatite vesicular (veja-se, *e.g.*, Agris *et al.* (1986) *Biochem.* **25**:6268-6275); vírus do herpes simples (veja-se, *e.g.*, Gao *et al.* (1990) *Antimicrob. Agents Chem.* **34**:808-812); SV40 (veja-se, *e.g.*, Birg *et al.* (1990) (*Nucleic Acids Res.* **18**:2901-2908); e vírus de papiloma humano (veja-se, *e.g.*, Storey *et al.* (1991) (*Nucleic Acids Res.* **19**:4109-4114). A utilização de oligonucleótidos sintéticos e seus análogos como agentes antivirais foi recentemente revista de modo extensivo por Agrawal (*Trends in Biotech.* (1992) **10**:152-158).

Em adição, têm sido utilizados oligonucleótidos sintéticos para inibir vários patogénios não virais, bem como para inibir selectivamente a expressão de certos genes celulares. Assim, a utilidade dos oligonucleótidos sintéticos como agentes para inibir a propagação de vírus, a propagação de patogénios não virais e a expressão selectiva de genes celulares tem sido bem estabelecida.

Mais recentemente foram desenvolvidos oligonucleótidos melhorados com maior eficácia na inibição destes vírus, patogénios e expressão selectiva de genes. Mostrou-se que alguns destes oligonucleótidos com modificações nas suas ligações internucleótidos são mais eficazes do que as suas contrapartidas não modificadas. Por exemplo, Agrawal *et al.* (*Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* (1988) **85**:7079-7083) ensina que oligonucleótido-fosforotioatos e certos oligonucleótido-fosforamidatos são mais eficazes na inibição do HIV-1 do que oligodesoxinucleótidos convencionais ligados por fosfodiéster. Agrawal *et al.* (*Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* (1989) **86**:7790-7794) revelam a vantagem de oligonucleótido-fosforotioatos na inibição do HIV-1 em células infectadas precocemente e de forma crónica.

Em adição, desenvolveram-se oligonucleótidos quiméricos possuindo mais do que um tipo de ligações internucleótidos no interior do oligonucleótido. Pederson *et al.* (As patente dos E.U.A. No. 5 149 797 e 5 220 007 revelam oligonucleótidos quiméricos possuindo uma sequência nuclear de oligonucleótido-fosfodiéster ou oligonucleótido-fosforotioato flanqueada por nucleótido-metilfosfonatos ou -fosforamidatos. Furdon *et al.* (*Nucleic Acids Res.* (1989) **17**:9193-9204) revelam oligonucleótidos quiméricos possuindo regiões de oligonucleótido-fosfodiésteres em adição a regiões de oligonucleótido-fosforotioato ou -metilfosfonato. Quartin *et al.* (*Nucleic Acids Res.* (1989) **17**:7523-7562) revelam oligonucleótidos quiméricos possuindo regiões de oligonucleótido-fosfodiésteres e oligonucleótido-metilfosfonatos. Inoue *et al.* (*FEBS Lett.* (1987) **215**:237-250) revelam oligonucleótidos quiméricos possuindo regiões de desoxirribonucleótidos e 2'-O-metilribonucleótidos.

Muitos destes oligonucleótidos modificados contribuíram para melhorar a eficácia potencial da abordagem terapêutica com base em oligonucleótidos anti-sentido. Contudo, permanecem certas deficiências nos oligonucleótidos conhecidos e estas deficiências podem limitar a eficácia destes oligonucleótidos

como agentes terapêuticos. Por exemplo, Wickstrom (*J. Biochem. Biophys. Meth.* (1986) **13**:97-102) ensinam que os oligonucleótido-fosfodiésteres são susceptíveis a degradação mediada por nucleases, limitando desse modo a sua biodisponibilidade *in vivo*. Agrawal *et al.* (*Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* (1990) **87**:1401-1405) ensinam que os oligonucleótido-fosforamidatos ou -metilfosfonatos, quando hibridados a ARN, não activam a ARNase H, cuja activação pode ser importante para a função de oligonucleótidos anti-sentido. Assim, existe uma necessidade de métodos de controlo da expressão de genes que utilize oligonucleótidos com características terapêuticas melhoradas.

Foram publicados diversos relatórios relativos ao desenvolvimento de oligonucleótidos ligados por fosforotioato como potenciais agentes terapêuticos anti-SIDA. Apesar de extensos estudos dos mecanismos molecular e químico dos oligonucleótidos terem demonstrado o valor potencial desta nova estratégia terapêutica, pouco se conhece acerca da farmacocinética e do metabolismo destes compostos *in vivo*.

Recentemente, foram publicados vários estudos preliminares sobre este tópico. Agrawal *et al.* (*Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* (1991) **88**:7595-7599) descrevem a administração a ratinhos, intravenosa e intraperitoneal, de um oligonucleótido 20-mero ligado por fosforotioato. Neste estudo, aproximadamente 30% da dose administrada foi excretada na urina ao longo das primeiras 24 horas com acumulação preferencial no fígado e nos rins. As semi-vidas no plasma variaram de cerca de 1 hora ( $t_{1/2\alpha}$ ) e 40 horas ( $t_{1/2\beta}$ ), respectivamente. Foram reportados resultados semelhantes em estudos subsequentes (Iversen (1991) *Anti-Cancer Drug Design* **6**:531-538; Iversen (1994) *Antisense Res. Devel.* **4**:43-52; e Sands (1994) *Mol. Pharm.* **45**:932-943). Contudo, podem existir problemas de estabilidade quando são administrados oligonucleótidos por via intravenosa e intraperitoneal.

Assim, permanece uma necessidade para desenvolver métodos terapêuticos mais eficazes para a regulação, no sentido de reduzir, da expressão de genes, que possam ser facilmente manipulados de modo a se adequarem ao animal e à condição a tratar, e ao gene que se pretende atingir. Preferivelmente, estes métodos devem ser simples, indolores e precisos quanto ao gene alvo.

## SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção proporciona uma formulação para a regulação, no sentido de reduzir, da expressão de um gene num animal que envolve a administração de um oligonucleótido complementar ao gene através de uma via oral, evitando desse modo as complicações que podem ser experimentadas durante o modo de administração intravenosa e outros modos de administração *in vivo*.

Verificou-se que certos oligonucleótidos (com ligações que não de fosfodiéster e possuindo pelo menos um ribonucleótido substituído em 2' no seu terminal 3') são relativamente estáveis *in vivo* após administração oral a um animal, e que essas moléculas são absorvidas com sucesso a partir do tracto gastrointestinal e distribuídas a vários tecidos corporais. Esta verificação foi explorada de modo a desenvolver a presente invenção, a qual consiste numa formulação para a regulação, no sentido de reduzir, da expressão de um gene num animal.

Utilizando a invenção, administra-se oralmente uma formulação farmacêutica contendo um oligonucleótido complementar ao gene alvo num transportador farmacêuticamente aceitável, ao animal portador do gene. O oligonucleótido inibe a expressão do gene, desse modo regulando no sentido de reduzir a sua expressão.

Para as finalidades da invenção, o termo "animal" pretende englobar humanos, bem como outros mamíferos, bem como répteis anfíbios e insectos. A expressão "administração oral" refere-se ao fornecimento da formulação através da boca por ingestão ou através de outra parte do sistema gastrointestinal incluindo o esófago.

Tal como aqui se utiliza, o termo "oligonucleótido" pretende incluir polímeros de dois ou mais nucleótidos ou análogos nucleotídicos ligados mutuamente através de ligações internucleótidos 5' para 3' que podem incluir quaisquer ligações que são conhecidas na arte dos anti-sentido. Estas moléculas possuem um terminal 3' e um terminal 5'. O oligonucleótido em particular que é

administrado inclui pelo menos um ribonucleótido substituído em 2', e possui ligações internucleótidos que não ligações fosfodiéster.

Para os fins da invenção, a expressão "oligonucleótido substituído em 2'" refere-se a um oligonucleótido possuindo um açúcar ligado a um grupo químico que não um grupo hidroxilo na sua posição 2'. O OH em 2' da molécula de ribose pode ser substituído por -O-alquilo inferior contendo 1-6 átomos de carbono, arilo ou arilo substituído ou alilo possuindo 2-6 átomos de carbono, *e.g.*, 2'-O-alilo, 2'-O-arilo, 2'-O-alquilo (tal como 2'-O-metilo), 2'-halo ou 2'-amino, mas não por 2'-H, em que os grupos alilo, arilo ou alquilo podem ser não substituídos ou substituídos, *e.g.*, com halogéneo, grupos hidroxil, trifluorometilo, ciano, nitro, acilo, aciloxi, alcoxi, carboxilo, carbalcoxilo ou amino.

A expressão "oligonucleótido ligado por ligações que não fosfodiéster", tal como aqui utilizado, significa um oligonucleótido em que todos os seus nucleótidos estão covalentemente ligados através de uma ligação sintética, *i.e.*, uma ligação que não uma ligação fosfodiéster, entre a extremidade 5' de um nucleótido e a extremidade 3' de outro nucleótido, em que o nucleótido-fosfato em 5' foi substituído por qualquer número de grupos químicos. De preferência, as ligações sintéticas incluem alquilfosfonatos, fosfortioatos, fosforoditioatos, alquilfosfontioatos, fosforamidatos, fosforamiditos, ésteres de fosfato, carbamatos, carbonatos, triésteres de fosfato, acetamidato e ésteres de carboximetilo. Numa concretização preferida da invenção, o todo de nucleótidos que o oligonucleótido compreende estão ligados através de ligações fosfortioato e/ou fosforoditioato.

Em algumas concretizações da invenção, os oligonucleótidos administrados são modificados. Tal como aqui se utiliza, a expressão "oligonucleótido modificado" abrange oligonucleótidos com ácido(s) nucleico(s), base(s) e/ou açúcar(es) modificados que não os encontrados na Natureza. Por exemplo, um oligonucleótido substituído em 3',5' é um oligonucleótido possuindo um açúcar que, em ambas as suas posições 3' e 5', está ligado a um grupo químico que não um grupo hidroxilo (na sua posição 3') e que não um grupo fosfato (na sua posição 5').

Um oligonucleótido modificado pode também ser um oligonucleótido com substituintes adicionados tais como diaminas, colesterilo ou outros grupos lipófilos, ou uma espécie com as extremidades tapadas. Em adição, oligonucleótidos não oxidados ou parcialmente oxidados possuindo uma substituição num oxigénio que não forma ponte por nucleótido na molécula, são também considerados como oligonucleótidos modificados. São também aqui considerados como oligonucleótidos modificados os oligonucleótidos possuindo substituintes volumosos que conferem resistência a nucleases na(s) sua(s) extremidade(s) 3' e/ou 5' e/ou várias outras modificações estruturais não encontradas *in vivo* sem intervenção humana.

Na invenção, o oligonucleótido administrado inclui pelo menos um ribonucleótido substituído em 2' no seu terminal 3'. Em algumas concretizações, todos excepto quatro ou cinco nucleótidos do seu terminal 5' são ribonucleótidos substituídos em 2', e em outras concretizações, estes quatro ou cinco nucleótidos em 5', não substituídos, são desoxirribonucleótidos. Noutro aspecto, o oligonucleótido possui pelo menos um ribonucleótido substituído em 2' em ambos os seus terminais 3' e 5', e ainda noutras concretizações o oligonucleótido é composto por ribonucleótidos substituídos em 2' em todas as posições com a excepção de pelo menos quatro ou cinco desoxirribonucleótidos contíguos em qualquer posição interior. Outro aspecto da invenção inclui a administração de um oligonucleótido composto por nucleótidos que são todos ribonucleótidos substituídos em 2'. Concretizações particulares incluem oligonucleótidos possuindo um 2'-O-alkil-ribonucleótido tal como um 2'-O-metilo.

Noutra concretização da invenção, o oligonucleótido administrado possui pelo menos um desoxirribonucleótido e numa concretização preferida, o oligonucleótido possui pelo menos quatro ou cinco desoxirribonucleótidos contíguos capazes de activar ARNase H.

O oligonucleótido administrado é complementar a um gene de um vírus, de um organismo patogénico ou a um gene celular em algumas concretizações da invenção. Em algumas concretizações, o oligonucleótido é complementar a um gene de um vírus envolvido na SIDA, no herpes oral ou genital, em verrugas de papiloma, influenza, doença dos pés e da boca, febre amarela, varicela, zona,



leucemia de células T do adulto, linfoma de Burkitt, carcinoma nasofaríngeo ou hepatite. Numa concretização particular, o oligonucleótido é complementar a um gene de HIV e inclui cerca de 15 a 26 nucleótidos ligados por ligações internucleótidos fosforotioato, sendo pelo menos um dos nucleótidos no terminal 3' um ribonucleótido substituído em 2', e pelo menos quatro desoxirribonucleótidos contíguos.

Noutra concretização, o oligonucleótido é complementar a um gene que codifica uma proteína associada à doença de Alzheimer.

Em ainda outras concretizações, o oligonucleótido é complementar a um gene que codifica uma proteína expressa num parasita que causa uma doença parasítica tal como as infecções amebíase, doença de Chagas, toxoplasmose, pneumocistose, giardíase, criptosporidiose, tricomoníase, malária, ascaridíase, filaríase, triquinose ou esquistossomíase.

#### BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Os anteriores objectos da presente invenção e outros, os seus variados aspectos, bem como a própria invenção, podem ser mais completamente compreendidos a partir da descrição que se segue, quando lida em conjunto com os desenhos anexos, nos quais:

A Fig. 1 é uma representação gráfica que mostra no decorrer do tempo o PS-oligonucleótido 1 modificado, radioactivamente marcado, no fígado, nos rins e no plasma, após a administração oral de oligonucleótido radioactivamente marcado.

A FIG. 2A é um cromatograma de HPLC de oligonucleótido padrão radioactivamente marcado;

A FIG. 2B é um cromatograma de HPLC de oligonucleótidos extractados de amostras de plasma recolhidas 12 horas após a administração de oligonucleótido radioactivamente marcado;

A FIG. 3A é um cromatograma de HPLC de oligonucleótido padrão radioactivamente marcado;

A FIG. 3B é um cromatograma de HPLC de oligonucleótidos extractados de fígado de rato 6 horas após a administração de oligonucleótido radioactivamente marcado;

A FIG. 3C é um cromatograma de HPLC de oligonucleótidos extractados de fígado de rato 24 horas após a administração de oligonucleótido radioactivamente marcado;

A FIG. 4 é uma representação gráfica que mostra no decorrer do tempo a excreção urinária de radioactividade em ratos após a administração oral de oligonucleótido radioactivamente marcado;

A FIG. 5A é um cromatograma de HPLC de oligonucleótido padrão radioactivamente marcado;

A FIG. 5B é um cromatograma de HPLC de oligonucleótidos extractados de urina de rato 6 horas após a administração de oligonucleótido radioactivamente marcado;

A FIG. 5C é um cromatograma de HPLC de oligonucleótidos extractados de urina de rato 12 horas após a administração de oligonucleótido radioactivamente marcado;

A FIG. 6 é uma representação gráfica que mostra no decorrer do tempo a radioactividade no tracto gastrintestinal e fezes em ratos após a administração oral de oligonucleótido radioactivamente marcado;

A FIG. 7 é um cromatograma de HPLC de oligonucleótidos extractados de estômago de rato 1 hora, 3 horas e 6 horas após a administração de oligonucleótido radioactivamente marcado; e

A FIG. 8 é um cromatograma de HPLC de oligonucleótidos extractados de intestino grosso de rato 3 horas, 6 horas e 12 horas após a administração de oligonucleótido radioactivamente marcado.

### DESCRICÃO DETALHADA DAS CONCRETIZACÕES PREFERIDAS

As patentes e a literatura científica aqui referidas estabelecem o conhecimento que está disponível aos peritos na arte. As patentes dos E.U.A. concedidas, os pedidos de patente aceites, e os artigos aqui citados são assim aqui incorporados por referência.

A presente invenção proporciona um método para a regulação, no sentido de reduzir, da expressão de um gene num animal através da administração oral de um oligonucleótido cuja sequência de nucleótidos é complementar ao gene alvo.

Sabe-se que um oligonucleótido, denominado um "oligonucleótido anti-sentido", se pode ligar a uma molécula alvo de ácido nucleico em cadeia simples de acordo com a regra de emparelhamento de bases de Watson-Crick ou a de Hoosteen, e ao fazê-lo, quebra a função do alvo através de um de vários mecanismos: evitando a ligação de factores necessários para a transcrição, união, ou tradução normais; despoletando a destruição enzimática de ARNm por ARNase H se existir uma região de desoxirribonucleótidos contígua no oligonucleótido, e/ou destruindo o alvo através de grupos reactivos ligados directamente ao oligonucleótido anti-sentido.

Assim, devido às propriedades descritas acima, estes oligonucleótidos são úteis terapêuticamente pela sua capacidade de controlar ou regular no sentido de reduzir a expressão de um gene particular num animal, de acordo com o método da presente invenção.

Os oligonucleótidos úteis no método de acordo com a invenção têm pelo menos 6 nucleótidos de comprimento, mas têm preferivelmente 6 a 50 nucleótidos de comprimento, sendo o mais comum o 15- a 30 mero. São compostos por desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos ou uma combinação de ambos, estando a extremidade 5' de um nucleótido e a extremidade 3' de outro

nucleótido ligadas covalentemente por ligações internucleótidos que não ligações fosfodiéster. Estas ligações incluem alquilfosfonatos, fosforotioatos, fosforoditioatos, alquilfosfonotioatos, alquilfosfonatos, fosforamidatos, ésteres de fosfato, carbamatos, acetamidato, ésteres de carboximetilo, carbonatos e triésteres de fosfato. Os oligonucleótidos com estas ligações podem ser preparados de acordo com métodos conhecidos tais como a química do fosforamidato ou do H-fosfonato, que podem ser realizados manualmente ou através de um sintetizador automático conforme descrito por Brown (*A Brief History of Oligonucleotides Synthesis. Protocols for Oligonucleotides and Analogs, Methods in Molecular Biology* (1994) **20**:1-8). (Veja-se também, e.g. Sonveaux "Protecting Groups in Oligonucleotides Synthesis" em Agrawal (1994) *Methods in Molecular Biology* **26**:1-72; Uhlmann *et al.* (1990) *Chem. Rev.* **90**:543-583).

Os oligonucleótidos da composição podem também ser modificados de várias maneiras sem comprometer a sua capacidade para hibridar com o ácido nucleico alvo. Estas modificações incluem, por exemplo, as que são internas ou na(s) extremidade(s) da molécula do oligonucleótido e incluem adições à molécula das ligações fosfato internucleósidos, tais como compostos de colesterilo ou diamina com vários números de resíduos de carbono entre os grupos amino e modificações da ribose, da desoxirribose e do fosfato terminais que clivam ou formam ligações cruzadas com as cadeias opostas ou com enzimas associadas ou outras proteínas que se liguem ao genoma viral. Os exemplos destes oligonucleótidos modificados incluem oligonucleótidos com uma base e/ou açúcar modificados, tal como arabinose em vez de ribose, ou um oligonucleótido substituído em 3',5' possuindo um açúcar que, em ambas as suas posições 3' e 5' está ligado a um grupo químico que não um grupo hidroxilo (na sua posição 3') e outro que não um grupo fosfato (na sua posição 5'). Outros oligonucleótidos modificados possuem as extremidades tapadas com um substituinte volumoso que confere resistência a nucleases na(s) sua(s) extremidade(s) 3' e/ou 5', ou possuem uma substituição num oxigénio que não forma ponte por nucleótido. Estas modificações podem ser em algumas ou em todas as ligações internucleósidos, bem como numa ou ambas as extremidades do oligonucleótido e/ou no interior da molécula. Para a preparação destes oligonucleótidos modificados veja-se, e.g., Agrawal (1994) *Methods in Molecular Biology* **26**; Uhlmann *et al.* (1990) *Chem. Rev.* **90**:543-583).

Os oligonucleótidos que são auto-estabilizados são também considerados oligonucleótidos modificados úteis nos métodos de acordo com a invenção (Tang *et al.* (1993) *Nucleic Acids Res.* **20**:2729-2735). Estes oligonucleótidos compreendem duas regiões: uma região alvo para hibridação; e uma região auto-complementar possuindo uma sequência de oligonucleotídica complementar a uma sequência de ácido nucleico que está no interior do oligonucleótido auto-estabilizado.

A preparação destes oligonucleótidos não modificados e modificados é bem conhecida na arte (revisão em Agrawal *et al.* (1992) *Trends Biotechnol.* **10**:152-158) (veja-se *e.g.*, Uhlmann *et al.* (1990) *Chem. Rev.* **90**:543-584; e (1987) *Tetrahedron. Lett.* **28**:(31)3539-3542); Agrawal (1994) *Methods in Molecular Biology* **20**:63-80).

Estes oligonucleótidos são proporcionados com estabilidade adicional porque possuem ligações internucleótidos que não fosfodiéster tais como alquilfosfonatos, fosforotioatos, fosforoditioatos, fosforoamidatos, alquilfosfonotioatos, fosforamidatos, fosforamiditos, ésteres de fosfato, carbamatos, carbonatos, triésteres de fosfato, acetamido e ésteres de carboximetilo. Os oligonucleótidos particularmente úteis estão ligados com ligações internucleósidos fosforotioato e/ou fosforoditioato.

Os oligonucleótidos administrados ao animal podem ser oligonucleótidos híbridos na medida em que contêm tanto desoxirribonucleótidos e pelo menos um ribonucleótido substituído em 2'. Para os fins da invenção, a expressão "substituído em 2'" significa substituição do OH em 2' da molécula de ribose por, *e.g.*, 2'-O-alilo, 2'-O-alquilo, 2'-halo ou 2'-amino, mas não por 2'-H, em que os grupos alilo, arilo ou alquilo podem ser não substituídos ou substituídos com *e.g.*, halogéneo, grupos hidroxil, trifluorometilo, ciano, nitro, acilo, aciloxi, alcoxi, carboxilo, carbalcoxilo ou amino.

Os oligonucleótidos de ADN/ARN híbridos úteis no método de acordo com a invenção resistem a degradação nucleolítica, formam dúpliques estáveis com ARN ou ADN, e preferivelmente activam a ARNase H quando hibridados com ARN. Podem adicionalmente incluir pelo menos um ribonucleótido não

substituído. Por exemplo, num oligonucleótido útil na invenção todos os nucleótidos podem ser desoxirribonucleótidos com a excepção de um ribonucleótido substituído em 2' no terminal 3' do oligonucleótido.

Alternativamente, o oligonucleótido pode possuir pelo menos um ribonucleótido substituído em ambos os seus terminais 3' e 5'.

Uma classe preferida de oligonucleótidos útil na invenção contém quatro ou mais desoxirribonucleótidos num bloco contíguo, de modo a proporcionar um segmento de activação para a ARNase H. Em certos casos, estarão presentes mais do que um destes segmentos de activação em qualquer local no interior do oligonucleótido. Pode haver uma maioria de desoxirribonucleótidos nos oligonucleótidos de acordo com a invenção. De facto, nestes oligonucleótidos os nucleótidos podem ser até todos desoxirribonucleótidos excepto um. Assim, num oligonucleótido preferido possuindo cerca de 2 a cerca de 50 nucleótidos ou mais preferivelmente de cerca de 12 a cerca de 25 nucleótidos, o número de desoxirribonucleótidos presentes varia de 1 a cerca de 24. Outros oligonucleótidos úteis podem consistir em apenas ribonucleótidos substituídos em 2'.

A TABELA 1 dá uma listagem de espécies representativas de oligonucleótidos que são úteis no método de acordo com a invenção. Os nucleótidos substituídos em 2' estão sublinhados.

TABELA 1

<u>NO.</u>	<u>OLIGONUCLEÓTIDO</u>
1	CTCTCGCACCCATCTCTCTCCTTCU
2	CTCTCGCACCCATCTCTCTCCTUCU
3	CTCTCGCACCCATCTCTCTCCUUCU
4	CTCTCGCACCCATCTCUCUCCUUCU
5	CTCTCGCACCCAUCUCUCUCCUUCU
6	CTCTCGCACCCAUCUCUCUCCUUCU
7	CTCTCGCACCCAUCUCUCUCCUUCU
8	CUCUCGCACCCAUCUCUCUCCUUCU
9	CTCTCGCACCCATCTCTCTCCTTCU
10	CUCTCGCACCCATCTCTCTCCTTCU
11	CUCUCGCACCCATCTCTCTCCUUCU
12	CUCUCGCACCCATCTCUCUCCUUCU
13	CUCUCGCACCCAUCUCUCUCCUUCU
14	CUCUCGCACCCATCTCTCUCUCCUUCU
15	CTCTCGCACCCAUCUCUCUCCUUCU
16	CUCUCGCACCCAUCTCTCTCCUUCU
17	CUCUCGCACCCATCTCTCTCCUUCU
18	CUCTCGCACCCAUCUCUCUCCUUCU
19	CUCTCGCACCCATCTCTCUCUCCUUCU

O(s) ribonucleótido(s) substituído(s) em 2' no oligonucleótido podem conter na posição 2' da ribose um -O-alquilo inferior contendo 1-6 átomos de carbono, arilo ou arilo substituído ou alilo possuindo 2-6 átomos de carbono e.g., 2'-O-alilo, 2'-O-arilo, 2'-O-alquilo, 2'-halo ou 2'-amino, mas não 2'-H, em que os grupos alilo, arilo ou alquilo podem ser não substituídos ou substituídos, e.g., com halogéneo, grupos hidroxí, trifluorometilo, ciano, nitro, acilo, aciloxi, alcoxi, carboxilo, carbalcoxilo ou amino. Os ribonucleótidos substituídos úteis são 2'-O-alquilo tais como 2'-O-metilo.

Preferivelmente, os oligonucleótidos de acordo com a invenção variarão de cerca de 2 a cerca de 50 nucleótidos de comprimento, e mais

preferivelmente de cerca de 15 a cerca de 25 nucleótidos de comprimento. Assim, neste caso preferido, os oligonucleótidos de acordo com a invenção possuirão de 14 a 24 ligações internucleótidos que não ligações fosfodiéster.

Os oligonucleótidos de acordo com a invenção são eficazes na inibição da expressão de vários genes em vírus, organismos patogénicos, ou na inibição da expressão de genes celulares. A capacidade para inibir estes agentes é claramente importante para o tratamento de vários estados de doença. Assim, os oligonucleótidos de acordo com a invenção possuem uma sequência de nucleótidos que é complementar a uma sequência de ácido nucleico de um vírus, de um organismo patogénico ou de um gene celular. Preferivelmente, estes oligonucleótidos têm de cerca de 6 a cerca de 50 nucleótidos de comprimento.

Para as finalidades da invenção, a expressão "sequência oligonucleotídica que é complementar a uma sequência de ácido nucleico" significa uma sequência oligonucleotídica que se liga à sequência de ácido nucleico alvo sob condições fisiológicas, *e.g.*, por emparelhamento de bases de Watson-Crick (interacção entre um oligonucleótido e um ácido nucleico em cadeia simples) ou por emparelhamento de bases de Hoogsteen (interacção entre um oligonucleótido e um ácido nucleico em cadeia dupla) ou através de qualquer outro meio incluindo, no caso de um oligonucleótido que se liga a ARN, formação de pseudo-nós. Esta ligação (por emparelhamento de bases de Watson-Crick) sob condições fisiológicas, é medida na prática observando a interferência com a função da sequência de ácido nucleico.

A sequência de ácido nucleico à qual um oligonucleótido de acordo com a invenção é complementar variará consoante o gene que se pretende regular no sentido de reduzir. Em alguns casos, a sequência do gene ou do ácido nucleico alvo será uma sequência de ácido nucleico de um vírus. A utilização de oligonucleótidos anti-sentido para inibir vários vírus é bem conhecida (revista em Agrawal (1992) *Trends in Biotech.* 10:152-158). Têm sido descritas sequências de ácido nucleico viral que são complementares a oligonucleótidos anti-sentido eficazes para muitos vírus, incluindo o vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) (Patente dos E.U.A. No. 4 806 463), vírus de herpes simples (Patente dos E.U.A. No. 4 689 320), vírus de influenza (Patente dos E.U.A. No.

5 194 428), e vírus de papiloma humano (Storey *et al* (1991) *Nucleic Acids Res.* **19**:4109-4114). Podem-se utilizar sequências complementares a quaisquer destas sequências de ácido nucleico para os oligonucleótidos de acordo com a invenção, tal como também se podem utilizar sequências oligonucleotídicas complementares a sequências de ácido nucleico de quaisquer outros vírus. Outros vírus que possuem sequências de ácido nucleico conhecidas contra os quais se podem preparar oligonucleótidos anti-sentido incluem, mas não se encontram limitados a, vírus da doença dos pés e da boca (veja-se Robertson *et al.* (1985) *J. Virol.* **54**:651; Harris *et al.* (1980) *Virol.* **36**:659), vírus da febre amarela (veja-se Rice *et al.* (1985) *Science* **229**:726), vírus varicela-zoster (veja-se Davison e Scott (1986) *J. Gen. Virol.* **67**:2279), vírus de Epstein-Barr, citomegalovírus, vírus de sincícios respiratórios (RSV) e vírus do mosaico do pepino (veja-se Richards *et al.* (1978) *Virol.* **89**:395).

Por exemplo, concebeu-se um oligonucleótido que é complementar a uma porção do gene de HIV-1, e como tal, possui efeitos anti-HIV significativos (Agrawal (1992) *Antisense Res. Development* **2**:261-266). Verificou-se que o alvo deste oligonucleótido era conservado entre vários isolados de HIV-1. Tem uma riqueza de 56% em G + C, é solúvel em água e relativamente estável em condições fisiológicas. Este oligonucleótido liga-se a um ARN alvo complementar sob condições fisiológicas, sendo T da dúplice aproximadamente 56°C. A actividade antiviral deste oligonucleótido foi testada em vários modelos, incluindo células CEM infectadas de forma aguda e crónica, culturas de longo prazo imitando as condições *in vivo*, linfócitos de sangue periférico humano e macrófagos, e isolados de pacientes infectados com HIV-1 (Liszewicz *et al.* (*Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* (1992) **89**:11209-11213); Liszewicz *et al.* (*Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* (1993) **90**:3860-3894); Liszewicz *et al.* (*Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* (1994) **91**:7942-7946); Agrawal *et al.* (*J. Ther. Biotech.*) no prelo).

Os oligonucleótidos de acordo com a invenção podem alternativamente possuir uma sequência oligonucleotídica complementar a uma sequência de ácido nucleico de um organismo patogénico. Foram descritas as sequências de ácido nucleico de muitos organismos patogénicos, incluindo o organismo da malária, *Plasmodium falciparum*, e muitas bactérias patogénicas. As sequências oligonucleotídicas complementares a sequências de ácido nucleico de quaisquer

destes organismos patogénicos podem ser utilizadas em oligonucleótidos de acordo com a invenção. Os exemplos de eucariotas patogénicos possuindo sequências de ácido nucleico conhecidas contra os quais se podem preparar oligonucleótidos anti-sentido incluem *Trypanosom abrucei gambiense* e *Leishmania* (veja-se Campbell *et al.*, *Nature* 311:350 (1984)), *Fasciola hepatica* (veja-se Zurita *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:2340 (1987)).

Podem-se preparar oligonucleótidos antifúngicos utilizando uma região alvo para hibridação possuindo uma sequência oligonucleotídica que seja complementar a uma sequência de ácido nucleico de, *e.g.*, o gene da quitina-sintetase, e podem-se preparar oligonucleótidos antibacterianos utilizando, *e.g.*, o gene da alanina-racemase. De entre a doenças fúngicas que podem ser tratáveis através da invenção encontram-se candidíase, histoplasmose, criptococos, blastomicose, aspergilose, esporotricose, cromomicose, dermatofitose e cocodiodomicose. O método pode também ser utilizado para tratar doenças provocadas por riquetsias (*e.g.*, tifo, febre maculosa das Montanhas Rochosas), bem como doenças sexualmente transmissíveis causadas por *Chlamydia trachomatis* ou *Lymphogranuloma venereum*. Podem ser tratadas várias doenças parasíticas através do método de acordo com a invenção, incluindo amebíase, doença de Chagas, toxoplasmose, pneumocistose, giardíase, criptosporidiose, tricomoníase e pneumonia por *Pneumocystis carini*; também doenças causadas por vermes (helmínticas) tais como ascaridíase, filaríase, triquinose, esquistossomíase e infecções por nemátodos ou cestodes. A malária pode ser tratada através do método de tratamento da invenção independentemente do facto de ser causada por *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* ou *P. malariae*.

As doenças infecciosas identificadas acima podem todas ser tratadas através da invenção porque os agentes infecciosos destas doenças são conhecidos e assim podem-se preparar oligonucleótidos de acordo com a invenção, possuindo uma sequência oligonucleotídica complementar a uma sequência de ácido nucleico que seja uma sequência de ácido nucleico essencial para a propagação do agente infeccioso, tal como um gene essencial.

Outros estados ou condições de doença que podem ser tratáveis através da invenção são aqueles que resultam de um produto ou expressão anormal de

um gene celular. Estas condições podem ser tratadas por administração de oligonucleótidos de acordo com a invenção e foram já anteriormente discutidas nesta descrição.

Outros oligonucleótido de acordo com a invenção podem possuir uma sequência de nucleótidos complementar a um gene celular, ou transcrito do gene, cuja expressão anormal ou produto resultam num estado de doença. Foram descritas as sequências de ácido nucleico de vários destes genes celulares, incluindo a proteína prião (Stahl *et al.* (1991) *FASEB J.* 5:2799-2807), a proteína semelhante a amilóide associada à doença de Alzheimer (Patente dos E.U.A. No. 5 015 570), e vários oncogenes e proto-oncogenes bem conhecidos, tais como *c-myb*, *c-myc*, *c-abl* e *n-ras*. Em adição, oligonucleótidos que inibem a síntese de proteínas estruturais ou enzimas envolvidas amplamente ou exclusivamente na espermatogénese, na mobilidade do esperma, na ligação do esperma ao óvulo ou qualquer outro passo que afecte a viabilidade do esperma, podem ser utilizados como contraceptivos. De modo semelhante, contraceptivos para mulheres podem ser oligonucleótidos que inibam proteínas ou enzimas envolvidas na ovulação, fertilização, implantação ou na biossíntese de hormonas envolvidas neste processos.

A hipertensão pode ser controlada por oligonucleótidos que regulam no sentido de reduzir a síntese da enzima de conversão de angiotensina ou enzimas relacionadas no sistema renina/angiotensina. A agregação de plaquetas pode ser controlada por supressão da síntese de enzimas necessárias para a síntese de tromboxano A<sub>2</sub> para utilização em desordens circulatórias cerebrais ou do miocárdio, enfartes, arteriosclerose, embolia e trombose. A deposição de colesterol nas paredes arteriais pode ser inibida por supressão da síntese da co-enzima A de ácidos gordos: colesterol-aciltransferase em arteriosclerose. A inibição da síntese de colinafosfotransferase pode ser útil na hipolipidemia.

Existem numerosas desordens neuronais em que a interrupção de hibridação pode ser utilizada para reduzir ou eliminar efeitos adversos da desordem. Por exemplo, a supressão da síntese de monoamina-oxidase pode ser utilizada na doença de Parkinson. A supressão de catecol-O-metil-transferase pode ser utilizada para tratar depressão; e a supressão de indolo-N-metil-transferase pode ser utilizada no tratamento de esquizofrenia.

A supressão de enzimas seleccionadas na cascata do ácido araquidónico que conduz às prostaglandinas e aos leucotrienos pode ser útil no controlo da agregação de plaquetas, alergia, inflamação, dor e asma.

A supressão da proteína expressa pelo gene de resistência a drogas múltiplas (*mdr-1*), que pode ser responsável pelo desenvolvimento de resistência de tumores a várias drogas anti-cancerígenas e é um dos principais impedimentos na quimioterapia, pode provar-se benéfico no tratamento do cancro. Sequências oligonucleotídicas complementares a sequências de ácido nucleico de quaisquer destes genes podem ser utilizadas para oligonucleótidos de acordo com a invenção, tal como podem ser utilizadas sequências oligonucleotídicas complementares a qualquer outro transcrito de genes celulares, cuja expressão anormal ou produto resultem num estado de doença.

Os oligonucleótidos aqui descritos são administrados oral ou entericamente ao sujeito animal na forma de formulações farmacêuticas terapêuticas que sejam eficazes para o tratamento de infecções por vírus, infecções por organismos patogénicos ou doenças resultantes de expressão anormal de genes ou da expressão de um produto de um gene anormal. Em alguns aspectos do método de acordo com a invenção, os oligonucleótidos são administrados em conjunto com outros agentes terapêuticos, *e.g.*, AZT no caso da SIDA.

A formulação farmacêutica terapêutica contendo os oligonucleótidos inclui um transportador fisiologicamente aceitável, tal como um diluente inerte ou um transportador comestível e assimilável com o qual o péptido é administrado. As formulações adequadas que incluem excipientes farmacêuticamente aceitáveis para a introdução de compostos na corrente sanguínea por vias que não a injectável podem ser encontradas em *Remington's Pharmaceutical Sciences* (18ª ed.) (Generro, ed. (1990) Mack Publishing Co., Easton, PA). O oligonucleótido e outros ingredientes podem ser encerrados numa cápsula de gelatina mole ou dura, prensados em comprimidos ou incorporados directamente na dieta do indivíduo. O oligonucleótido pode ser incorporado em excipientes e utilizado na forma de comprimidos ingeríveis, comprimidos bucais, trociscos, cápsulas, elixires, suspensões, xaropes, hóstias,

e semelhantes. Quando o oligonucleótido é administrado oralmente, pode ser misturado com outras formas de alimentos e intensificadores de aroma farmacologicamente aceitáveis. Quando o oligonucleótido é administrado entericamente, pode ser introduzido numa forma sólida, semi-sólida, de suspensão ou de emulsão e pode ser composto com quaisquer aditivos farmacologicamente aceitáveis bem conhecidos. Os sistemas de entrega oral de libertação sustentada e/ou revestimentos entéricos para formas de dosagem administradas oralmente estão também contemplados, tais como os descritos nas Patentes dos E.U.A. Nos. 4 704 295, 4 556 552, 4 309 404 e 4 309 406.

A quantidade de oligonucleótido nestas composições terapeuticamente úteis é tal que seja obtida uma dosagem adequada. As composições ou preparações preferidas de acordo com a presente invenção são preparadas de modo a que uma unidade de dosagem oral contenha entre cerca de 50 microgramas e cerca de 200 mg por kg de peso corporal do animal, sendo mais preferido de 10 mg a 100 mg por kg.

Entender-se-á que o teor unitário de ingrediente ou ingredientes activos contidos numa dose individual de cada forma de dosagem não necessita de constituir, por si só, uma quantidade eficaz, pois a quantidade eficaz necessária pode ser atingida por administração de uma pluralidade de unidades de dosagem (tais como cápsulas ou comprimidos ou suas combinações).

De modo a determinar se o oligonucleótido administrado de acordo com o método da invenção é absorvido nos tecidos corporais, e em caso positivo, em que tecidos ocorre a absorção, realizou-se o seguinte estudo. Analisaram-se amostras de vários tecidos corporais quanto à radioactividade em horas crescentes após a administração oral de um oligonucleótido radioactivamente marcado. A FIG. 1 ilustra a concentração em função do tempo, no plasma, no fígado e nos rins, de um equivalente de oligonucleótido após administração oral do oligonucleótido radioactivamente marcado. Estes resultados demonstram que a droga é absorvida através do tracto gastrointestinal e se acumula no rim e no fígado.

A forma química de radioactividade no plasma foi ainda avaliada por HPLC, demonstrando a presença tanto do oligonucleótido intacto (A) como de

metabolitos (B), 12 horas após a administração oral (FIG. 2B). O oligonucleótido intacto foi também detectado no fígado 6 horas (FIG. 3B) e 12 horas (FIG. 3C) após a administração. Era detectável radioactividade no cérebro, no timo, no coração, no pulmão, no fígado, no rim, nas supra-renais, no estômago, no intestino delgado, no intestino grosso, no músculo esquelético, nos testículos, na tiróide, na epiderme, no olho completo e na medula óssea, 48 horas após a administração oral do oligonucleótido radioactivamente marcado.

Evidências adicionais que suportam a absorção do oligonucleótido surgem da análise de amostras de urina após o oligonucleótido radioactivamente marcado ter sido administrado oralmente. A FIG. 4 mostra a excreção cumulativa do oligonucleótido radioactivamente marcado para a urina ao longo de 48 horas após a administração de oligonucleótido radioactivamente marcado. O facto de o oligonucleótido continuar a ser excretado na urina ao longo do tempo implica que outros tecidos o tinham absorvido, e que o corpo era capaz de absorção durante um período prolongado de tempo. As FIG. 5B e 5C demonstram que apesar da maioria da radioactividade na urina estar presente na forma de produtos de degradação, o oligonucleótido intacto também foi detectado, demonstrando que este oligonucleótido é absorvido intacto.

Para determinar o nível de biodisponibilidade dos oligonucleótidos após administração oral mediu-se o nível de oligonucleótido no tracto gastrintestinal (estômago e intestino) e nas fezes. A FIG. 6 mostra que aproximadamente 80% do oligonucleótido administrado permaneceu ou foi excretado nas fezes, indicando que 20% do oligonucleótido administrado foi absorvido. Este oligonucleótido era estável no estômago; não se detectaram significativos produtos de degradação no conteúdo do estômago seis horas após a administração oral (FIG. 7). A maioria do oligonucleótido administrado nos conteúdos do intestino grosso estava também presente na forma do composto intacto (FIG. 8).

Assim, utilizando o método de acordo com a invenção, conseguiu-se a absorção bem sucedida de oligonucleótidos através do tracto gastrintestinal e distribuído por todo o corpo. Os oligonucleótidos intactos foram detectados no plasma e em vários tecidos e excretados na urina. Estes resultados demonstram

que a administração oral é um meio potencial para a entrega dos oligonucleótidos como agentes terapêuticos.

Os exemplos que se seguem ilustram os modos preferidos de realização e prática da presente invenção, mas não se pretende com eles limitar o âmbito da invenção uma vez que podem ser utilizados métodos alternativos para obter resultados semelhantes.

### EXEMPLOS

#### 1. Síntese e análise de oligonucleótidos

Sintetizou-se, purificou-se e analisou-se como se segue um oligonucleótido ligado por fosforotioato 25-mero híbrido, possuindo a SEQ ID NO:1 e contendo sequências de 2'-O-metilribonucleótidos em 3' e 5' e um desoxirribonucleótido interior.

Os fosforotioato-desoxirribonucleósidos não modificados foram sintetizados sobre CPG numa escala de 5-6  $\mu$ mol num sintetizador automático (modelo 8700, Millipore, Bedford, MA) utilizando a abordagem do H-fosfonato descrita na Patente dos E.U.A. No. 5 149 798. Os desoxinucleósido-H-fosfonatos foram obtidos de Millipore (Bedford, MA). Os 2'-O-metilribonucleótido-H-fosfonatos ou -fosforotioatos foram sintetizados por procedimentos *standard* (veja-se, *e.g.*, "Protocols for Oligonucleotides and Analogs" em *Meth. Mol. Biol.* (1993) volume 20) ou foram obtidos comercialmente (*e.g.*, de Glenn Research, Sterling, VA e Clontech, Palo Alto, CA). Os segmentos de oligonucleótidos contendo 2'-O-metil-nucleósidos foram montados utilizando 2'-O-metilribonucleósido-H-fosfonatos ou -fosforotioatos nos ciclos desejados. De modo semelhante, os segmentos de oligonucleótidos contendo desoxirribonucleósidos foram montados utilizando desoxirribonucleósido-H-fosfonatos nos ciclos desejados. Após a montagem, o oligonucleótido-H-fosfonato ligado a CPG foi oxidado com enxofre para gerar a ligação fosforotioato. Os oligonucleótidos foram então desprotegidos em  $\text{NH}_4\text{OH}$  concentrado a 40°C durante 48 horas.

O oligonucleótido em bruto (cerca de 500 unidades de  $A_{260}$ ) foi analisado por cromatografia inversa de baixa pressão sobre um meio de fase inversa de  $C_{18}$ . O grupo DMT foi removido por tratamento com ácido acético aquoso a 80% e depois os oligonucleótidos foram dialisados contra água destilada e liofilizados.

## 2. Marcação radioactiva de oligonucleótidos

Para obter oligonucleótidos marcados com  $^{35}\text{S}$ , realizou-se a síntese em dois passos. Os primeiros 19 nucleótidos da sequência SEQ ID NO:1 a partir da sua extremidade 3' foram montados utilizando a abordagem do fosforamido de  $\beta$ -cianoetilo (veja-se Beaucage em *Protocols for Oligonucleotides and Analogs* (Agrawal, ed.), Humana Press, (1993), p. 33-61). Os últimos seis nucleótidos foram montados utilizando a abordagem do H-fosfonato (veja-se, Froehler em *Protocols for Oligonucleotides and Analogs* (Agrawal, ed.) Humana Press, 1993, p. 63-80). O oligonucleótido ligado ao suporte de vidro de poros controlados (CPG) (30 mg de CPG; aproximadamente 1  $\mu\text{M}$ ), contendo cinco ligações H-fosfonato, foi oxidado com  $^{35}\text{S}_8$  (4 mCi, 1 Ci/mg, Amersham; 2 Ci = 37 GBq) em 60 ml de dissulfureto de carbono/piridina/trietilamina (10:10:1). Realizou-se a reacção de oxidação à temperatura ambiente durante 1 hora com agitação ocasional. Depois adicionaram-se 2  $\mu\text{l}$ , 5  $\mu\text{l}$  e 200  $\mu\text{l}$  de enxofre ( $^{35}\text{S}_8$ ) a 5% frio na mesma mistura de solventes de 30 em 30 minutos, para completar a oxidação. Removeu-se a solução e lavou-se o suporte de CPG com dissulfureto de carbono/piridina/trietilamina (10:10:1) (3 x 500  $\mu\text{l}$ ) e com acetonitrilo (3 x 700  $\mu\text{l}$ ). Desprotegeu-se o produto em hidróxido de amónio concentrado (55°C, 14 horas) e evaporou-se. Purificou-se o produto resultante por electroforese em gel de poliacrilamida (poliacrilamida a 20% contendo ureia 7 M). Excisou-se a banda desejada sob iluminação com UV e extraiu-se o PS-oligonucleótido do gel e dessalinizou-se com um cartucho Sep-Pak C18 (Waters) e uma coluna Sephadex G-15. O rendimento foi de 20 unidades  $A_{260}$  (600  $\mu\text{g}$ ; actividade específica, 1  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ ).

### 3. Animais e tratamento

Utilizaram-se no estudo ratos Sprague-Dawley macho (100-120 g, Harlan Laboratories, Indianapolis, IN). Os animais foram alimentados com ração comercial e água *ad libitum* durante 1 semana antes do estudo.

Administrou-se aos animais, via sonda gástrica, uma dose de 50 mg/kg. Dissolveram-se os oligonucleótidos, não marcados e marcados com  $^{35}\text{S}$ , em solução salina fisiológica (NaCl a 0,9%) numa concentração de 25 mg/ml. As doses foram baseadas no peso corporal antes do tratamento e variaram o mais próximo de 0,01 ml. Após a dosagem, cada animal foi colocado numa gaiola metabólica e alimentado com ração comercial e água *ad libitum*. Recolheu-se a urina total excretada e lavou-se cada gaiola metabólica após os intervalos de recolha. Recolheram-se as fezes totais excretadas de cada animal em vários pontos temporais e homogeneizaram-se amostras de fezes antes da quantificação da radioactividade. Recolheram-se amostras de sangue dos animais em tubos com heparina em vários pontos temporais. Separou-se o plasma por centrifugação. Aplicou-se eutanásia por exsanguinação sob anestesia com pentobarbital de sódio. Após a eutanásia, recolheram-se tecidos de cada animal. Todos os tecidos/órgãos foram desprovidos de gordura ou tecido conectivo extrínseco, esvaziaram-se e limpam-se de todos os conteúdos, pesaram-se individualmente e registaram-se os pesos.

### 4. Medições de radioactividade total

As radioactividades totais nos tecidos e nos fluidos corporais foram determinadas por espectrometria de cintilação líquida (LS 6000TA, Beckman, Irvine, CA). Em resumo, os fluidos biológicos (plasma, 50-100  $\mu\text{l}$ ; urina, 50-100  $\mu\text{l}$ ) foram misturados com 6 ml de solvente de cintilação (Budget-Solve, RPI, Mt. Prospect, IL) para determinar a radioactividade total. As fezes foram moídas e pesadas antes de serem homogeneizadas num volume de 9 vezes de solução salina de NaCl a 0,9%. Misturou-se uma alíquota de homogeneizado (100  $\mu\text{l}$ ) com solubilizante (TS-2, RPI, Mt. Prospect, IL) e depois misturou-se com solvente de cintilação (6 ml) para permitir a quantificação da radioactividade total.

Após a sua remoção, os tecidos foram imediatamente transferidos para um papel de filtro Whatman No.1 e pesados antes de serem homogeneizados em solução salina de NaCl a 0,9% (3-5 ml por grama de peso molhado). Misturou-se o homogeneizado resultante (100  $\mu$ l) com solubilizante (TS-2, RPI, Mt. Prospect, IL) e depois com solvente de cintilação (6 ml) para determinar a radioactividade total. Registou-se o volume de solução salina de NaCl a 0,9% adicionado a cada amostra de tecido. Mantiveram-se congelados os tecidos/órgãos homogeneizados a  $\leq -70^{\circ}\text{C}$  até à utilização nas outras análises.

#### 5. Análise por HPLC

A radioactividade na urina foi analisada por HPLC de emparelhamento iónico utilizando uma modificação do método descrito essencialmente por Sands *et al.* (*Mol. Pharm.* (1994) 45:932-943). Centrifugaram-se as amostras de urina e passaram-se através de um filtro Acro de 0,2  $\mu\text{m}$  (Gelman, Ann Arbor, MI) antes da análise. Extraíram-se o oligonucleótido híbrido e os metabolitos nas amostras de plasma utilizando os métodos anteriores na preparação de amostras para PAGE. Utilizou-se uma coluna Microsorb MV-C4 (Rainin Instruments, Woburn, MA) na HPLC utilizando um aparelho de HPLC Hewlett Packard 1050 com uma bomba quaternária para gradientes. A fase móvel incluía dois tampões; O Tampão A era reagente A 5 mM (Waters Co., Bedford, MA) em água e o Tampão B era acetonitrilo (Fisher)/água 4:1 (v/v). Eluíu-se a coluna a um caudal de 1,5 ml/min, utilizando o seguinte gradiente: (1) 0-4 min, 0% de Tampão B; (2) 4-15 min, 0-35% de Tampão B; e (3) 15-70 min, 35%-80% de Tampão B. Equilibrou-se a coluna com Tampão A durante pelo menos 30 minutos antes da operação seguinte. Utilizando um colector de fracções RediFrac (Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, NJ), recolheram-se fracções de 1 min (1,5 ml) para frascos de cintilação de 7 ml e misturaram-se com 5 ml de solvente de cintilação para determinar a radioactividade de cada fracção.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

(1) INFORMAÇÃO GERAL:

(i) REQUERENTE: Hybridon, Inc.

(ii) TÍTULO DA INVENÇÃO: Método de regulação, no sentido de reduzir, da expressão de genes

(iii) NÚMERO DE SEQUÊNCIAS: 1

(iv) ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

(A) DESTINATÁRIO: Lappin & Kusmer

(B) RUA: 200 State Street

(C) CIDADE: Boston

(D) ESTADO: Massachusetts

(E) PAÍS: E.U.A.

(F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): 02109

(v) FORMA LEGÍVEL EM COMPUTADOR:

(A) TIPO DE MEIO: Disquete

(B) COMPUTADOR: Compatível com PC da IBM

(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS

(D) SUPORTE LÓGICO: PatentIn Release #1.0, Versão #1.25

(vi) DADOS DO PEDIDO ACTUAL:

(A) NÚMERO DO PEDIDO:

(B) DATA DE APRESENTAÇÃO:

(C) CLASSIFICAÇÃO:

(viii) INFORMAÇÃO SOBRE REPRESENTANTE/AGENTE:

(A) NOME: Kerner, Ann-Louise

(B) NÚMERO DE REGISTO: 33 523

(C) NÚMERO DE REFERÊNCIA/CERTIFICADO: HYZ-030PCT

(ix) INFORMAÇÃO PARA TELECOMUNICAÇÕES:

(A) TELEFONE: 617-330-1300

(B) TELEFAX: 617-330-1311

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:1:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 25 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc/ARN

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iv) ANTI-SENTIDO: SIM

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:1:


CUCUCGCACC CATCTCTCTC CUUCU

25

Lisboa, 28. JAN. 2000

Por HYBRIDON, INC.  
- O AGENTE OFICIAL -

○ ADJUNTO



ENG.º ANTÓNIO JOÃO  
DA CUNHA FERREIRA  
Ag. Of. Pr. Ind.  
Rua das Flores, 74 - 4.º  
1000 LISBOA



## REIVINDICAÇÕES

1. Formulação farmacêutica para administração oral para a inibição ou regulação, no sentido de reduzir, em mamíferos, da expressão de um gene, compreendendo um oligonucleótido complementar a uma sequência parcial do gene ou do transcrito do gene, em que o referido oligonucleótido possui ligações internucleósidos que não ligações fosfodiéster e compreende pelo menos um grupo ribonucleotídico substituído em 2', e em que o referido oligonucleótido possui um grupo ribonucleotídico substituído em 2' no seu terminal 3'.
2. Formulação de acordo com a reivindicação 1 em que o oligonucleótido compreende ainda pelo menos um ribonucleótido substituído em 2' no terminal 5'.
3. Formulação de acordo com a reivindicação 1 em que todos os ribonucleótidos no oligonucleótido são ribonucleótidos substituídos em 2'.
4. Formulação de acordo com a reivindicação 1 em que o ribonucleótido substituído em 2' é um 2'-O-alkilribonucleótido.
5. Formulação de acordo com a reivindicação 1 em que o oligonucleótido compreende pelo menos um desoxirribonucleótido.
6. Formulação de acordo com a reivindicação 5 em que o oligonucleótido compreende uma região de pelo menos quatro desoxirribonucleótidos contíguos capaz de activar a actividade de RNase H.
7. Formulação de acordo com a reivindicação 1 em que o oligonucleótido compreende uma ligação internucleósidos seleccionada de entre o grupo que consiste em alkilfosfonatos, fosfortioatos, fosforoditioatos, alkilfosfonotioatos, fosforamidatos, fosforamiditos, ésteres de fosfato, carbamatos, carbonatos, triésteres de fosfato, acetamidato e ésteres de carboximetilo.

8. Formulação de acordo com a reivindicação 7 em que essencialmente todos os nucleótidos estão ligados através de ligações internucleósidos fosforotioato ou fosforoditioato.
9. Formulação de acordo com a reivindicação 1 em que o oligonucleótido é modificado.
10. Formulação de acordo com a reivindicação 8 em que todos os nucleótidos estão ligados através de ligações fosforotioato.
11. Formulação de acordo com a reivindicação 10, compreendendo ainda pelo menos dois 2'-O-metilribonucleótidos.
12. Formulação de acordo com a reivindicação 11 compreendendo pelo menos um 2'-O-metilribonucleótido em cada terminal do oligonucleótido.
13. Formulação de acordo com a reivindicação 1 em que o oligonucleótido é complementar a uma sequência parcial de um gene de um vírus, de um organismo patogénico ou de um gene celular, ou de um transcrito do gene.
14. Formulação de acordo com a reivindicação 13 em que o oligonucleótido é complementar a uma sequência parcial de um gene ou de um transcrito de um gene, de um vírus envolvido numa doença seleccionada de entre o grupo que consiste em SIDA, herpes genital e oral, verrugas de papiloma, influenza, doença da boca e dos pés, febre amarela, varicela, zona, leucemia de células T do adulto, linfoma de Burkitt, carcinoma nasofaríngeo e hepatite.
15. Formulação de acordo com a reivindicação 1 em que o oligonucleótido é complementar a uma sequência parcial de um gene ou de um transcrito de um gene que codifica uma proteína associada à doença de Alzheimer.
16. Formulação de acordo com a reivindicação 1 em que o oligonucleótido é complementar a uma sequência parcial de um gene ou de um

transcrito de um gene que codifica uma proteína num parasita que causa uma doença parasítica seleccionada de entre o grupo que consiste nas infecções amebíase, doença de Chagas, toxoplasmose, pneumocistose, giardíase, criptosporidiose, tricomoníase, malária, ascaríase, filaríase, triquinose e de esquistossomíase.

17. Formulação de acordo com a reivindicação 1 em que o oligonucleótido é complementar a uma sequência parcial de um gene ou de um transcrito de um gene de HIV, e compreende cerca de 15 a 26 nucleótidos ligados por ligações internucleósidos fosforotioato, sendo pelo menos um dos nucleótidos no terminal 3' um ribonucleótido substituído em 2'.

18. Utilização de um oligonucleótido mencionado em qualquer uma das reivindicações 1 a 17 para a preparação de uma composição farmacêutica para administração oral para a inibição ou regulação, no sentido de reduzir, num mamífero, da expressão de um gene.

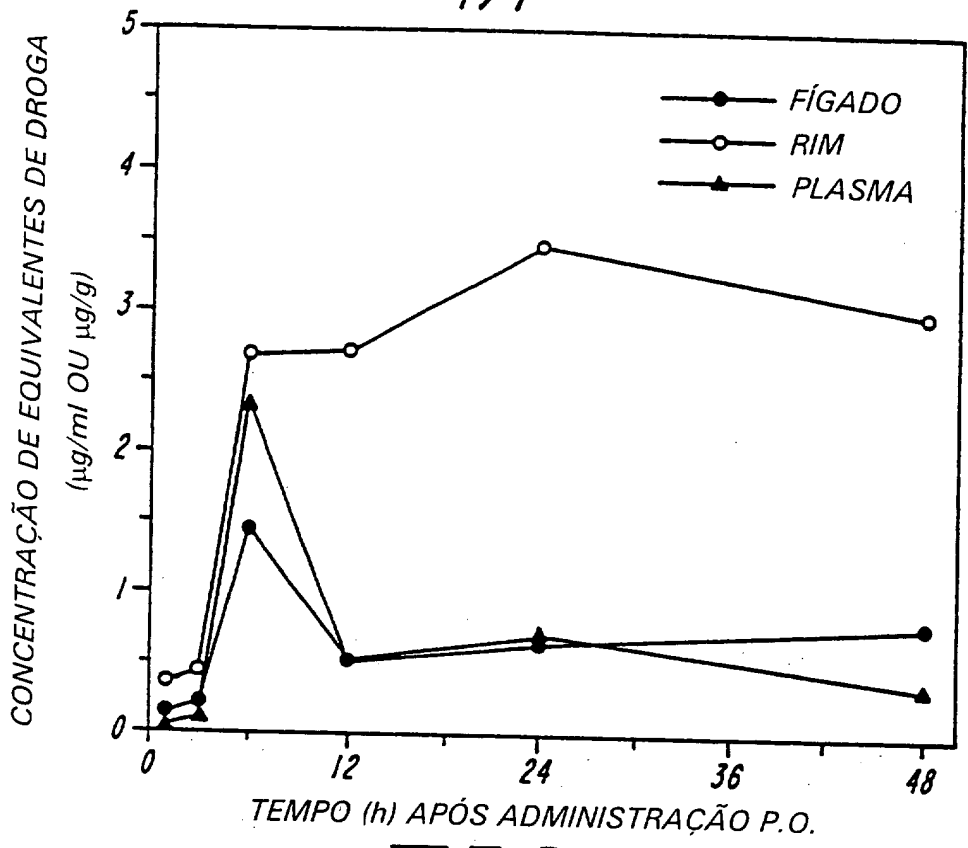
Lisboa, 28. JAN. 2000

Por HYBRIDON, INC.

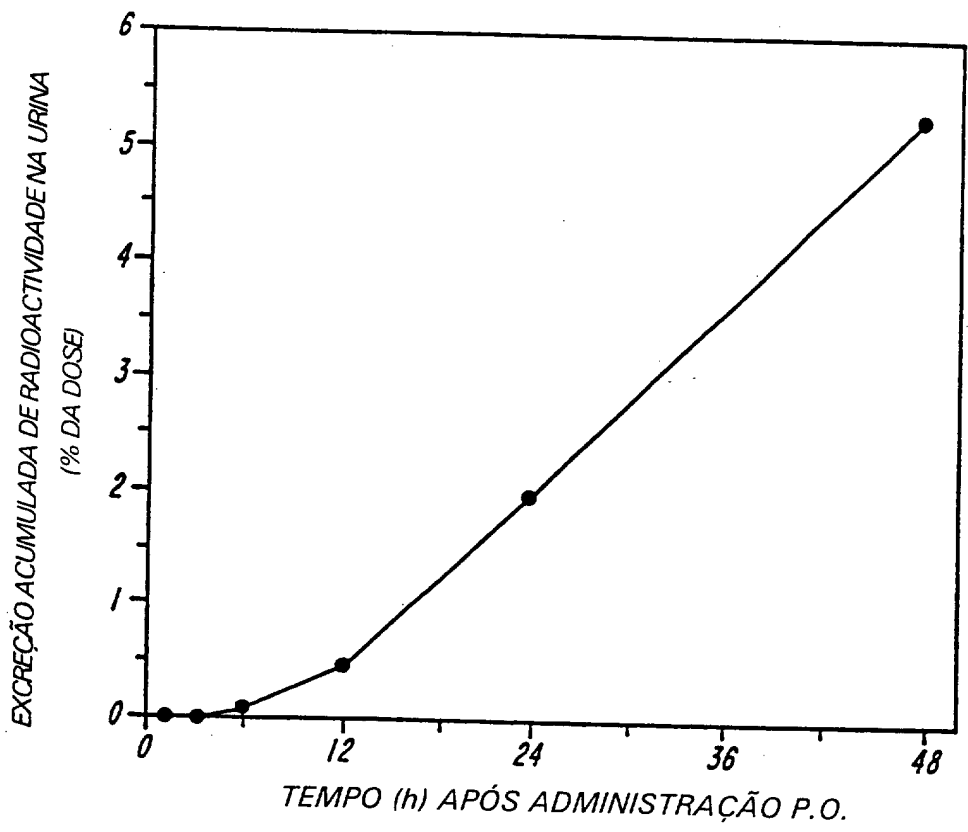
- O AGENTE OFICIAL - ADJUNTO



ENG.º ANTÓNIO JOÃO  
DA CUNHA FERREIRA  
Ag. Of. Pr. Ind.  
Rua das Flores, 74 - 4.º  
1200 LISBOA



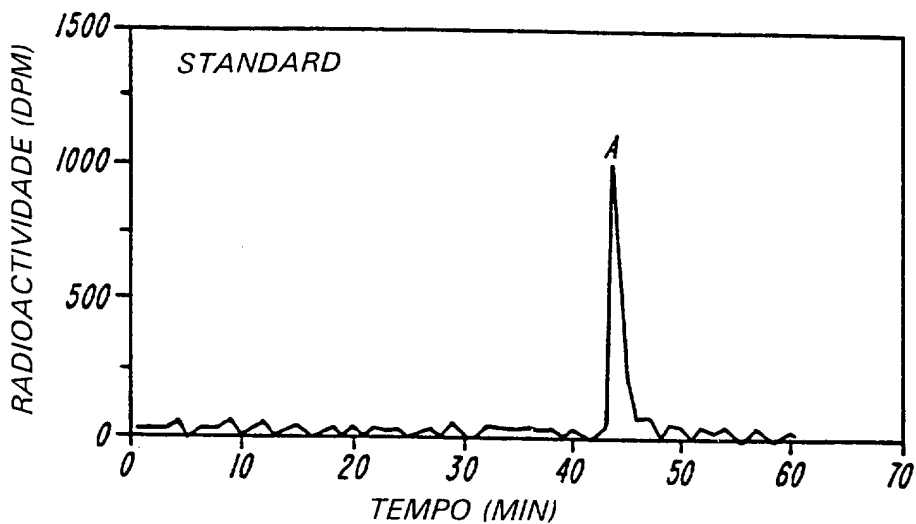
**FIG. 1**



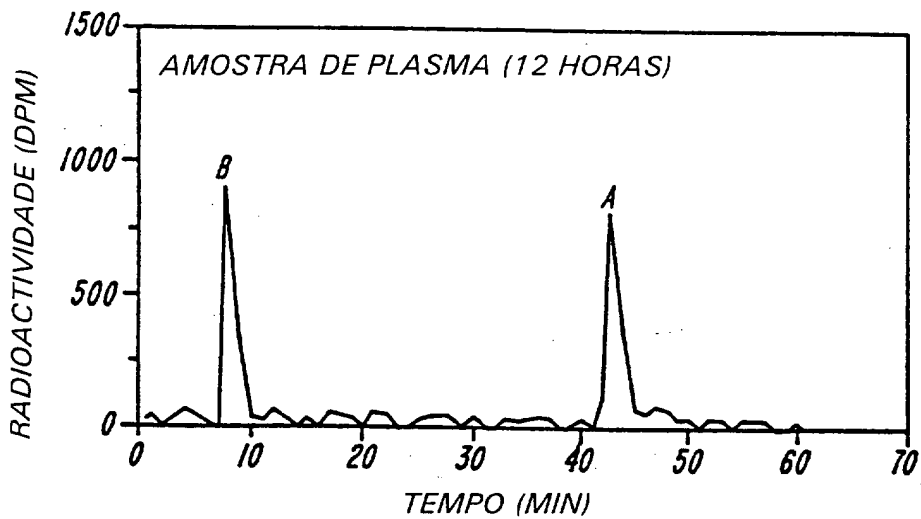
**FIG. 4**

*[Handwritten signature]*

217



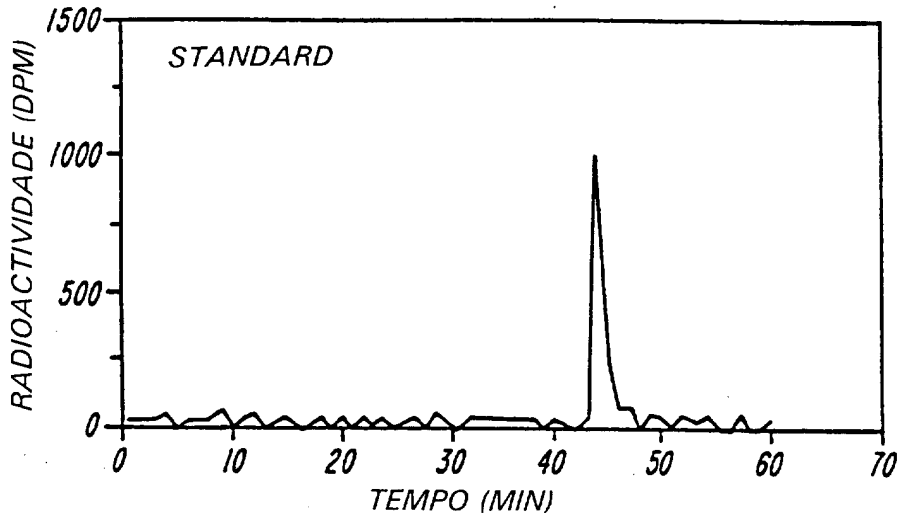
**FIG. 2A**



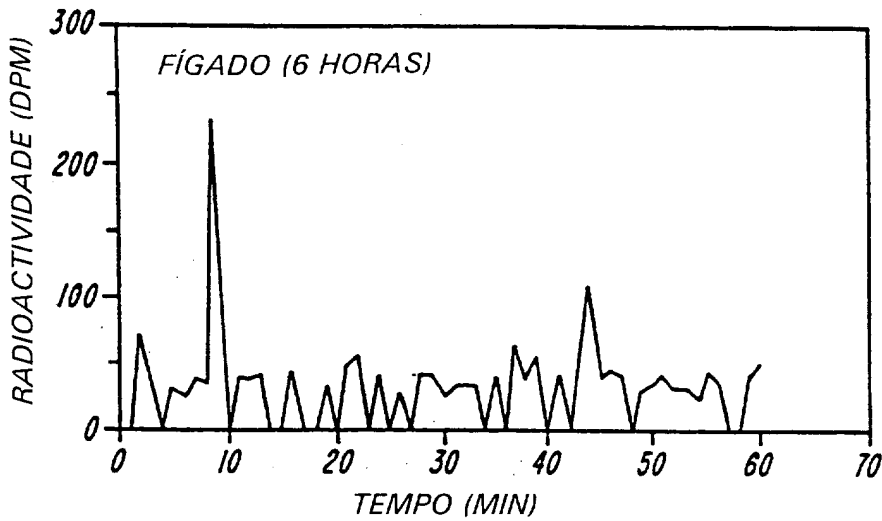
**FIG. 2B**

*[Handwritten signature]*

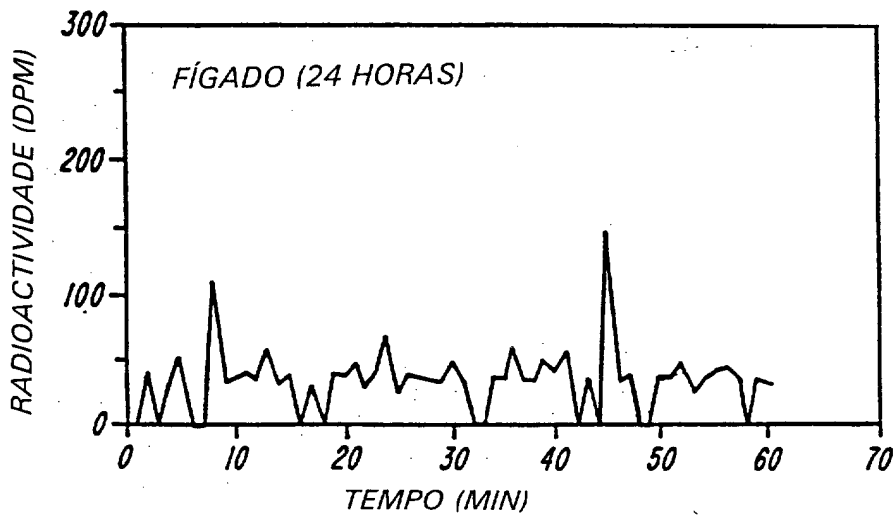
3/7



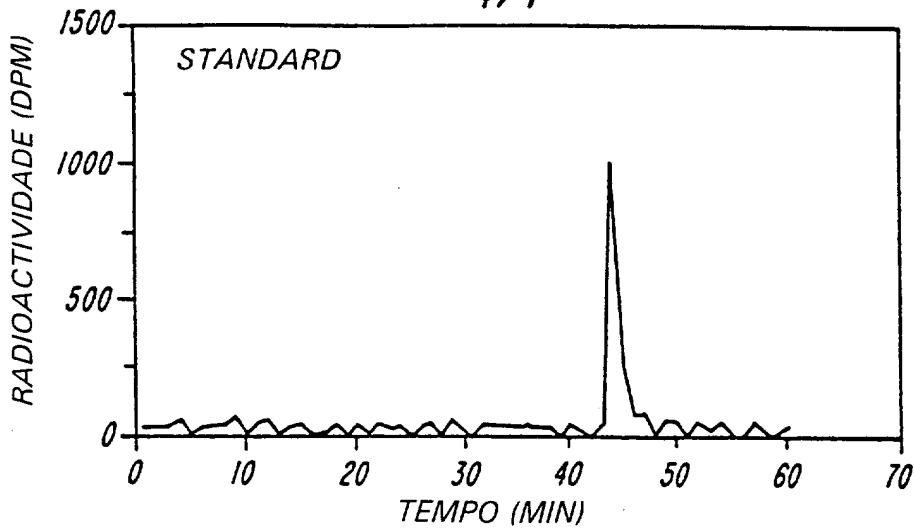
**FIG. 3A**



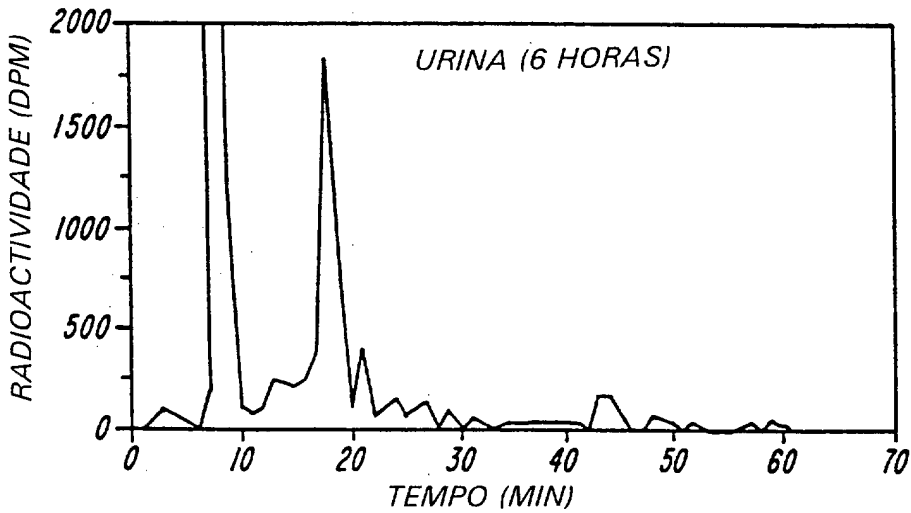
**FIG. 3B**



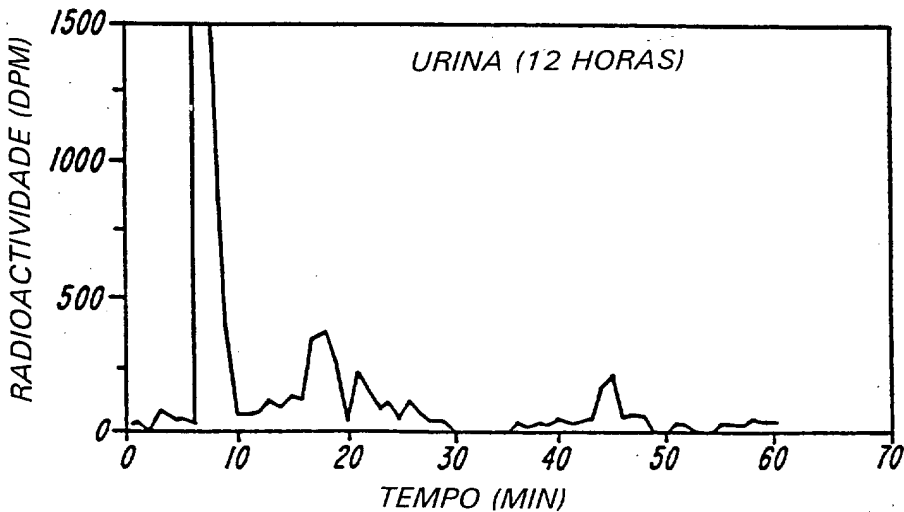
**FIG. 3C**



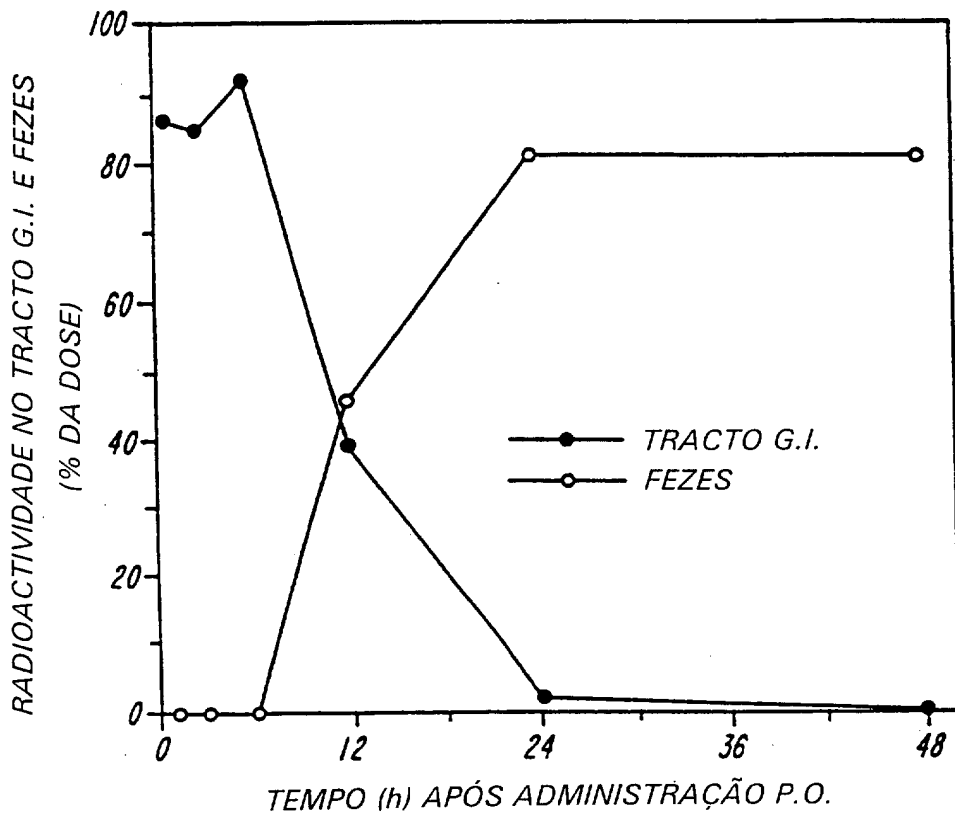
**FIG. 5A**

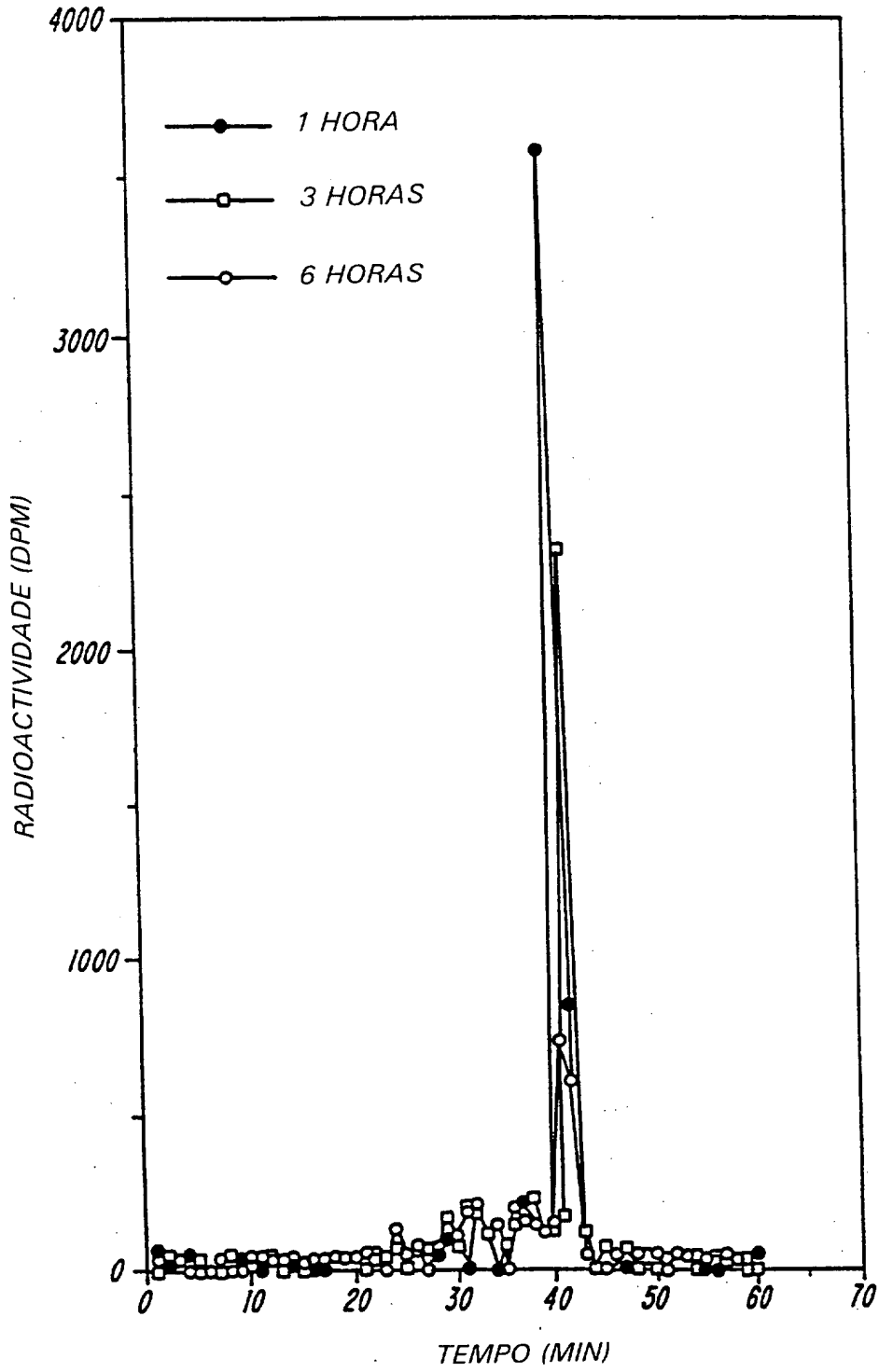


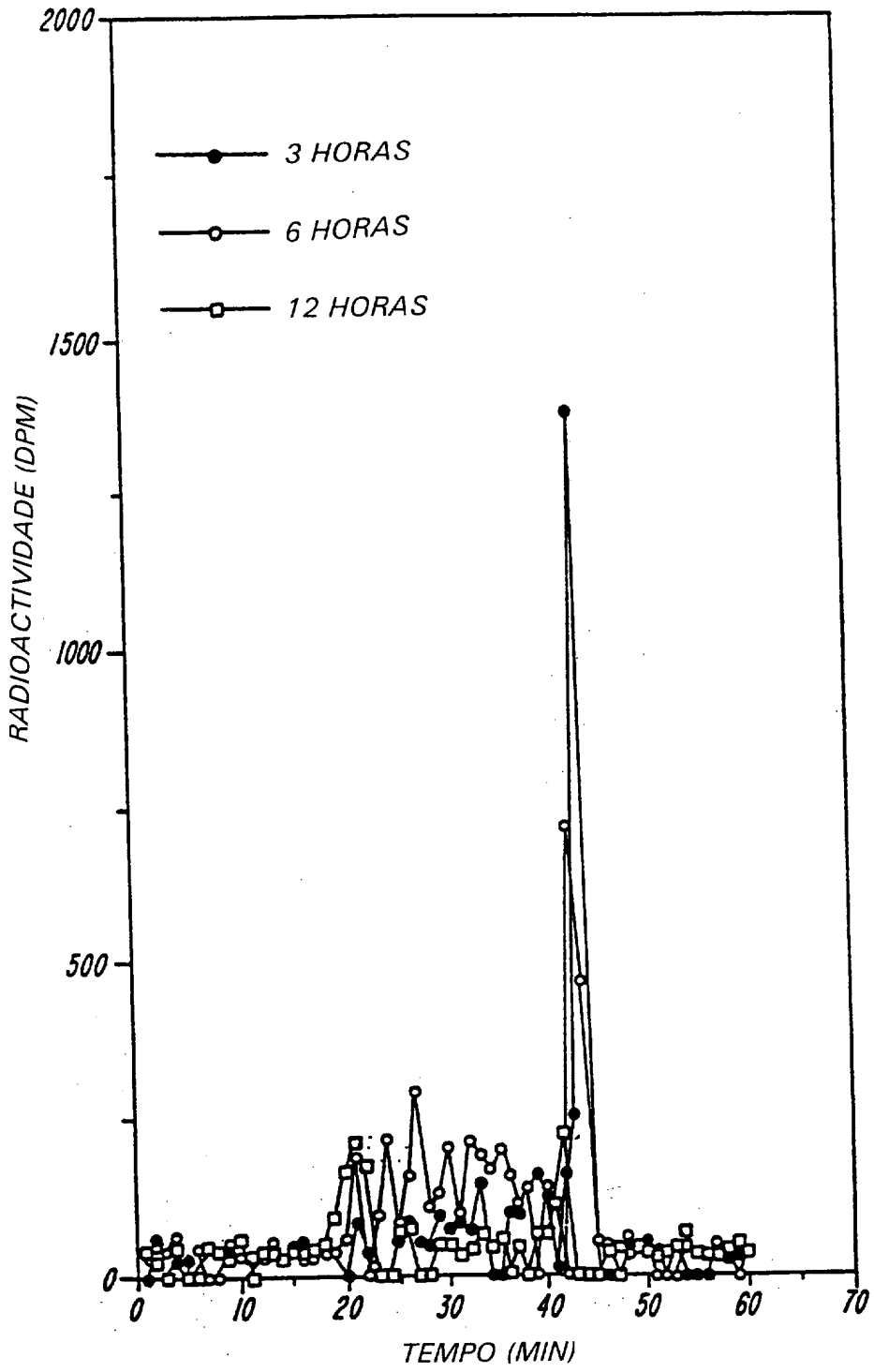
**FIG. 5B**



**FIG. 5C**

**FIG. 6**

*Handwritten signature***FIG. 7**



**FIG. 8**