



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

(21) BR 112021008539-4 A2



(22) Data do Depósito: 07/11/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 03/08/2021

(54) Título: POLÍMEROS DE OLIGONUCLEOTÍDEOS E MÉTODOS DE INIBIÇÃO DE TRANSPORTE DE ANTÍGENO S

(51) Int. Cl.: C07H 21/02; C07H 21/04; A61K 31/712; A61K 31/7125; A61P 1/16; (...).

(30) Prioridade Unionista: 08/11/2018 US 62/757,632; 30/09/2019 US 62/907,845; 31/05/2019 US 62/855,323.

(71) Depositante(es): ALIGOS THERAPEUTICS, INC..

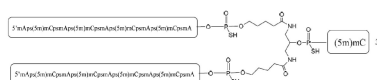
(72) Inventor(es): LEONID BEIGELMAN; RAJENDRA PANDEY; VIVEK KUMAR RAJWANSHI; DAVID BERNARD SMITH; LAWRENCE M. BLATT; JIN HONG.

(86) Pedido PCT: PCT US2019060283 de 07/11/2019

(87) Publicação PCT: WO 2020/097342 de 14/05/2020

(85) Data da Fase Nacional: 03/05/2021

(57) Resumo: Várias modalidades fornecem polímeros STOPS? que são polímeros de oligonucleotídeos que inibem o transporte do antígeno S, processos de produção dos mesmos e métodos de utilização dos mesmos para tratar doenças e condições. Em algumas modalidades os oligonucleotídeos modificados STOPS? incluem uma sequência pelo menos parcialmente fosforotioada de unidades A e C alternadas que têm modificações que são descritas aqui. A atividade antiviral independente da sequência contra hepatite B das modalidades de oligonucleotídeos modificados STOPS?, que é determinada através do HBsAg Secretion Assay, é maior que aquela de um composto de referência.



**“POLÍMEROS DE OLIGONUCLEOTÍDEOS E MÉTODOS DE
INIBIÇÃO DE TRANSPORTE DE ANTÍGENO S”**

RELATÓRIO DESCRITIVO

INFORMAÇÃO DE PEDIDOS CORRELATOS

[0001] Este Pedido de patente reivindica prioridade ao U.S. N°. de Série 62/757,632, depositado em 08 de novembro de 2018; ao U.S. N°. de Série 62/855,323, depositado em 31 de maio de 2019; e ao U.S. N°. de Série 62/907,845, depositado em 30 de setembro de 2019. Cada um dos anteriores é incorporado aqui como referência em sua totalidade.

ANTECEDENTE

Campo

[0002] Este Pedido de patente refere-se a STOPSTTM compostos antivirais que são polímeros de oligonucleotídeos que inibem o transporte do antígeno S, processos para produção dos mesmos e métodos de utilização dos mesmos para tratar doenças e condições.

Descrição

[0003] Os compostos STOPSTTM descritos aqui são oligonucleotídeos antivirais que podem ser pelo menos parcialmente fosforotioados e exercem sua atividade antiviral através de um modo de ação não dependente da sequência. Ver A. Vaillant, “Nucleic acid polymers: Broad spectrum antiviral activity, antiviral mechanisms and optimization for the treatment of hepatitis B and hepatitis D infection”, Antiviral Research 133, 32-40 (2016). O termo “Nucleic Acid Polymer” (NAP) tem sido utilizado na literatura para se referir a estes oligonucleotídeos, embora este termo não necessariamente implique atividade antiviral. Um número de pedidos de patentes depositados

no início dos anos 2000 divulgou as estruturas de certos compostos específicos e identificou várias opções estruturais como áreas potenciais para experimentos futuros. Ver, por exemplo, as Patentes U.S. Nos. 7.358.068; 8.008.269; 8.008.270 e 8.067.385. Estes esforços resultaram na identificação do composto conhecido pelos peritos na técnica como REP 2139, um 40-mer fosforotioado que tem unidades de adenosina-citidina (AC) repetidas com 5-metilação de todas as citosinas e modificação de 2'-O metila de todas as riboses, junto com o composto conhecido como seu progenitor clínico, REP 2055. Ver I. Roehl *et al.*, “Nucleic Acid Polymers with Accelerated Plasma and Tissue Clearance for Chronic Hepatitis B Therapy”, *Molecular Therapy: Nucleic Acids* Vol. 8, 1-12 (2017). Os autores desta publicação indicaram que as características estruturais destes compostos foram otimizadas para o tratamento de hepatite B (HBV) e hepatite D (HBD). Ver also A. Vaillant, “Nucleic acid polymers: Broad spectrum antiviral activity, antiviral mechanisms and optimization for the treatment of hepatitis B and hepatitis D infection”, *Antiviral Research* 133 (2016) 32-40. De acordo com estes autores e com a literatura relacionada, estes compostos conservam a atividade antiviral contra HBV enquanto previnem o reconhecimento pela resposta imunológica inata para permitir seu uso seguro com imunoterapias tal como interferon peguilado. Entretanto, permanece uma necessidade percebida há muito tempo de compostos mais eficientes nesta classe.

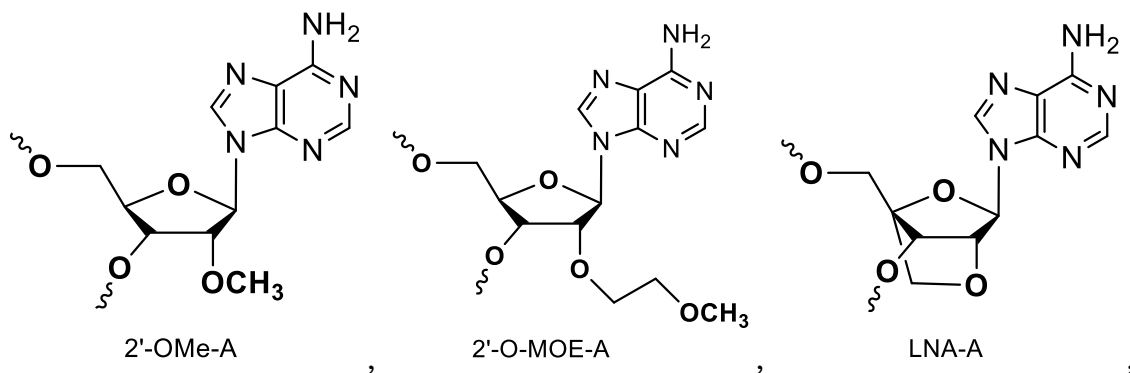
SUMÁRIO

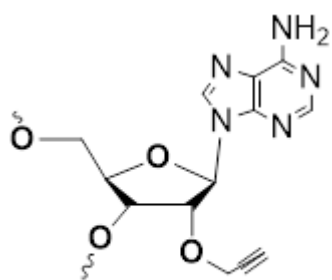
[0004] Foi descoberto agora que, contrárias aos ensinamentos na técnica que consideram a combinação ótima de características estruturais desejáveis para compostos antivirais, propriedades significativamente aprimoradas podem ser obtidas através da modificação dos mesmos para o fornecimento dos compostos STOPS™ que são descritos aqui. Por exemplo,

em algumas modalidades a atividade antiviral independente da sequência dos novos compostos STOPS™ contra o HBV, que é determinada através do Ensaio de Secreção de HBsAg, é maior que aquela de um composto de referência. Em vista dos muitos anos de pesquisa que culminaram na estrutura otimizada reconhecida na técnica de REP 2139, houve pouca expectativa pelos peritos na técnica de que as modalidades dos compostos STOPS™ modificados descritos aqui provavelmente exibiriam de forma razoável tais aprimoramentos na potência. Assim, as estruturas dos novos compostos STOPS™ e métodos de utilização dos mesmos para tratar HBV e HBD são surpreendentes e inesperadas.

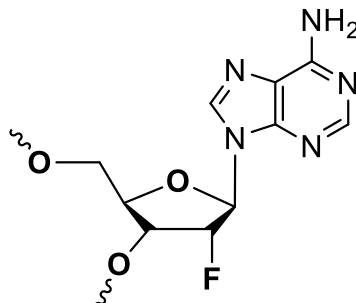
[0005] Algumas modalidades descritas aqui referem-se a um oligonucleotídeo modificado ou um complexo do mesmo que tem atividade antiviral independente da sequência contra hepatite B, que pode incluir uma sequência pelo menos parcialmente fosforotioada de unidades A e C alternadas, em que:

as unidades A compreendem uma ou mais selecionadas de:

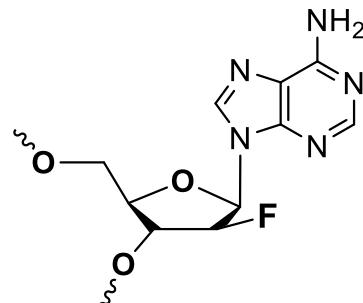




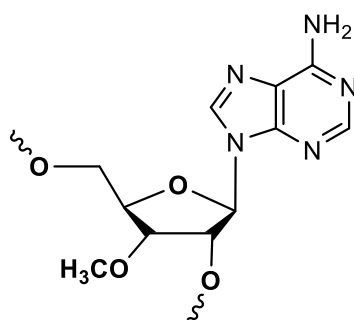
2'-O-Propargil-A



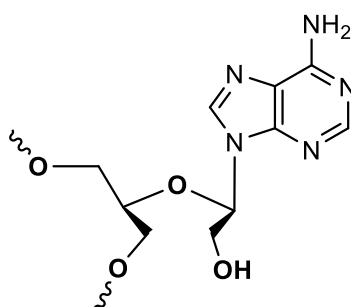
2'-F A



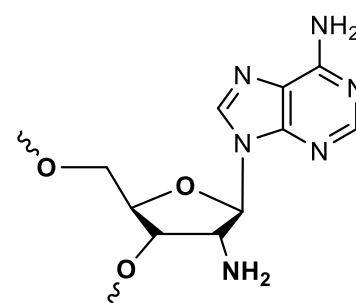
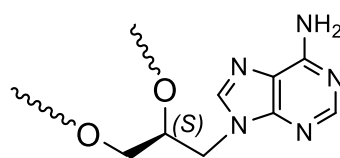
2'-araF A



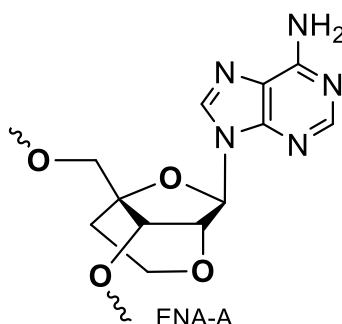
3'-OMe-A



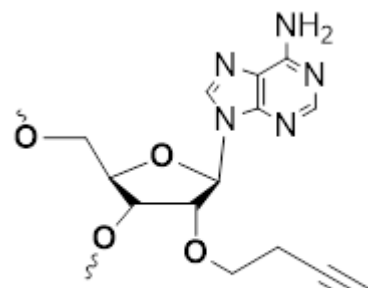
UNA-A

2'-NH₂-A

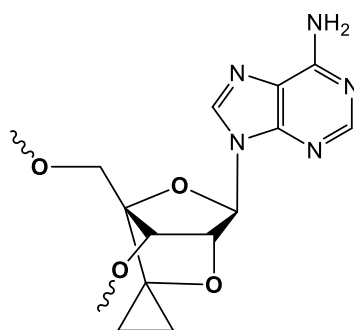
GNA-A



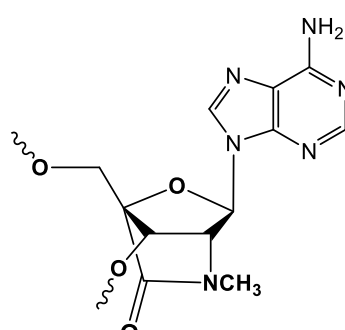
ENA-A



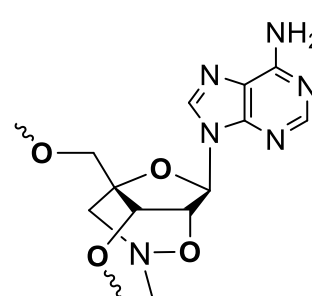
2'-O-Butinil-A,



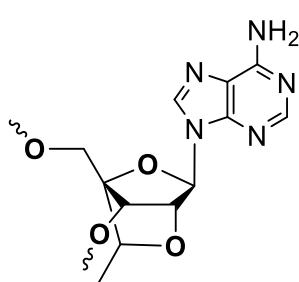
scp-BNA-A



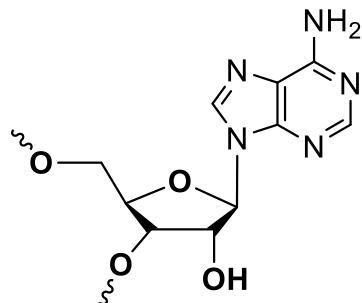
AmNA-(NMe)-A



nmLNA-A



4etl-A

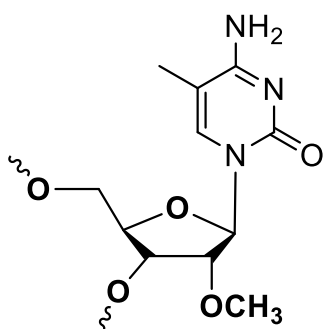


Ribo-A

e

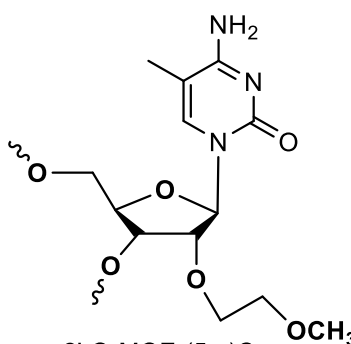
;

as unidades C compreendem uma ou mais selecionadas de



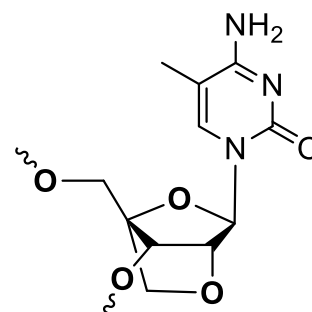
2'-OMe-(5m)C

,



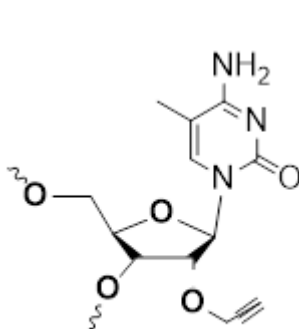
2'-O-MOE-(5m)C

,



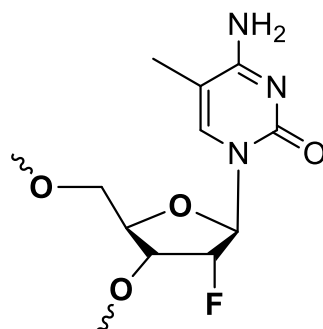
LNA-(5m)C

,



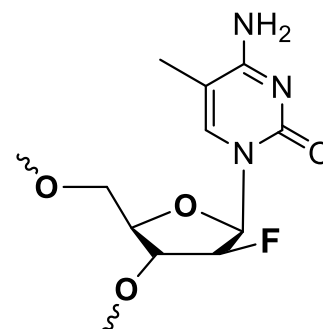
2'-O-Propargyl- (5m)C

,



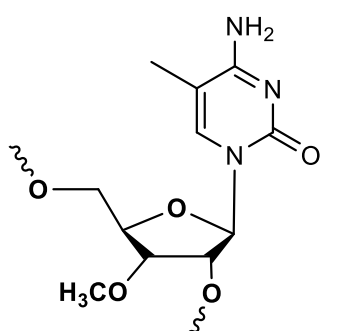
2'-F-(5m)C

,

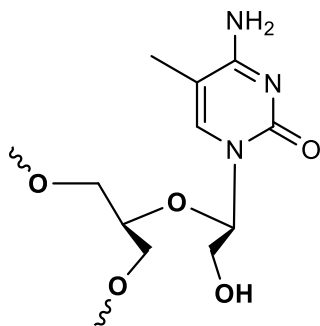


2'-araF-(5m)C

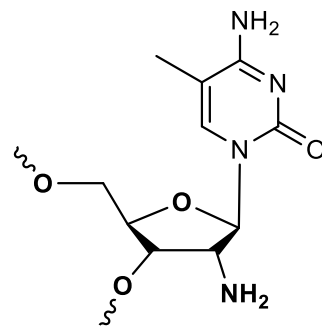
,



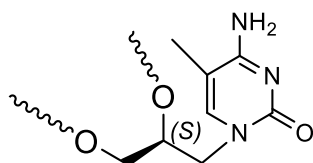
3'-OMe-(5m)C ,



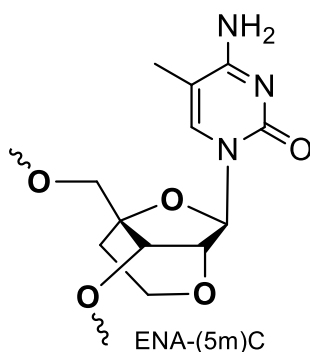
UNA-(5m)C ,



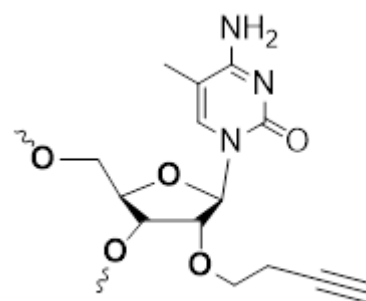
2'-NH2-(5m)C ,



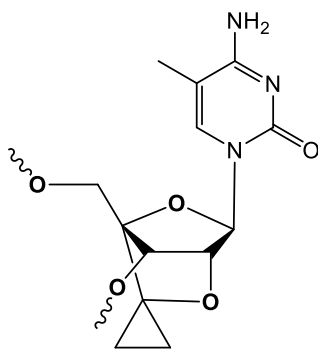
GNA-(5m)C ,



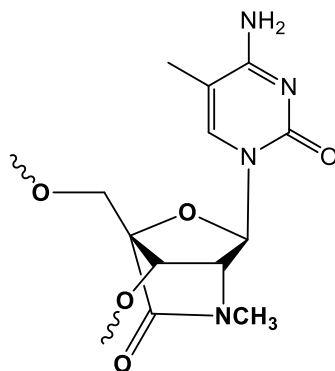
ENA-(5m)C ,



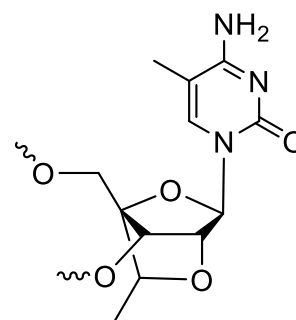
2'-O-Butinil-(5m)C ,



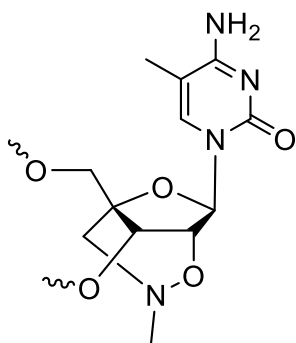
scp-BNA-(5m)C ,



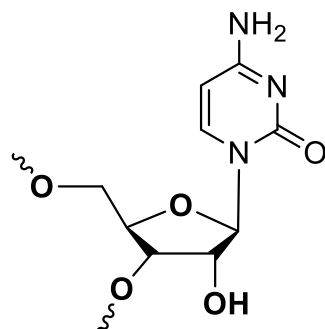
AmNA-(NMe)-(5m)C ,



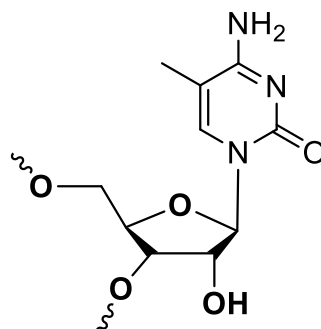
4etl-(5m)C ,



nmLNA-(5m)C ,



Ribo-C



Ribo-(5m)C ;

[0006] cada $\sim\text{O}$ terminal é independentemente hidroxila, um fosforotioato de O,O-dihidrogênio, um bifosfato de hidrogênio, um *endcap* ou um grupo de ligação;

[0007] cada $\sim\text{O}$ interno é uma ligação que contém fósforo com uma unidade A ou C vizinha, a ligação contendo fósforo sendo uma ligação fosforotioato ou uma ligação modificada selecionada de fosfodiéster, fosforoditioato, metilfosfonato, difosforotioato, 5'-fosforamidato, 3',5'-fosfordiamidato, 5'-tiofosforamidato, 3',5'-tiofosfordiamidato ou difosfodiéster; e

[0008] a atividade antiviral independente da sequência contra hepatite B, que é determinada através do Ensaio de Secreção de HBsAg, é maior que aquela de um composto de referência;

[0009] com a condição de que, quando a sequência de unidades A e C alternadas compreender uma unidade Ribo-A, a sequência compreende ainda pelo menos uma unidade A que não é uma unidade Ribo-A; e

[0010] com a condição de que, quando a sequência de unidades A e C alternadas compreender uma unidade Ribo-C, a sequência compreende ainda pelo menos uma unidade C que não é uma unidade Ribo-C.

[0011] Algumas modalidades descritas aqui se referem a um método de tratamento de uma infecção causada por HBV e/ou HDV que pode incluir a administração a um indivíduo identificado como sofrendo da infecção causada por HBV e/ou HDV de uma quantidade eficiente de um oligonucleotídeo modificado que é descrito aqui ou uma composição farmacêutica que inclui uma quantidade eficiente de um oligonucleotídeo modificado que é descrito aqui.

[0012] Algumas modalidades divulgadas aqui se referem a um método

de inibição da replicação de HBV e/ou HDV que pode incluir o contato de uma célula infectada com o HBV e/ou o HDV com uma quantidade eficiente de um oligonucleotídeo modificado que é descrito aqui ou uma composição farmacêutica que inclui uma quantidade eficiente de um oligonucleotídeo modificado que é descrito aqui.

[0013] Estas são outras modalidades são descritas em maiores detalhes a seguir

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0014] A **FIG. 1** ilustra uma modalidade de um oligonucleotídeo modificado que compreende uma ligação C₂₋₆alquilenos.

[0015] A **FIG. 2** ilustra uma modalidade de um oligonucleotídeo modificado que compreende uma ligação de óxido de propileno.

[0016] A **FIG. 3A** ilustra uma modalidade de um oligonucleotídeo modificado que tem colesterol ligado através de uma ligação de tetraetileno glicol (TEG) a 5'.

[0017] A **FIG. 3B** ilustra uma modalidade de um oligonucleotídeo modificado que tem colesterol ligado através de uma ligação TEG a 3'.

[0018] A **FIG. 3C** ilustra uma modalidade de um oligonucleotídeo modificado que tem um tocoferol (Vitamina E) ligado através de uma ligação TEG a 5'.

[0019] A **FIG. 3D** ilustra uma modalidade de um oligonucleotídeo modificado que tem um tocoferol (Vitamina E) ligado através de uma ligação TEG a 3'.

[0020] As **FIGS. 4A e 4B** ilustram modalidades de oligonucleotídeos modificados que têm GalNac ligado através de um grupo de ligação.

[0021] A **FIG. 5** ilustra uma modalidade de um esquema de reação para preparação de um bloco de construção 5'-EP.

[0022] A **FIG. 6A** ilustra modalidades de oligonucleotídeos modificados e valores correspondentes de atividade antiviral independente da sequência contra hepatite B (que é determinada através do Ensaio de Secreção de HBsAg) e citotoxicidade.

[0023] A **FIG. 6B** ilustra modalidades de oligonucleotídeos modificados e valores correspondentes de atividade antiviral independente da sequência contra hepatite B (que é determinada através do Ensaio de Secreção de HBsAg) e citotoxicidade.

[0024] A **FIG. 7** ilustra uma modalidade de um esquema de reação para preparação do composto 5'-VP.

[0025] A **FIG. 8** ilustra uma modalidade de um esquema de reação para preparação de compostos **8-5** e **8-6**.

[0026] A **FIG. 9A** ilustra uma modalidade de um esquema de reação para preparação do composto **9R**.

[0027] A **FIG. 9B** ilustra uma modalidade de um esquema de reação para preparação do composto **9S**.

[0028] A **FIG. 10** ilustra uma modalidade de um esquema de reação para preparação dos compostos **10-5** e **10-6**.

[0029] A **FIG. 11A** ilustra uma modalidade de um esquema de reação para preparação do composto **11R**.

[0030] A **FIG. 11B** ilustra uma modalidade de um esquema de reação para preparação do composto **11S**.

[0031] A **FIG. 12** ilustra resultados de exposição ao fígado após a

administração subcutânea a primatas não humanos de modalidades de compostos oligonucleotídicos modificados.

[0032] A **FIG. 13** ilustra resultados do ensaio de PBMC que ilustram a reação imunológica de modalidades de compostos oligonucleotídicos modificados.

[0033] A **FIG. 14** ilustra resultados do ensaio de PBMC que ilustram a reação imunológica de modalidades de compostos oligonucleotídicos modificados.

[0034] A **FIG. 15** ilustra resultados do ensaio de PBMC que ilustram a reação imunológica de modalidades de compostos oligonucleotídicos modificados.

[0035] A **FIG. 16** ilustra resultados do ensaio de PBMC que ilustram a reação imunológica de modalidades de compostos oligonucleotídicos modificados.

[0036] A **FIG. 17** ilustra resultados do ensaio de PBMC que ilustram a reação imunológica de modalidades de compostos oligonucleotídicos modificados.

[0037] A **FIG. 18** ilustra resultados do ensaio de PBMC que ilustram a reação imunológica de modalidades de compostos oligonucleotídicos modificados.

[0038] A **FIG. 19** ilustra resultados do ensaio de PBMC que ilustram a reação imunológica de modalidades de compostos oligonucleotídicos modificados.

[0039] A **FIG. 20** ilustra resultados do ensaio de PBMC que ilustram a reação imunológica de modalidades de compostos oligonucleotídicos

modificados.

[0040] A **FIG. 21** ilustra resultados do ensaio de PBMC que ilustram a reação imunológica de modalidades de compostos oligonucleotídicos modificados.

[0041] A **FIG. 22** ilustra resultados do ensaio de PBMC que ilustram a reação imunológica de modalidades de compostos oligonucleotídicos modificados.

[0042] A **FIG. 23** ilustra um gráfico que é utilizado em conexão com os Ensaio de Secreção de HBsAgs descritos nos Exemplos B3 e B4.

DESCRIÇÃO DETALHADA

Definições

[0043] A não ser que seja definido o contrário, todos os termos técnicos e científicos utilizados aqui têm o mesmo significado que é comumente entendido por um perito comum na técnica. Todas as patentes, os pedidos de patentes, os pedidos de patentes publicados e outras publicações referidas aqui são incorporados como referência em sua totalidade a não ser que seja declarado o contrário. No caso em que houver um grande número de definições para um termo aqui, aquelas nesta seção prevalecem a não ser que seja citado o contrário.

[0044] O vírus da hepatite B (HBV) é um vírus de DNA e um membro da família *Hepadnaviridae*. O HBV infecta mais de 300 milhões no mundo todo e é um agente causador de câncer de fígado e de doença no fígado tal como hepatite crônica, cirrose e carcinoma hepatocelular. O HBV pode ser agudo e/ou crônico. A infecção aguda por HBV pode ser assintomática ou se apresenta com hepatite aguda sintomática. O HBV é classificado em oito genótipos, A a H.

[0045] O HBV é um DNA circular parcialmente de filamento duplo de aproximadamente 3,2 pares de quilobases (kb). A via de replicação do HBV foi estudada em grandes detalhes. *T.J. Liang, Hepatology (2009) 49(5 Suppl):S13-S21*. Uma parte da replicação inclui a formação da forma circular fechada de forma covalente (cccDNA). A presença da cccDNA dá origem ao risco de nova emergência viral ao longo de toda a vida do organismo hospedeiro. Os portadores de HBV podem transmitir a doença durante muitos anos. Uma estimativa de 257 milhões de pessoas está vivendo com infecção por vírus da hepatite B e é estimado que mais de 750.000 pessoas no mundo todo morra de hepatite B todos os anos. Em adição, os indivíduos imunossuprimidos ou os indivíduos submetidos à quimioterapia estão especialmente em risco de reativação de uma infecção por HBV.

[0046] O HBV pode ser transmitido por sangue, sêmen e/ou outro fluido corporal. Isto pode ocorrer através do contato direto sangue-sangue, sexo desprotegido, compartilhamento de agulhas e de uma mãe infectada para seu bebê durante o processo de parto. O antígeno de superfície do HBV (HBsAg) é mais frequentemente utilizado para verificar a presença desta infecção. As medicações disponíveis atualmente não curam uma infecção por HBV e/ou HDV. Ao invés disso, as medições suprimem a replicação do vírus.

[0047] O vírus da hepatite D (HDV) é um vírus de DNA, também na família Hepadnaviridae de vírus. O HDV pode se propagar apenas na presença de HBV. As rotas de transmissão de HDV são similares àquelas para o HBV. A transmissão do HDV pode ocorrer através da infecção simultânea com HBV (coinfecção) ou em adição à hepatite crônica B ou ao estado de portador de hepatite B (superinfecção). Tanto a superinfecção quanto a coinfecção com HDV resultam em complicações mais graves comparadas com a infecção por HBV sozinho. Estas complicações incluem

uma maior probabilidade de sofrer falência do fígado nas infecções agudas e uma progressão rápida em cirrose do fígado, com um risco maior de desenvolvimento de câncer do fígado em infecções crônicas. Em combinação com a hepatite B, a hepatite D tem a taxa de fatalidade mais alta de todas as infecções de hepatite, em 20%. Atualmente não há cura ou vacina para a hepatite D.

[0048] Como utilizado aqui no contexto de oligonucleotídeos ou outros materiais, o termo “antiviral” tem seu significado usual que é entendido pelos peritos na técnica e inclui assim um efeito da presença dos oligonucleotídeos ou outro material que inibe a produção de partículas virais, tipicamente através da redução do número de partículas virais infecciosas formadas em um sistema de outra maneira adequado para a formação de partículas virais infecciosas para pelo menos um vírus. Em certas modalidades, o oligonucleotídeo antiviral tem atividade antiviral contra vários vírus diferentes, por exemplo, tanto HBV quanto HDV.

[0049] Como utilizado aqui o termo “oligonucleotídeo” (ou “oligo”) tem seu significado usual que é entendido pelos peritos na técnica e refere-se assim a uma classe de compostos que inclui oligodesoxinucleotídeos, oligodesoxirribonucleotídeos e oligorribonucleotídeos. Assim, “oligonucleotídeo” refere-se a um oligômero ou um polímero de ácido ribonucleico (RNA) ou ácido desoxirribonucleico (DNA) ou miméticos dos mesmos, incluindo referência a oligonucleotídeos compostos de nucleobases, açúcares e ligações internucleosídeos (estruturais) de fosfodiéster (PO) que ocorrem naturalmente bem como oligonucleotídeos “modificados” ou substituídos que têm partes que ocorrem naturalmente que funcionam similarmente. Assim, o termo oligonucleotídeo “modificado” (ou “substituído”) tem seu significado usual que é entendido pelos peritos na técnica e inclui oligonucleotídeos que têm uma ou mais de várias

modificações, por exemplo, modificações estabilizantes e assim pode incluir pelo menos uma modificação na ligações internucleosídeos e/ou na ribose e/ou na base. Por exemplo, um oligonucleotídeo modificado pode incluir modificações na posição a 2' da ribose, análogos de nucleotídeos acíclicos, metilação da base, ligações fosforotioadas (PS), ligações fosforoditioato, ligações metilfosfonato, ligações que se conectam ao anel de açúcar através de enxofre ou nitrogênio e/ou outras modificações que são descritas em outros locais aqui. Assim, um oligonucleotídeo modificado pode incluir uma ou mais ligações fosforotioadas (PS), no lugar ou em adição às ligações. Como os oligonucleotídeos não modificados, os oligonucleotídeos modificados que incluem estas ligações são considerados como estando na mesma classe de compostos porque muito embora a ligação PS contenha uma ligação dupla de fósforo-enxofre no lugar da ligação dupla de fósforo-oxigênio de uma ligação PO, tanto a ligação PS quanto a PO se conectam aos anéis de açúcar através de átomos de oxigênio.

[0050] Como utilizado aqui no contexto de oligonucleotídeos modificados, o termo oligonucleotídeo “fosforotioado” tem seu significado usual que é entendido pelos peritos na técnica e refere-se assim a um oligonucleotídeo modificado no qual todos os internucleosídeos da ligação fosfodiéster foram substituídos por ligações fosforotioato. Os peritos na técnica entendem assim que o termo oligonucleotídeo “fosforotioado” é sinônimo de oligonucleotídeo “totalmente fosforotioado”. Um oligonucleotídeo fosforotioado (ou uma sequência de oligonucleotídeos fosforotioados dentro de um oligonucleotídeo parcialmente fosforotioado) pode ser modificado de forma análoga, inclusive (por exemplo) através da substituição de uma ou mais ligações internucleosídeos fosforotioadas por ligações fosfodiéster. Assim, o termo oligonucleotídeo “fosforotioado modificado” refere-se a um oligonucleotídeo fosforotioado que foi modificado da maneira análoga àquela descrita aqui em relação aos oligonucleotídeos,

por exemplo, através da substituição de uma ligação fosforotioada por uma ligação modificada tal como fosfodiéster, fosforoditioato, metilfosfonato, difosforotioato, 5'-fosforamidato, 3',5'-fosfordiamidato, 5'-tiofosforamidato, 3',5'-tiofosfordiamidato ou difosfodiéster. Uma sequência pelo menos parcialmente fosforotioada de um oligonucleotídeo modificado pode ser modificada similarmente e assim, por exemplo, pode ser modificada para conter uma ligação não fosforotioada tal como fosfodiéster, fosforoditioato, metilfosfonato, difosforotioato 5'-fosforamidato, 3',5'-fosfordiamidato, 5'-tiofosforamidato, 3',5'-tiofosfordiamidato ou difosfodiéster. No contexto de descrição de modificações em um oligonucleotídeo fosforotioado ou em uma sequência pelo menos parcialmente fosforotioada de um oligonucleotídeo modificado, a modificação por inclusão de uma ligação fosfodiéster pode ser considerada como resultando em um oligonucleotídeo fosforotioado modificado ou em uma sequência fosforotioada modificada, respectivamente. De maneira análoga, no contexto de descrição das modificações em um oligonucleotídeo ou em uma sequência pelo menos parcialmente fosfodiesterificada de um oligonucleotídeo modificado, a inclusão de uma ligação fosforotioada pode ser considerada com o resultando em um oligonucleotídeo modificado ou uma sequência fosfodiesterificada modificada, respectivamente.

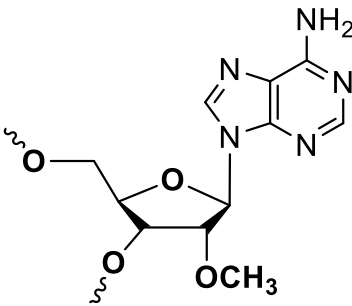
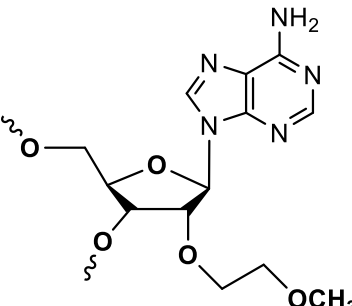
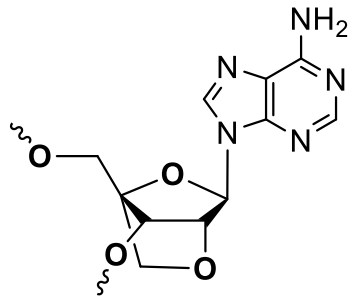
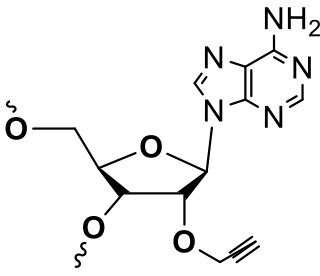
[0051] Como utilizado aqui no contexto de dinucleotídeos ou oligonucleotídeos, o termo “ligação fosforotioato definida de forma estereoquímica” tem seu significado usual que é entendido pelos peritos na técnica e refere-se assim a uma ligação fosforotioato que tem um estereocentro de fósforo com uma quiralidade selecionada (configuração R ou S). Uma composição que contém tal dinucleotídeo ou oligonucleotídeo pode ser enriquecida em moléculas que têm a quiralidade selecionada. A estereopureza de tal composição pode variar ao longo de uma faixa ampla, por exemplo, de aproximadamente 51% a aproximadamente 100%

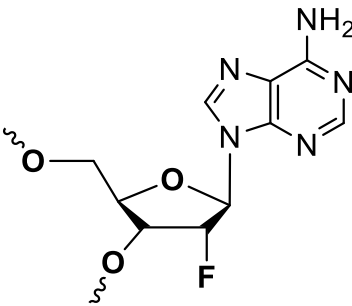
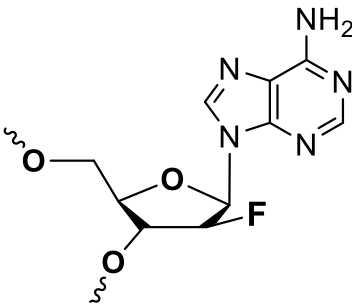
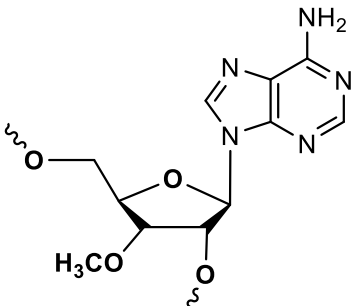
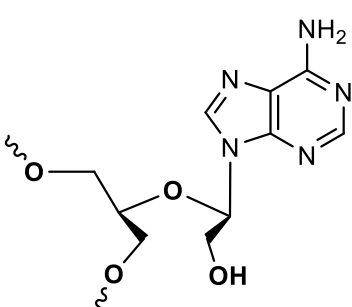
estereopura. Em várias modalidades, a estereopureza é maior que 55%, 65%, 75%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%; ou em uma faixa definida como tendo quaisquer dois dos valores de estereopureza anteriores como pontos finais.

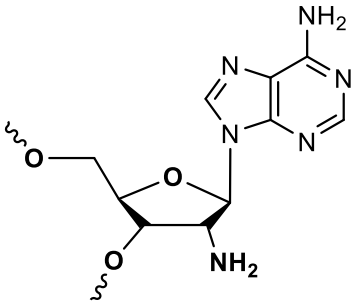
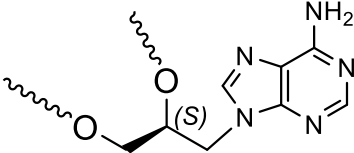
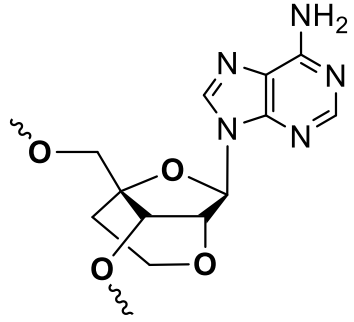
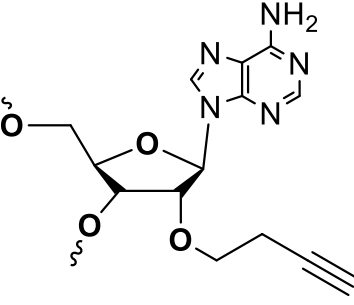
[0052] O termo atividade antiviral “independente da sequência” tem seu significado usual que é entendido pelos peritos na técnica e refere-se assim a uma atividade antiviral de um oligonucleotídeo (por exemplo, um oligonucleotídeo modificado) que é independente da sequência do oligonucleotídeo. Os métodos de determinação do fato de a atividade antiviral de um oligonucleotídeo ser independente da sequência são conhecidos pelos peritos na técnica e incluem os testes de determinação se um oligonucleotídeo age de forma predominante através de um modo de ação não complementar à sequência que é divulgado no Exemplo 10 das Patentes U.S. Nos. 7.358.068; 8.008.269; 8.008.270 e 8.067.385, que são incorporadas aqui como referência e particularmente com a finalidade de descrever tais testes.

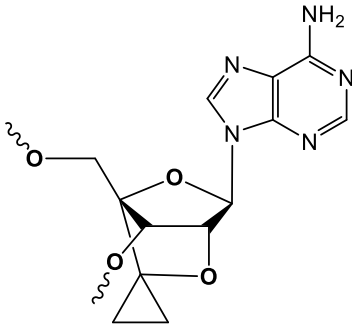
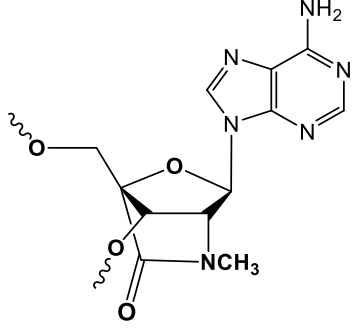
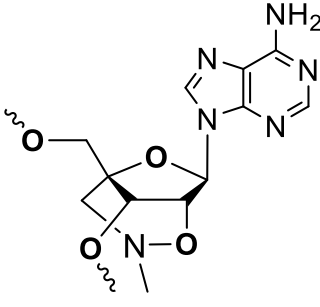
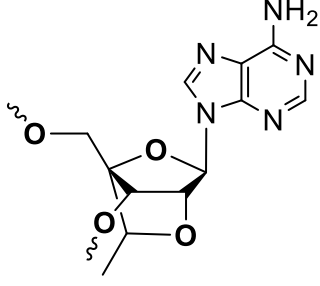
[0053] No contexto da descrição dos oligonucleotídeos modificados que têm atividade antiviral independente da sequência e que compreendem uma sequência (por exemplo, uma sequência pelo menos parcialmente fosforotioada) de unidades A e C (por exemplo, alternando unidades A e C ou unidades AC), os termos “A” e “C” referem-se às unidades que contêm adenosina (A) modificadas e às unidades que consistem de citosina (C) modificadas apresentadas nas Tabela 1 e 2 abaixo, respectivamente.

TABELA 1 – UNIDADES “A”

Abreviação (Unidade A)	Estrutura (Unidade A)
2'-OMe-A	
2'-O-MOE-A	
LNA-A	 LNA-A
2'-O-Propargil-A	

Abreviação (Unidade A)	Estrutura (Unidade A)
2'-F-A	
2'-araF-A	
3'-OMe-A	
UNA-A	

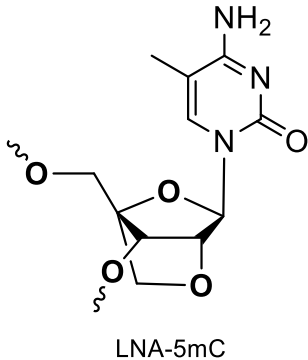
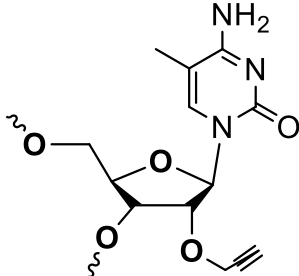
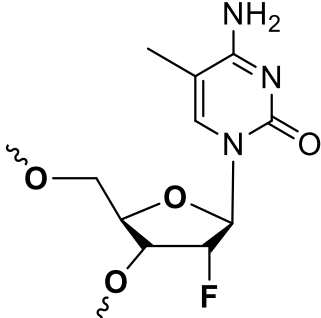
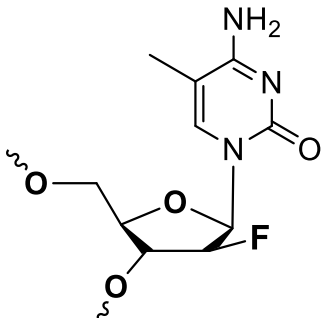
Abreviação (Unidade A)	Estrutura (Unidade A)
2'-NH ₂ -A	
GNA-A	
ENA-A	
2'-O-Butinil-A	

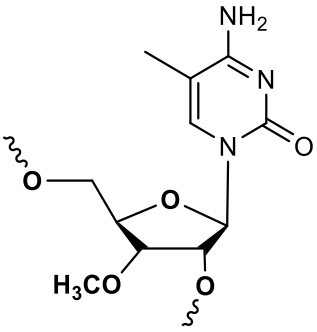
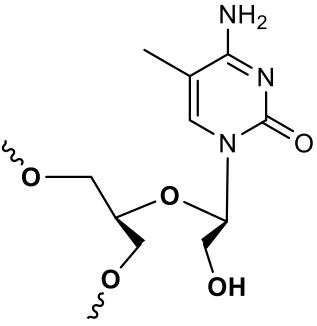
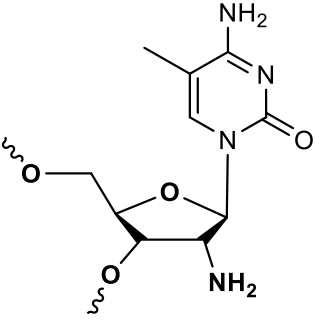
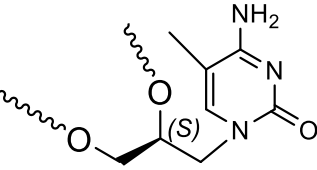
Abreviação (Unidade A)	Estrutura (Unidade A)
scp-BNA-A	
AmNA(NMe)-A	
nmLNA-A	
4etl-A	

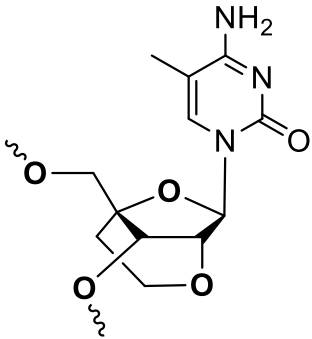
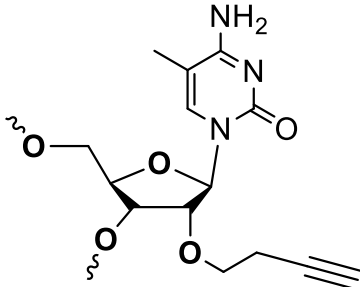
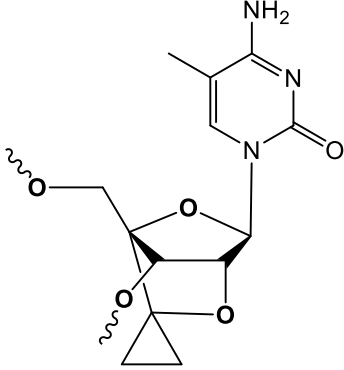
Abreviação (Unidade A)	Estrutura (Unidade A)
Ribo-A	

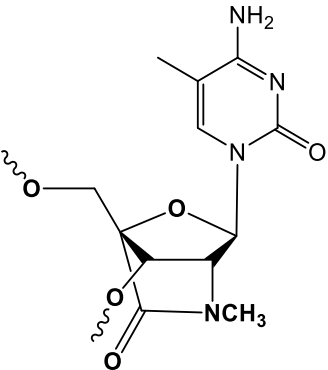
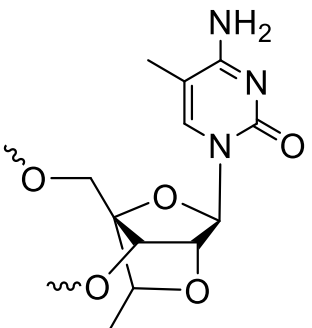
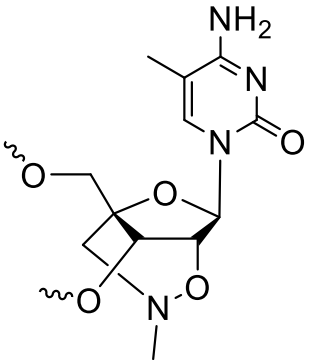
TABLE 2 – UNIDADES “C”

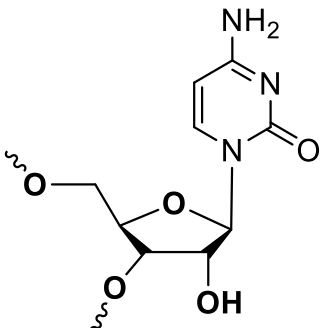
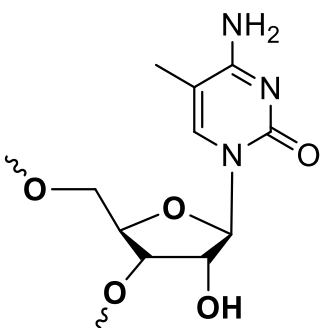
Abreviação (Unidade C)	Estrutura (Unidade C)
2'-OMe-(5m)C	
2'-O-MOE-(5m)C	

Abreviação (Unidade C)	Estrutura (Unidade C)
LNA-(5m)C	 LNA-5mC
2'-O-Propargil-(5m)C	
2'-F-(5m)C	
2'-araF-(5m)C	

Abreviação (Unidade C)	Estrutura (Unidade C)
3'-OMe-(5m)C	
UNA-(5m)C	
2'-NH ₂ -(5m)C	
GNA-(5m)C	

Abreviação (Unidade C)	Estrutura (Unidade C)
ENA-(5m)C	
2'-O-Butinil-(5m)C	
scp-BNA-(5m)C	

Abreviação (Unidade C)	Estrutura (Unidade C)
AmNA-(NMe)-(5m)C	
4etl-(5m)C	
nmLNA-(5m)C	

Abreviação (Unidade C)	Estrutura (Unidade C)
Ribo-C	
Ribo-(5m)C	

Compostos Oligonucleotídicos Modificados

[0054] Uma modalidade fornece um composto oligonucleotídico modificado STOPS™ que tem atividade antiviral independente da sequência contra hepatite B, que compreende uma sequência pelo menos parcialmente fosforotioada de unidades A e C alternadas, em que as unidades A são qualquer uma ou mais selecionadas das apresentadas na Tabela 1 e as unidades C são qualquer uma ou mais selecionadas das apresentadas na Tabela 2. Várias combinações de unidades A e C podem ser incluídas na sequência de AC pelo menos parcialmente fosforotioada, incluindo as combinações descritas na Tabela 3 abaixo.

TABELA 3 – EXEMPLOS DE UNIDADES AC

No.	Unidade A	Unidade C
1	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C
2	2'-OMe-A	2'-O-MOE-(5m)C
3	2'-OMe-A	LNA-(5m)C
4	2'-OMe-A	ENA-(5m)C
5	2'-OMe-A	scp-BNA-(5m)C
6	2'-OMe-A	AmNA-(NMe)-(5m)C
7	2'-OMe-A	2'-O-Propargil-(5m)C
8	2'-OMe-A	2'-O-Butinil-(5m)C
9	2'-OMe-A	2'-F-(5m)C
10	2'-OMe-A	2'-araF-(5m)C
11	2'-OMe-A	3'-OMe-(5m)C
12	2'-OMe-A	UNA-(5m)C
13	2'-OMe-A	2'-NH ₂ -(5m)C
14	2'-OMe-A	GNA-(5m)C
15	2'-OMe-A	4etl-(5m)C
16	2'-OMe-A	nmLNA-(5m)C
17	2'-O-MOE-A	2'-OMe-(5m)C
18	2'-O-MOE-A	2'-O-MOE-(5m)C

No.	Unidade A	Unidade C
19	2'-O-MOE-A	LNA-(5m)C
20	2'-O-MOE-A	ENA-(5m)C
21	2'-O-MOE-A	scp-BNA-(5m)C
22	2'-O-MOE-A	AmNA-(NMe)-(5m)C
23	2'-O-MOE-A	2'-O-Propargil-(5m)C
24	2'-O-MOE-A	2'-O-Butinil-(5m)C
25	2'-O-MOE-A	2'-F-(5m)C
26	2'-O-MOE-A	2'-araF-(5m)C
27	2'-O-MOE-A	3'-OMe-(5m)C
28	2'-O-MOE-A	UNA-(5m)C
29	2'-O-MOE-A	2'-NH ₂ -(5m)C
30	2'- O-MOE-A	GNA-(5m)C
31	2'-O-MOE-A	4etl-(5m)C
32	2'-O-MOE-A	nmLNA-(5m)C
33	LNA-A	2'-OMe-(5m)C
34	LNA-A	2'-O-MOE-(5m)C
35	LNA-A	LNA-(5m)C
36	LNA-A	ENA-(5m)C

No.	Unidade A	Unidade C
37	LNA-A	scp-BNA-(5m)C
38	LNA-A	AmNA-(NMe)-(5m)C
39	LNA-A	2'-O-Propargil-(5m)C
40	LNA-A	2'-O-Butinil-(5m)C
41	LNA-A	2'-F-(5m)C
42	LNA-A	2'-araF-(5m)C
43	LNA-A	3'-OMe-(5m)C
44	LNA-A	UNA-(5m)C
45	LNA-A	2'-NH ₂ -(5m)C
46	LNA-A	GNA-(5m)C
47	LNA-A	4etl-(5m)C
48	LNA-A	nmLNA-(5m)C
49	ENA-A	2'-OMe-(5m)C
50	ENA-A	2'- O-MOE-(5m)C
51	ENA-A	LNA-(5m)C
52	ENA-A	ENA-(5m)C
53	ENA-A	scp-BNA-(5m)C
54	ENA-A	AmNA-(NMe)-(5m)C

No.	Unidade A	Unidade C
55	ENA-A	2'-O-Propargil-(5m)C
56	ENA-A	2'-O-Butinil-(5m)C
57	ENA-A	2'-F-(5m)C
58	ENA-A	2'-araF-(5m)C
59	ENA-A	3'-OMe-(5m)C
60	ENA-A	UNA-(5m)C
61	ENA-A	2'-NH ₂ -(5m)C
62	ENA-A	GNA-(5m)C
63	ENA-A	4etl-(5m)C
64	ENA-A	nmLNA-(5m)C
65	scp-BNA-A	2'-OMe-(5m)C
66	scp-BNA-A	2'- O-MOE-(5m)C
67	scp-BNA-A	LNA-(5m)C
68	scp-BNA-A	ENA-(5m)C
69	scp-BNA-A	scp-BNA-(5m)C
70	scp-BNA-A	AmNA-(NMe)-(5m)C
71	scp-BNA-A	2'-O-Propargil-(5m)C
72	scp-BNA-A	2'-O-Butinil-(5m)C

No.	Unidade A	Unidade C
73	scp-BNA-A	2'-F-(5m)C
74	scp-BNA-A	2'-araF-(5m)C
75	scp-BNA-A	3'-OMe-(5m)C
76	scp-BNA-A	UNA-(5m)C
77	scp-BNA-A	2'-NH ₂ -(5m)C
78	scp-BNA-A	GNA-(5m)C
79	scp-BNA-A	4etl-(5m)C
80	scp-BNA-A	nmLNA-(5m)C
81	AmNA(N-Me)-A	2'-OMe-(5m)C
82	AmNA(N-Me)-A	2'- O-MOE-(5m)C
83	AmNA(N-Me)-A	LNA-(5m)C
84	AmNA(N-Me)-A	ENA-(5m)C
85	AmNA(N-Me)-A	scp-BNA-(5m)C
86	AmNA(N-Me)-A	AmNA-(NMe)-(5m)C
87	AmNA(N-Me)-A	2'-O-Propargil-(5m)C
88	AmNA(N-Me)-A	2'-O-Butinil-(5m)C
89	AmNA(N-Me)-A	2'-F-(5m)C
90	AmNA(N-Me)-A	2'-ara-F-(5m)C

No.	Unidade A	Unidade C
91	AmNA(N-Me)-A	3'-OMe-(5m)C
92	AmNA(N-Me)-A	UNA-(5m)C
93	AmNA(N-Me)-A	2'-NH ₂ -(5m)C
94	AmNA(N-Me)-A	GNA-(5m)C
95	AmNA(N-Me)-A	4etl-(5m)C
96	AmNA(N-Me)-A	nmLNA-(5m)C
97	2'-O-Propargil-A	2'-OMe-(5m)C
98	2'-O-Propargil-A	2'- O-MOE-(5m)C
99	2'-O-Propargil-A	LNA-(5m)C
100	2'-O-Propargil-A	ENA-(5m)C
101	2'-O-Propargil-A	scp-BNA-(5m)C
102	2'-O-Propargil-A	AmNA-(NMe)-(5m)C
103	2'-O-Propargil-A	2'-O-Propargil-(5m)C
104	2'-O-Propargil-A	2'-O-Butino-(5m)C
105	2'-O-Propargil-A	2'-F-(5m)C
106	2'-O-Propargil-A	2'-araF-(5m)C
107	2'-O-Propargil-A	3'-OMe-(5m)C
108	2'-O-Propargil-A	UNA-(5m)C

No.	Unidade A	Unidade C
109	2'-O-Propargil-A	2'-NH ₂ -(5m)C
110	2'-O-Propargil-A	GNA-(5m)C
111	2'-O-Propargil-A	4etl-(5m)C
112	2'-O-Propargil-A	nmLNA-(5m)C
113	2'-O-Butinil-A	2'-OMe-(5m)C
114	2'-O-Butinil-A	2'- O-MOE-(5m)C
115	2'-O-Butinil-A	LNA-(5m)C
116	2'-O-Butinil-A	ENA-(5m)C
117	2'-O-Butinil-A	scp-BNA-(5m)C
118	2'-O-Butinil-A	AmNA-(NMe)-(5m)C
119	2'-O-Butinil-A	2'-O-Propargil-(5m)C
120	2'-O-Butinil-A	2'-O-Butinil-(5m)C
121	2'-O-Butinil-A	2'-F-(5m)C
122	2'-O-Butinil-A	2'-araF-(5m)C
123	2'-O-Butinil-A	3'-OMe-(5m)C
124	2'-O-Butinil-A	UNA-(5m)C
125	2'-O-Butinil-A	2'-NH ₂ -(5m)C
126	2'-O-Butinil-A	GNA-(5m)C

No.	Unidade A	Unidade C
127	2'-O-Butinil-A	4etl-(5m)C
128	2'-O-Butinil-A	nmLNA-(5m)C
129	2'-F A	2'-OMe-(5m)C
130	2'-F A	2'- O-MOE-(5m)C
131	2'-F A	LNA-(5m)C
132	2'-F A	ENA-(5m)C
133	2'-F A	scp-BNA-(5m)C
134	2'-F A	AmNA-(NMe)-(5m)C
135	2'-F A	2'-O-Propargil-(5m)C
136	2'-F A	2'-O-Butinil-(5m)C
137	2'-F A	2'-F-(5m)C
138	2'-F A	2'-ara-F-(5m)C
139	2'-F A	3'-OMe-(5m)C
140	2'-F A	UNA-(5m)C
141	2'-F A	2'-NH ₂ -(5m)C
142	2'-F A	GNA-(5m)C
143	2'-F A	4etl-(5m)C
144	2'-F A	nmLNA-(5m)C

No.	Unidade A	Unidade C
145	2'-araF A	2'-OMe-(5m)C
146	2'-araF A	2'- O-MOE-(5m)C
147	2'-araF A	LNA-(5m)C
148	2'-araF A	ENA-(5m)C
149	2'-araF A	scp-BNA-(5m)C
150	2'-araF A	AmNA-(NMe)-(5m)C
151	2'-araF A	2'-O-Propargil-(5m)C
152	2'-araF A	2'-O-Butinil-(5m)C
153	2'-araF A	2'-F-(5m)C
154	2'-araF A	2'-araF-(5m)C
155	2'-araF A	3'-OMe-(5m)C
159	2'-araF A	UNA-(5m)C
157	2'-araF A	2'-NH ₂ -(5m)C
158	2'-araF A	GNA-(5m)C
159	2'-araF A	4etl-(5m)C
160	2'-araF A	nmLNA-(5m)C
161	3'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C
162	3'-OMe-A	2'- O-MOE-(5m)C

No.	Unidade A	Unidade C
163	3'-OMe-A	LNA-(5m)C
164	3'-OMe-A	ENA-(5m)C
165	3'-OMe-A	scp-BNA-(5m)C
166	3'-OMe-A	AmNA-(NMe)-(5m)C
167	3'-OMe-A	2'-O-Propargil-(5m)C
168	3'-OMe-A	2'-O-Butinil-(5m)C
169	3'-OMe-A	2'-F-(5m)C
170	3'-OMe-A	2'-ara-F-(5m)C
171	3'-OMe-A	3'-OMe-(5m)C
172	3'-OMe-A	UNA-(5m)C
173	3'-OMe-A	2'-NH ₂ -(5m)C
174	3'-OMe-A	GNA-(5m)C
175	3'-OMe-A	4etl-(5m)C
176	3'-OMe-A	nmLNA-(5m)C
177	UNA-A	2'-OMe-(5m)C
178	UNA-A	2'- O-MOE-(5m)C
179	UNA-A	LNA-(5m)C
180	UNA-A	ENA-(5m)C

No.	Unidade A	Unidade C
181	UNA-A	scp-BNA-(5m)C
182	UNA-A	AmNA-(NMe)-(5m)C
183	UNA-A	2'-O-Propargil-(5m)C
184	UNA-A	2'-O-Butinil-(5m)C
185	UNA-A	2'-F-(5m)C
186	UNA-A	2'-araF-(5m)C
187	UNA-A	3'-OMe-(5m)C
188	UNA-A	UNA-(5m)C
189	UNA-A	2'-NH ₂ -(5m)C
190	UNA-A	GNA-(5m)C
191	UNA-A	4etl-(5m)C
192	UNA-A	nmLNA-(5m)C
193	2'-NH ₂ -A	2'-OMe-(5m)C
194	2'-NH ₂ -A	2'-O-MOE-(5m)C
195	2'-NH ₂ -A	LNA-(5m)C
196	2'-NH ₂ -A	ENA-(5m)C
197	2'-NH ₂ -A	scp-BNA-(5m)C
198	2'-NH ₂ -A	AmNA-(NMe)-(5m)C

No.	Unidade A	Unidade C
199	2'-NH ₂ -A	2'-O-Propargil-(5m)C
200	2'-NH ₂ -A	2'-O-Butinil-(5m)C
201	2'-NH ₂ -A	2'-F-(5m)C
202	2'-NH ₂ -A	2'-ara-F-(5m)C
203	2'-NH ₂ -A	3'-OMe-(5m)C
204	2'-NH ₂ -A	UNA-(5m)C
205	2'-NH ₂ -A	2'-NH ₂ -(5m)C
206	2'-NH ₂ -A	GNA-(5m)C
207	2'-NH ₂ -A	4etl-(5m)C
208	2'-NH ₂ -A	nmLNA-(5m)C
209	GNA-A	2'-OMe-(5m)C
210	GNA-A	2'-O-MOE-(5m)C
211	GNA-A	LNA-(5m)C
212	GNA-A	ENA-(5m)C
213	GNA-A	scp-BNA-(5m)C
214	GNA-A	AmNA-(NMe)-(5m)C
215	GNA-A	2'-O-Propargil-(5m)C
216	GNA-A	2'-O-Butinil-(5m)C

No.	Unidade A	Unidade C
217	GNA-A	2'-F-(5m)C
218	GNA-A	2'-ara-F-(5m)C
219	GNA-A	3'-OMe-(5m)C
220	GNA-A	UNA-(5m)C
221	GNA-A	2'-NH ₂ -(5m)C
222	GNA-A	GNA-(5m)C
223	GNA-A	4etl-(5m)C
224	GNA-A	nmLNA-(5m)C
225	nmLNA-A	2'-OMe-(5m)C
226	nmLNA-A	2'-O-MOE-(5m)C
227	nmLNA-A	LNA-(5m)C
228	nmLNA-A	ENA-(5m)C
229	nmLNA-A	scp-BNA-(5m)C
230	nmLNA-A	AmNA-(NMe)-(5m)C
231	nmLNA-A	2'-O-Propargil-(5m)C
232	nmLNA-A	2'-O-Butinil-(5m)C
233	nmLNA-A	2'-F-(5m)C
234	nmLNA-A	2'-ara-F-(5m)C

No.	Unidade A	Unidade C
235	nmLNA-A	3'-OMe-(5m)C
236	nmLNA-A	UNA-(5m)C
237	nmLNA -A	2'-NH ₂ -(5m)C
238	nmLNA-A	GNA-(5m)C
239	nmLNA-A	4etl-(5m)C
240	nmLNA-A	nmLNA-(5m)C
241	4etl-A	2'-OMe-(5m)C
242	4etl-A	2'-O-MOE-(5m)C
243	4etl-A	LNA-(5m)C
244	4etl-A	ENA-(5m)C
245	4etl-A	scp-BNA-(5m)C
246	4etl-A	AmNA-(NMe)-(5m)C
247	4etl-A	2'-O-Propargil-(5m)C
248	4etl-A	2'-O-Butinil-(5m)C
249	4etl-A	2'-F-(5m)C
250	4etl-A	2'-ara-F-(5m)C
251	4etl-A	3'-OMe-(5m)C
252	4etl-A	UNA-(5m)C

No.	Unidade A	Unidade C
253	4etl-A	2'-NH ₂ -(5m)C
254	4etl-A	GNA-(5m)C
255	4etl-A	4etl-(5m)C
256	4etl-A	nmLNA-(5m)C

[0055] O comprimento de um oligonucleotídeo modificado que é descrito aqui pode variar ao longo de uma faixa ampla. Em várias modalidades, um oligonucleotídeo modificado que é descrito aqui compreende uma sequência pelo menos parcialmente fosforotioada de unidades A e C alternadas que tem um comprimento de sequência de aproximadamente 8 unidades, aproximadamente 10 unidades, aproximadamente 12 unidades, aproximadamente 14 unidades, aproximadamente 16 unidades, aproximadamente 18 unidades, aproximadamente 20 unidades, aproximadamente 24 unidades, aproximadamente 30 unidades, aproximadamente 34 unidades, aproximadamente 36 unidades, aproximadamente 38 unidades, aproximadamente 40 unidades, aproximadamente 44 unidades, aproximadamente 50 unidades, aproximadamente 60 unidades, aproximadamente 76 unidades, aproximadamente 100 unidades, aproximadamente 122 unidades, aproximadamente 124 unidades, aproximadamente 150 unidades, aproximadamente 172 unidades, aproximadamente 200 unidades ou um comprimento de sequência em uma faixa entre quaisquer dois dos valores mencionados acima. Por exemplo, em uma modalidade, a sequência pelo menos parcialmente fosforotioada de unidades A e C alternadas tem um comprimento de sequência na faixa de 8

unidades a 200 unidades. Em outra modalidade, a sequência pelo menos parcialmente fosforotioada de unidades A e C alternadas tem um comprimento de sequência que fica em qualquer uma ou mais (quando aplicável) das faixas a seguir: aproximadamente 8 unidades a aproximadamente 36 unidades; aproximadamente 16 unidades a aproximadamente 36 unidades; 20 unidades a 36 unidades; 16 unidades a 30 unidades; 18 unidades a 60 unidades; 20 unidades a 30 unidades; 30 unidades a 50 unidades; 34 unidades a 46 unidades, 36 unidades a 44 unidades; 44 unidades a 200 unidades; 44 unidades a 150 unidades; 44 unidades a 120 unidades; 50 unidades a 200 unidades; 50 unidades a 150 unidades; 50 unidades a 120 unidades; 60 unidades a 200 unidades; 60 unidades a 150 unidades; e/ou 60 unidades a 120 unidades.

[0056] Como descrito em outro local aqui, um oligonucleotídeo modificado pode compreender uma única sequência pelo menos parcialmente fosforotioada de unidades A e C alternadas em algumas modalidades ou em outras modalidades o oligonucleotídeo modificado pode compreender um grande número de sequências pelo menos parcialmente fosforotioadas de unidades A e C alternadas que são ligadas juntas. Assim, um oligonucleotídeo modificado que contém uma única sequência pelo menos parcialmente fosforotioada de unidades A e C alternadas pode ter mesmo comprimento de sequência que tal sequência. Exemplos de tais comprimentos de sequência são descritos em outro local aqui. Similarmente, um oligonucleotídeo modificado que contém um grande número de sequências pelo menos parcialmente fosforotioadas de unidades A e C alternadas pode ter um comprimento de sequência que é o resultado da ligação das sequências que são descritas em outro local aqui. Exemplos de comprimentos de sequência para um oligonucleotídeo modificado que contém um grande número de sequências pelo menos parcialmente fosforotioadas de unidades A e C alternadas são expressos em outro local

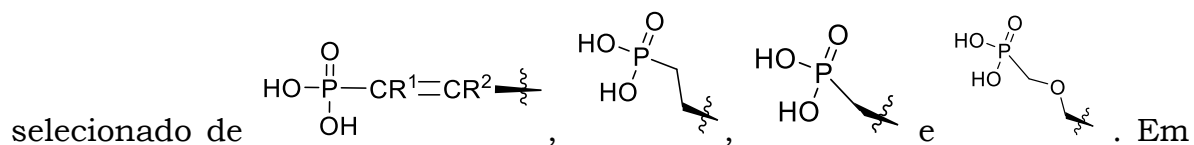
aqui em termos dos comprimentos das sequências individuais e também levando em consideração o comprimento do grupo de ligação.

[0057] Um oligonucleotídeo modificado que é descrito aqui pode compreender um grande número de sequências pelo menos parcialmente fosforotioadas de unidades A e C alternadas. Em uma modalidade, quando a sequência de unidades A e C alternadas compreender uma unidade Ribo-A, a sequência compreende ainda pelo menos uma unidade A que não é uma unidade Ribo-A. Similarmente, em uma modalidade, quando a sequência de unidades A e C alternadas compreender uma unidade Ribo-C, a sequência compreende ainda pelo menos uma unidade C que não é uma unidade Ribo-C. Em uma modalidade, o oligonucleotídeo modificado pode conter uma ou mais de várias unidades de nucleotídeos (conhecidas pelos peritos na técnica, por exemplo, timina, citosina, adenina, guanina e versões modificadas das mesmas) que não são unidades A ou C, por exemplo, como grupo(s) final(is) e/ou como grupo(s) de ligação entre duas ou mais sequências pelo menos parcialmente fosforotioadas de unidades A e C alternadas. Por exemplo, em uma modalidade, o oligonucleotídeo modificado compreende uma ou mais unidades de citosina que ligam juntas pelo menos duas ou mais das sequências pelo menos parcialmente fosforotioadas de unidades A e C alternadas. Em uma modalidade, as duas ou mais sequências pelo menos parcialmente fosforotioadas de unidades A e C alternadas, que são ligadas juntas por um grupo de ligação que não é A/que não é C, são idênticas uma à outra. Um exemplo de tal oligonucleotídeo modificado é (AC)₈-citosina-(AC)₈. Tal oligonucleotídeo modificado que compreende um grande número de sequências idênticas que são ligadas umas às outras pode ser referido aqui como um concatâmero. As duas ou mais sequências pelo menos parcialmente fosforotioadas de unidades A e C alternadas que são ligadas juntas também podem ser diferentes uma da outra. Um exemplo de tal oligonucleotídeo modificado é (AC)₈-citosina-

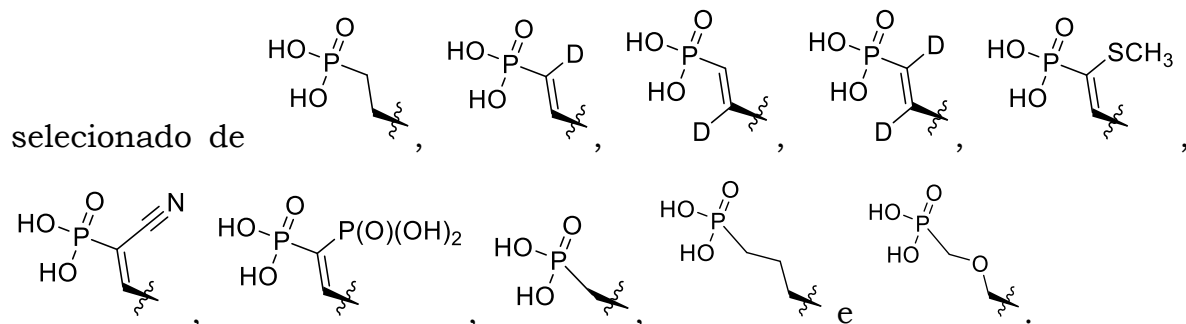
(AC)₁₆.

[0058] O oligonucleotídeo modificado pode conter dois ou mais grupos A diferentes e/ou dois ou mais grupos C diferentes. Quando um grupo A ou C for substituído por um grupo A ou C diferente, esta substituição não é comumente considerada como interrompendo a sequência alternada de unidades A e C. Por exemplo, em uma modalidade, pelo menos algumas das unidades A não são 2'O-metiladas no anel de ribose e/ou pelo menos algumas das unidades C não são 2'O-metiladas no anel de ribose. Entretanto, em algumas modalidades o grupo que liga as duas sequências pelo menos parcialmente fosforotioadas de unidades A e C alternadas é por si só uma unidade A ou C que interrompe a sequência alternada de unidades A e C. Por exemplo, um 16-mer pelo menos parcialmente fosforotioado de unidades A e C alternadas pode ser ligado por uma unidade A a outro dito 16-mer para formar (AC)₈-A-(AC)₈. Similarmente, tal 16-mer pode ser ligado por uma unidade C a outro dito 16-mer para formar (AC)₈-C-(AC)₈. Como citado anteriormente, quando um grande número de sequências pelo menos parcialmente fosforotioadas de unidades A e C alternadas que são idênticas uma à outra for ligado junto por um grupo de ligação, o oligonucleotídeo modificado pode ser referido aqui como um concatâmero. Como citado anteriormente, as duas ou mais sequências pelo menos parcialmente fosforotioadas de unidades A e C alternadas que são ligadas juntas também podem ser diferentes uma da outra. Exemplos de tais oligonucleotídeos modificados incluem (AC)₈-A-(AC)₁₆ e (AC)₈-C-(AC)₁₆.

[0059] Em uma modalidade, o oligonucleotídeo modificado compreende um *endcap* a 5'. Em várias modalidades, o *endcap* a 5' é



uma modalidade, R^1 e R^2 são cada um individualmente selecionados de hidrogênio, deutério, fosfato, tioC₁₋₆alquila e ciano. Por exemplo, em uma modalidade, R^1 e R^2 são ambos hidrogênio e o oligonucleotídeo modificado compreende um *endcap* de fosfonato de vinila. Em outras modalidades, R^1 e R^2 não são ambos hidrogênio. Em algumas modalidades, o *endcap* a 5' é



[0060] Em outras modalidades, o oligonucleotídeo modificado compreende um grupo de ligação a 3' e/ou a 5'. Por exemplo, em relação aos compostos oligonucleotídicos modificados que compreendem unidades A e C que são descritas aqui, tais como as unidades A e C das Tabelas 1 e 2, respectivamente, pelo menos um $\sim O$ terminal pode ser um grupo de ligação. Vários grupos de ligação conhecidos pelos peritos na técnica podem ser utilizados para ligar o oligonucleotídeo modificado a outro grupamento (tal como um ou mais segundos oligonucleotídeos e/ou ligantes de direcionamento). Em uma modalidade, o grupo de ligação compreende um grupo de ligação que não é A e/ou que não é C ou uma unidade A ou C que interrompe a sequência alternada de unidades A e C como discutido anteriormente ou o grupo de ligação compreende uma ligação de C₂₋₆alquilenos (FIG. 1), uma ligação de óxido de C₂₋₆alquilenos, tal como uma ligação de óxido de propileno (FIG. 2) ou uma ligação de tetraetileno glicol (TEG) (FIGS. 3A-D).

[0061] Em várias modalidades, dois, três, quatro ou mais dos oligonucleotídeos modificados podem ser conectados um com os outros de

várias maneiras. Por exemplo, os oligonucleotídeos modificados podem ser conectados extremidade com extremidade através de grupos de ligação a 3' e/ou a 5' e/ou um grupo de ligação pode ser conectado a uma extremidade a 3' ou a 5' de vários oligonucleotídeos modificados, por exemplo, como ilustrado nas FIGS. 1 e 2.

[0062] Em várias modalidades, o oligonucleotídeo modificado compreende ainda um ligante de direcionamento que é ligado ao oligonucleotídeo modificado através do grupo de ligação. Por exemplo, em várias modalidades o ligante de direcionamento é ou compreende, uma N-acetilgalactosamina (GalNac) (por exemplo, GalNac triantenária), um tocoferol ou colesterol. As FIGS. 3A e 3B ilustram modalidades de oligonucleotídeos modificados que têm colesterol ligado através de um grupo de ligação TEG a 5' e um grupo de ligação TEG a 3', respectivamente. As FIGS. 3C e 3D ilustram modalidades de oligonucleotídeos modificados que têm um tocoferol (Vitamina E) ligado através de um grupo de ligação TEG a 5' e um grupo de ligação TEG a 3', respectivamente. As FIGS. 4A e 4B ilustram modalidades de oligonucleotídeos modificados que têm GalNac ligado através de um grupo de ligação. Em uma modalidade, a GalNac é uma GalNac triantenária.

[0063] Em várias modalidades, a sequência pelo menos parcialmente fosforotioada de unidades A e C alternadas pode incluir modificação(ões) em uma ou mais ligações fosforotioadas. A inclusão de tal ligação modificada não é comumente considerada como interrompendo a sequência alternada de unidades A e C porque os peritos na técnica entendem que tal sequência pode ser apenas parcialmente fosforotioada e assim pode compreender uma ou mais modificações em uma ligação fosforotioato. Em várias modalidades, a modificação na ligação fosforotioato é uma ligação modificada selecionada de fosfodiéster, fosforoditioato, metilfosfonato, difosforotioato e

difosfodiéster. Por exemplo, em uma modalidade, a ligação modificada é uma ligação fosfodiéster.

[0064] Em várias modalidades, a sequência pelo menos parcialmente fosforotioada de unidades A e C alternadas pode ter vários graus de fosforotioação. Por exemplo, em uma modalidade, a sequência pelo menos parcialmente fosforotioada de unidades A e C alternadas é pelo menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% ou 95% fosforotioada. Em uma modalidade, a sequência pelo menos parcialmente fosforotioada de unidades A e C alternadas é pelo menos 85% fosforotioada. Em uma modalidade, a sequência pelo menos parcialmente fosforotioada de unidades A e C alternadas é completamente fosforotioada.

[0065] Em várias modalidades, a sequência pelo menos parcialmente fosforotioada de unidades A e C alternadas pode incluir modificação(ões) estereoquímicas em uma ou mais ligações fosforotioadas. Em uma modalidade, os oligonucleotídeos modificados descritos aqui podem compreender pelo menos uma ligação fosforotioato definida estereoquimicamente. Em várias modalidades, a ligação fosforotioato definida estereoquimicamente tem uma configuração R. Em várias modalidades, a ligação fosforotioato definida estereoquimicamente tem uma configuração S.

[0066] Os peritos na técnica reconhecerão que os compostos oligonucleotídicos modificados que compreendem unidades A e C que são descritas aqui, tais como as unidades A e C das Tabelas 1 e 2, respectivamente, contêm ligações internas entre as unidades A e C bem como grupos terminais nas extremidades a 3' e a 5'. Assim, em relação às unidades A e C descritas aqui, tais como as unidades A e C das Tabelas 1 e 2, respectivamente, cada $\sim\text{O}$ representa um $\sim\text{O}$ interno ou um $\sim\text{O}$

terminal. Em várias modalidades, cada $\sim\text{O}$ terminal é independentemente hidroxila, um fosforotioato de O,O-dihidrogênio, um bifosfato de hidrogênio, um *endcap* ou um grupo de ligação. Em várias modalidades, cada $\sim\text{O}$ interno é uma ligação que contém fósforo com uma unidade A ou C vizinha, a ligação contendo fósforo sendo uma ligação fosforotioato ou uma ligação modificada selecionada de fosfodiéster, fosforoditioato, metilfosfonato, difosforotioato 5'-fosforamidato, 3',5'-fosfordiamidato, 5'-tiofosforamidato, 3',5'-tiofosfordiamidato ou difosfodiéster.

[0067] Como citado anteriormente, os compostos STOPST[™] descritos aqui são oligonucleotídeos antivirais. Em várias modalidades, um oligonucleotídeo modificado que é descrito aqui, que compreende uma sequência pelo menos parcialmente fosforotioada de unidades A e C alternadas, tem atividade antiviral independente da sequência contra hepatite B, que é determinada através do Ensaio de Secreção de HBsAg, que é maior que aquela de um composto de referência. Por exemplo, em uma modalidade, a atividade antiviral independente da sequência contra hepatite B é pelo menos 2 vezes maior que aquela de um composto de referência. Em outra modalidade, a atividade antiviral independente da sequência contra hepatite B está na faixa de 2 vezes maior que aquela de um composto de referência a 5 vezes maior que aquela de um composto de referência. Em outra modalidade, a atividade antiviral independente da sequência contra hepatite B é pelo menos 5 vezes maior que aquela de um composto de referência. Em outra modalidade, a atividade antiviral independente da sequência contra hepatite B está na faixa de 5 vezes maior que aquela de um composto de referência a 10 vezes maior que aquela de um composto de referência. Em outra modalidade, a atividade antiviral independente da sequência contra hepatite B é pelo menos 10 vezes maior que aquela de um composto de referência. Em outra modalidade, a atividade antiviral

[illegible]

[0068] Em várias modalidades, um oligonucleotídeo modificado que é descrito aqui, que compreende uma sequência pelo menos parcialmente fosforotioada de unidades A e C alternadas, tem atividade antiviral independente da sequência contra hepatite B, que é determinada através do Ensaio de Secreção de HBsAg, que está em uma faixa de atividade de “A” menor que 30 nanomolares (nM); em uma faixa de atividade de “B” de 30 nM a menos que 100 nM; em uma faixa de atividade de “C” de 100 nM a menos que 300 nM; ou em uma faixa de atividade de “D” maior que 300 nM. Em algumas modalidades, um oligonucleotídeo modificado que é descrito aqui, que compreende uma sequência pelo menos parcialmente fosforotioada de unidades A e C alternadas, tem atividade antiviral independente da sequência contra hepatite B, que é determinada através do Ensaio de Secreção de HBsAg, que é menor que 50 nM.

[0069] Os oligonucleotídeos modificados descritos aqui podem ser preparados na forma de vários complexos. Assim, uma modalidade fornece um complexo quelado de um oligonucleotídeo modificado que é descrito aqui. Por exemplo, em uma modalidade tal complexo quelado compreende um complexo quelado com cálcio, magnésio ou zinco do oligonucleotídeo modificado. Os oligonucleotídeos modificados descritos aqui também podem ser preparados na forma de vários complexos de íons indicadores monovalentes. Por exemplo, em uma modalidade tal complexo de íon indicador compreende um complexo de lítio, sódio ou potássio do oligonucleotídeo modificado.

[0070] Uma modalidade fornece um oligonucleotídeo modificado ou um complexo do mesmo que tem atividade antiviral independente da sequência

contra hepatite B, que compreende uma sequência pelo menos parcialmente fosforotioada de unidades A e C alternadas que são descritas aqui, em que;

[0071] a sequência pelo menos parcialmente fosforotioada de unidades A e C alternadas é pelo menos 85% fosforotioada;

[0072] a sequência pelo menos parcialmente fosforotioada de unidades A e C alternadas tem um comprimento de sequência na faixa de 36 unidades a 44 unidades;

[0073] as unidades A compreendem pelo menos 12 unidades de 2'-OMe-A (por exemplo, pelo menos 15 unidades de 2'-OMe-A) e pelo menos 1 unidade de Ribo-A (por exemplo, pelo menos 2 unidades de Ribo-A);

[0074] as unidades C compreendem pelo menos 15 unidades de LNA-5mC; e

[0075] o oligonucleotídeo modificado tem um valor de EC₅₀, que é determinado através do Ensaio de Secreção de HBsAg, que é menor que 100 nM (por exemplo, menor que 50 nM ou menor que 30 nM).

[0076] Uma modalidade fornece um oligonucleotídeo modificado ou um complexo do mesmo que tem atividade antiviral independente da sequência contra hepatite B, que compreende uma sequência pelo menos parcialmente fosforotioada de unidades A e C alternadas que são descritas aqui, em que;

[0077] a sequência pelo menos parcialmente fosforotioada de unidades A e C alternadas é pelo menos 85% fosforotioada;

[0078] a sequência pelo menos parcialmente fosforotioada de unidades A e C alternadas tem um comprimento de sequência na faixa de 36 unidades a 44 unidades;

[0079] as unidades A compreendem pelo menos 15 unidades de 2'-

OMe-A;

[0080] as unidades C compreendem pelo menos 7 unidades LNA-5mC;
e

[0081] o oligonucleotídeo modificado tem um valor de EC_{50} , que é determinado através do Ensaio de Secreção de HBsAg, que é menor que 100 nM (por exemplo, menor que 50 nM ou menor que 30 nM).

[0082] Uma modalidade fornece um oligonucleotídeo modificado ou um complexo do mesmo que tem atividade antiviral independente da sequência contra hepatite B, que compreende uma sequência pelo menos parcialmente fosforotioada de unidades A e C alternadas que são descritas aqui, em que;

[0083] a sequência pelo menos parcialmente fosforotioada de unidades A e C alternadas é pelo menos 85% fosforotioada;

[0084] a sequência pelo menos parcialmente fosforotioada de unidades A e C alternadas tem um comprimento de sequência na faixa de 36 unidades a 44 unidades;

[0085] as unidades A compreendem pelo menos 15 unidades de 2'-OMe-A;

[0086] as unidades C compreendem pelo menos 3 unidades LNA-5mC;
e

[0087] o oligonucleotídeo modificado tem um valor de EC_{50} , que é determinado através do Ensaio de Secreção de HBsAg, que é menor que 100 nM (por exemplo, menor que 50 nM ou menor que 30 nM).

[0088] Uma modalidade fornece um oligonucleotídeo modificado ou um complexo do mesmo que tem atividade antiviral independente da sequência contra hepatite B, que compreende uma sequência pelo menos parcialmente

fosforotioada de unidades A e C alternadas que são descritas aqui, em que;

[0089] a sequência pelo menos parcialmente fosforotioada de unidades A e C alternadas é pelo menos 85% fosforotioada;

[0090] a sequência pelo menos parcialmente fosforotioada de unidades A e C alternadas tem um comprimento de sequência na faixa de 36 unidades a 44 unidades;

[0091] as unidades A compreendem pelo menos 18 unidades de 2'-OMe-A;

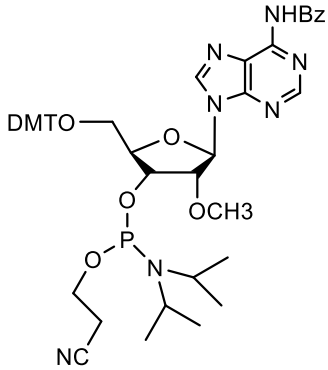
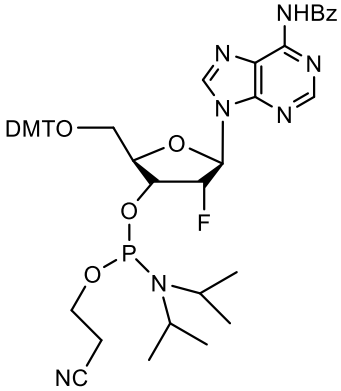
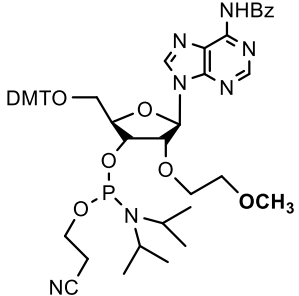
[0092] as unidades C compreendem pelo menos 15 unidades de LNA-5mC; e

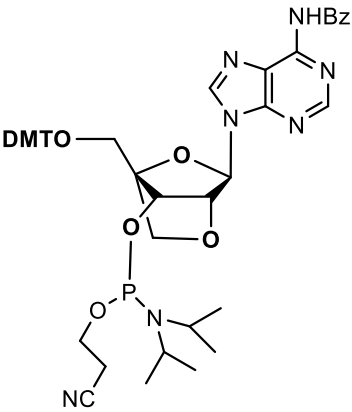
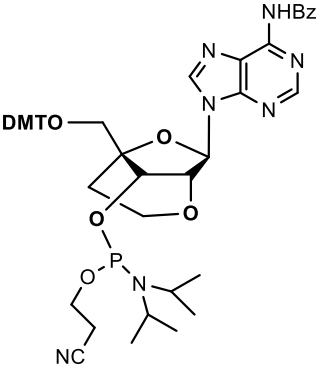
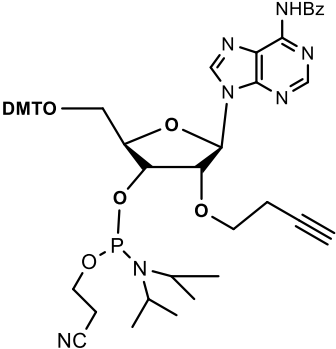
[0093] o oligonucleotídeo modificado tem um valor de EC₅₀, que é determinado através do Ensaio de Secreção de HBsAg, que é menor que 100 nM (por exemplo, menor que 50 nM ou menor que 30 nM).

Síntese

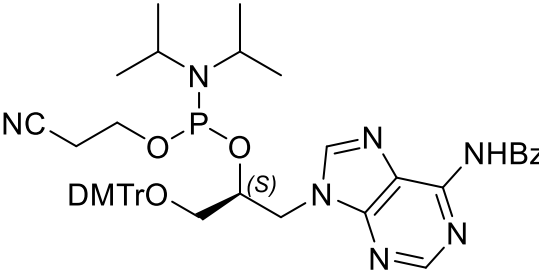
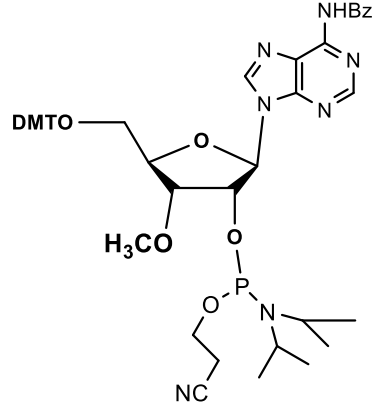
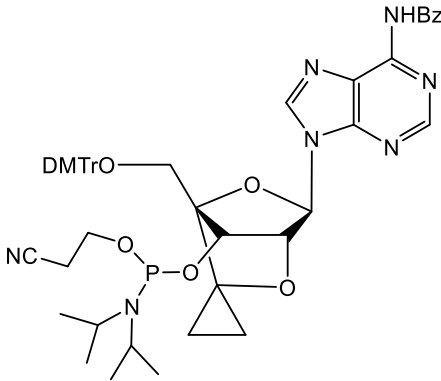
[0094] Os oligonucleotídeos modificados descritos aqui podem ser preparados de várias maneiras. Em uma modalidade, os monômeros de blocos de construção descritos nas Tabelas 4 e 5 são empregados para produção dos oligonucleotídeos modificados descritos aqui através da aplicação de química de fosforamidita padronizada. Os blocos de construção descritos nas Tabelas 4 e 5 e outros monômeros de fosforamidita de bloco de construção podem ser preparados através de métodos conhecidos ou obtidos de fornecedores comerciais (Thermo Fischer Scientific US, Hongene Biotechnology USA Inc., Chemgenes Corporation). Exemplos de produção de oligonucleotídeos modificados são apresentados nos Exemplos abaixo.

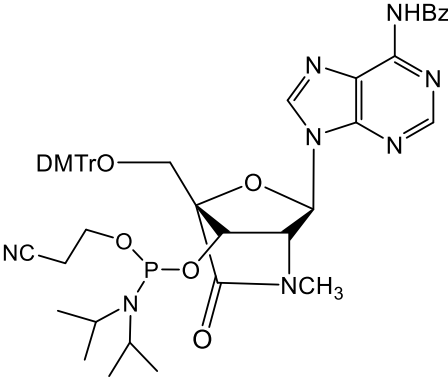
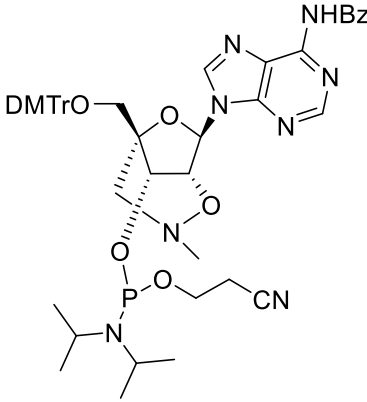
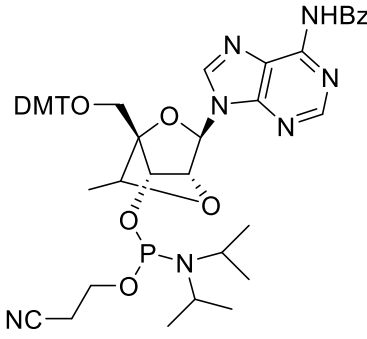
TABELA 4 – BLOCOS DE CONSTRUÇÃO PARA UNIDADES “A”

Abreviação	Estrutura
2'-OMe-A FOSFORAMIDITA	
2'-F-A FOSFORAMIDITA	
2'-O-MOE-A FOSFORAMIDITA	

Abreviação	Estrutura
LNA-A FOSFORAMIDITA	
ENA-A FOSFORAMIDITA	
2'-O-Butino-A FOSFORAMIDITA	

Abreviação	Estrutura
2'-NH₂-A FOSFORAMIDITA	
2'-F-Ara-A FOSFORAMIDITA	
2'-O-Propargil-A FOSFORAMIDITA	
UNA-A FOSFORAMIDITA	

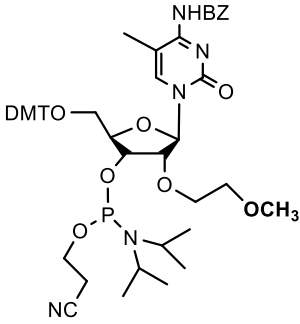
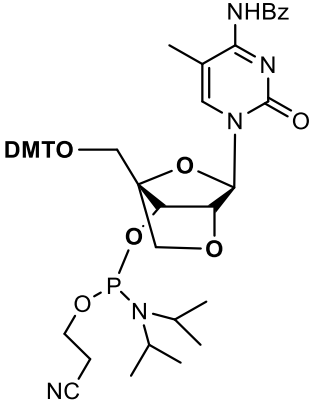
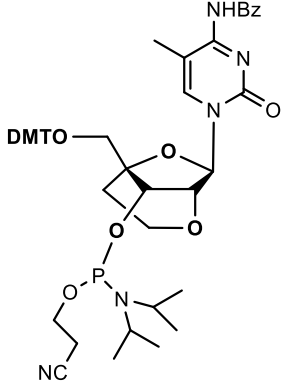
Abreviação	Estrutura
GNA-A FOSFORAMIDITA	
3'-O-Metil-A FOSFORAMIDITA	
scp-BNA-A FOSFORAMIDITA	

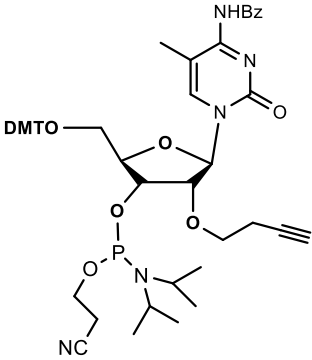
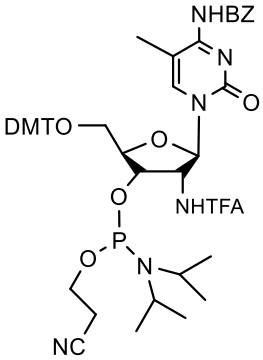
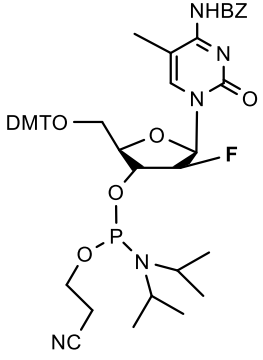
Abreviação	Estrutura
AmNA-(N-Me)-A FOSFORAMIDITA	
nmLNA-A FOSFORAMIDITA	
4etl-A FOSFORAMIDITA	

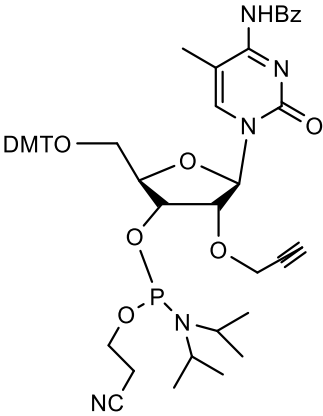
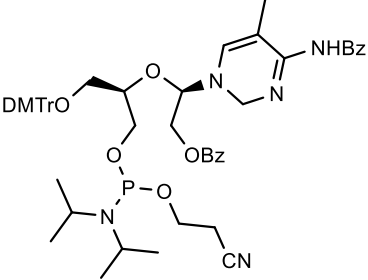
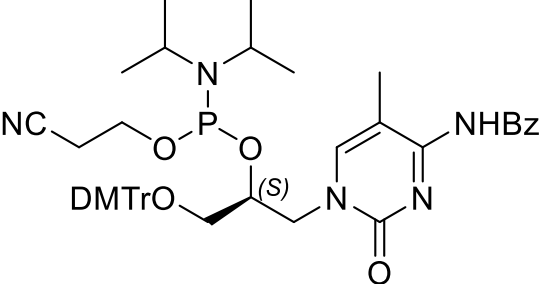
Abreviação	Estrutura
Ribo-A FOSFORAMIDITA	

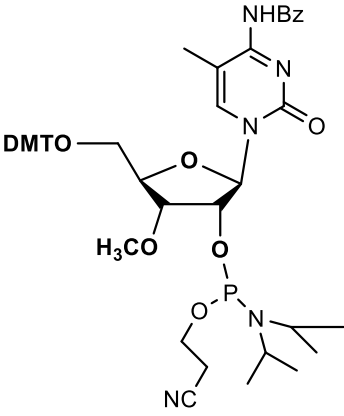
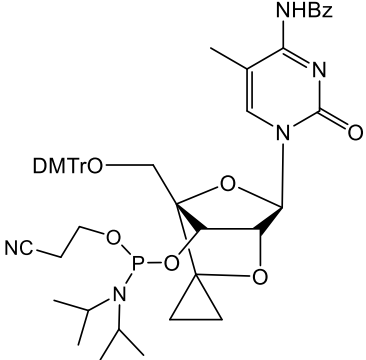
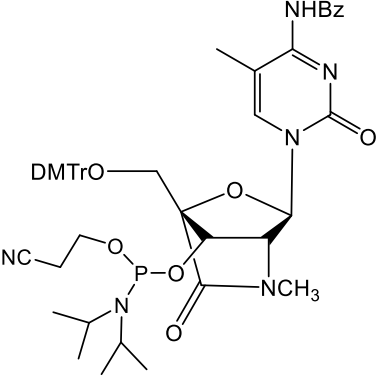
TABELA 5 – BLOCOS DE CONSTRUÇÃO PARA UNIDADES “C”

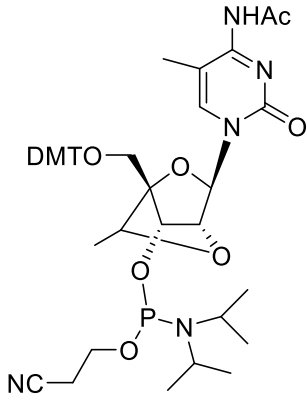
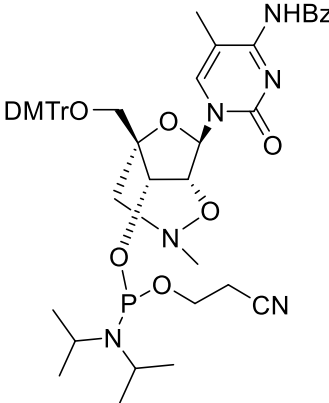
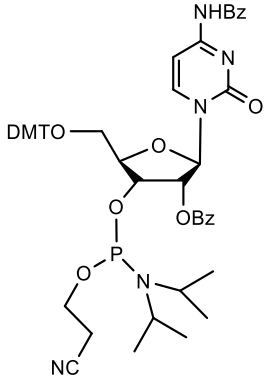
Abreviação	Estrutura
2'-OMe-(5m)C FOSFORAMIDITA	
2'-F-(5m)C FOSFORAMIDITA	

Abreviação	Estrutura
2'-O-MOE-(5m)C FOSFORAMIDITA	
LNA-(5m)C FOSFORAMIDITA	
ENA-(5m)C FOSFORAMIDITA	

Abreviação	Estrutura
2'-O-Butino-(5m)C FOSFORAMIDITA	
2'-NH₂-(5m)C FOSFORAMIDITA	
2'-F-Ara-(5m)C FOSFORAMIDITA	

Abreviação	Estrutura
2'-O-Propargil-(5m)C FOSFORAMIDITA	
UNA-(5m)C FOSFORAMIDITA	
GNA-(5m)C FOSFORAMIDITA	

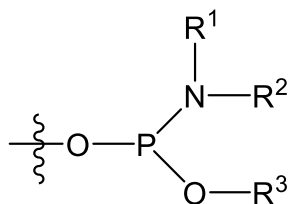
Abreviação	Estrutura
3'-O-Metil-(5m)C FOSFORAMIDITA	
scp-BNA-(5m)C FOSFORAMIDITA	
AmNA-(NMe)-(5m)C FOSFORAMIDITA	

Abreviação	Estrutura
4etl-(5m)C FOSFORAMIDITA	
nmLNA-(5m)C FOSFORAMIDITA	
Ribo-C FOSFORAMIDITA	

Abreviação	Estrutura
Ribo-(5m)C FOSFORAMIDITA	

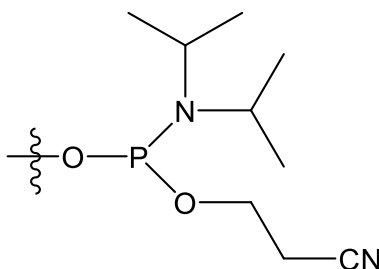
[0095] Em várias modalidades, os oligonucleotídeos modificados STOPST[™] descritos aqui também podem ser preparados utilizando dinucleotídeos que compreendem ou consistem de quaisquer dois dos monômeros de blocos de construção descritos nas Tabelas 4 e 5. Exemplos de procedimentos para produção de dinucleotídeos e os oligonucleotídeos modificados correspondentes são apresentados nos Exemplos abaixo.

[0096] Uma modalidade fornece um dinucleotídeo que compreende ou consiste de, uma unidade A e uma unidade C conectadas através de uma ligação fosforotioato definida estereoquimicamente, em que a unidade A é selecionada de qualquer um dos monômeros de blocos de construção descritos na Tabela 4 e a C unidade é selecionada de qualquer um dos monômeros de blocos de construção descritos na Tabela 5 e em que cada $\sim\text{O}$ é independentemente hidroxila, um fosforotioato de O,O-dihidrogênio, um fosfato de O,O-dihidrogênio, uma fosforamidita, um éter dimetoxitritila ou a ligação fosforotioato definida estereoquimicamente. Em uma modalidade, o $\sim\text{O}$ é uma fosforamidita da fórmula (A) a seguir:



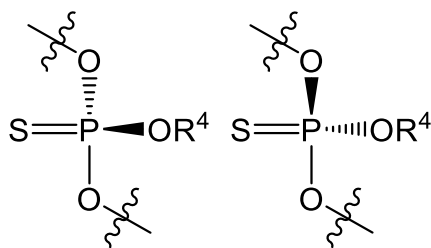
(A)

[0097] Em várias modalidades R^1 e R^2 da fórmula (A) são cada um individualmente uma C_{1-6} alquila e R^3 é um C_{1-6} alquila ou um ciano C_{1-6} alquila. Por exemplo, em uma modalidade a fosforamidita da fórmula (A) é uma fosforamidita da fórmula (A1) a seguir:



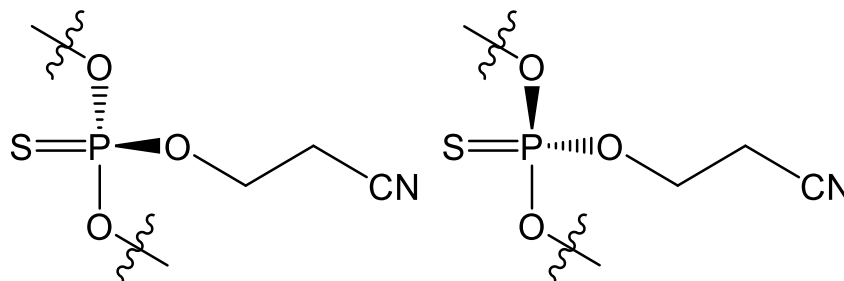
(A1)

[0098] Em outra modalidade, o $\sim O$ é uma ligação fosforotioato definida estereoquimicamente que é um fosforotioato. Por exemplo, em uma modalidade, a ligação fosforotioato definida estereoquimicamente é um fosforotioato da Fórmula (B1) ou (B2) a seguir:



(B1) (B2)

[0099] Em várias modalidades R^4 das fórmulas (B1) e (B2) é um C_{1-6} alquila ou um ciano C_{1-6} alquila. Por exemplo, em uma modalidade, os fosforotioatos das fórmulas (B1) e (B2) são fosforotioatos das Fórmulas (B3) ou (B4), respectivamente, a seguir:



(B3) (B4)

[0100] Várias modalidades fornecem métodos de produção de um oligonucleotídeo modificado que é descrito aqui, que compreendem o acoplamento de um ou mais dinucleotídeos que são descritos aqui. Exemplos de métodos de realização deste acoplamento são ilustrados nos Exemplos abaixo.

Composições Farmacêuticas

[0101] Algumas modalidades descritas aqui se referem a uma composição farmacêutica, que pode incluir uma quantidade eficiente de um composto descrito aqui (por exemplo, um composto oligonucleotídico STOPST[™] modificado ou complexo do mesmo como descrito aqui) e um carreador, um excipiente farmacêuticamente aceitável ou combinação dos mesmos. Uma composição farmacêutica descrita aqui é adequada para aplicações em seres humanos e/ou animais.

[0102] Como utilizado aqui, um “carreador” refere-se a um composto que facilita a incorporação de um composto nas células ou nos tecidos. Por exemplo, sem limitação, o dimetil sulfoxídeo (DMSO) é um carreador

comumente utilizado que facilita a captação de muitos compostos orgânicos pelas células ou tecidos de um indivíduo.

[0103] Como utilizado aqui, um “diluyente” refere-se a um ingrediente em uma composição farmacêutica que não tem atividade farmacológica, mas pode ser farmacêuticamente necessário ou desejável. Por exemplo, um diluyente pode ser utilizado para aumentar o volume de um fármaco potente cuja massa é muito pequena para manufatura e/ou administração. Também pode ser um líquido para a dissolução de um fármaco que será administrado por injeção, ingestão ou inalação. Uma forma comum de diluyente na técnica é uma solução aquosa tamponada tal como, sem limitação, solução salina tamponada com fosfato que imita a composição do sangue humano.

[0104] Como utilizado aqui, um “excipiente” refere-se a uma substância inerte que é adicionada a uma composição farmacêutica para fornecer, sem limitação, volume, consistência, estabilidade, capacidade de ligação, lubrificação, capacidade de desintegração etc., à composição. Um “diluyente” é um tipo de excipiente.

[0105] A formulação apropriada é dependente da rota de administração escolhida. As técnicas de formulação e administração dos compostos descritos aqui são conhecidas pelos peritos na técnica. Há inúmeras técnicas de administração de um composto na técnica que incluem, mas sem limitação ao fornecimento oral, retal, tópico, por aerossol, injeção e parenteral, incluindo injeções intramusculares, subcutâneas, intravenosas, intramedulares, injeções intratecais, intraventriculares diretas, intraperitoneais, intranasais e intraoculares. As composições farmacêuticas serão geralmente produzidas sob medida para a rota de administração pretendida específica.

[0106] Pode-se também administrar o composto em uma maneira local ao invés de sistêmica, por exemplo, através da injeção do composto diretamente dentro da área infectada, opcionalmente em uma formulação de depósito ou de liberação prolongada. Além disso, pode-se administrar o composto em um sistema de fornecimento de fármaco direcionado, por exemplo, em um lipossomo revestido com um anticorpo específico para o tecido. Os lipossomos podem ser direcionados e captados seletivamente pelo órgão.

[0107] As composições farmacêuticas divulgadas aqui podem ser manufaturadas de uma maneira que é por si só conhecida, por exemplo, através de processos convencionais de mistura, dissolução, granulação, produção de drágeas, levigação, emulsificação, encapsulamento, captura ou produção de comprimidos. Como descrito aqui, os compostos utilizados em uma composição farmacêutica podem ser fornecidos na forma de sais com íons indicadores farmaceuticamente compatíveis.

Métodos de Uso

[0108] Algumas modalidades descritas aqui se referem a um método de tratamento de uma infecção causada por HBV e/ou HDV que pode incluir a administração a um indivíduo identificado como sofrendo da infecção causada por HBV e/ou HDV de uma quantidade eficiente de um oligonucleotídeo modificado ou um complexo do mesmo como descrito aqui ou uma composição farmacêutica que inclui uma quantidade eficiente de um oligonucleotídeo modificado ou um complexo do mesmo como descrito aqui. Outras modalidades descritas aqui se referem ao uso de um oligonucleotídeo modificado ou um complexo do mesmo como descrito aqui na manufatura de um medicamento para tratamento de uma infecção causada por HBV e/ou HDV. Ainda outras modalidades descritas aqui se referem ao uso de um oligonucleotídeo modificado ou um complexo do

mesmo como descrito aqui ou uma composição farmacêutica que inclui um oligonucleotídeo modificado que é descrito aqui para tratamento de uma infecção causada por HBV e/ou HDV.

[0109] Várias rotas podem ser utilizadas para administrar um oligonucleotídeo modificado ou um complexo do mesmo a um indivíduo que necessita disso como indicado em outro local aqui. Em uma modalidade, o oligonucleotídeo modificado ou o complexo do mesmo é administrado ao indivíduo através de uma rota parenteral. Por exemplo, em uma modalidade, o oligonucleotídeo modificado ou o complexo do mesmo é administrado ao indivíduo de forma intravenosa. Em outra modalidade, o oligonucleotídeo modificado ou o complexo do mesmo é administrado ao indivíduo de forma subcutânea. Surpreendentemente, foi observado que as modalidades de um oligonucleotídeo modificado ou um complexo do mesmo como descrito aqui podem ser administradas de forma subcutânea a um primata em uma quantidade que seja tanto segura quanto eficiente para tratamento. Anteriormente, a administração subcutânea de um oligonucleotídeo modificado ou um complexo do mesmo (tal como REP 2139, REP 2055 ou aqueles descritos nas Patentes U.S. Nos. 7.358.068; 8.008.269; 8.008.270 e 8.067.385) a um primata foi considerada como sendo improvavelmente segura e eficiente porque acredita-se que doses relativamente altas sejam necessárias para atingir eficácia e o aumento concomitante no risco potencial de cuidados com a segurança tais como reações indesejáveis no local da injeção. Assim, por exemplo, acredita-se que os estudos clínicos anteriores envolvendo a administração de REP 2139 a seres humanos tenham utilizado apenas rotas intravenosas. Nos níveis de dosagem que se acreditavam ser necessárias para eficácia, acredita-se que cuidados com a segurança tais como reações indesejáveis no local da injeção tenham impedido a administração subcutânea.

[0110] De forma inesperada, como ilustrado na FIG. 12 e no Exemplo B5 abaixo, foi descoberto que a exposição do fígado após a administração subcutânea a primatas não humanos é muito maior que a esperada com base nos níveis de exposição no fígado resultantes de dosagens intravenosas de outra maneira comparáveis. Esta descoberta significa que modalidades de oligonucleotídeos modificados ou complexos dos mesmos que são descritos aqui e particularmente modalidades de compostos ou complexos STOPSTTM altamente potentes que são descritos aqui, podem administradas de forma segura e efetiva a primatas através da administração subcutânea em dosagens menores que as consideradas anteriormente como provavelmente eficientes. Estas doses menores reduzem o perfil de risco (por exemplo, reduzem o risco de reações nos locais de injeção) e fornecem assim um perfil de segurança clinicamente aceitável para uso em humanos.

[0111] Algumas modalidades divulgadas aqui se referem a um método de tratamento de uma infecção causada por HBV e/ou HDV que pode incluir o contato de uma célula infectada com o HBV e/ou o HDV com uma quantidade eficiente de um oligonucleotídeo modificado ou um complexo do mesmo como descrito aqui ou uma composição farmacêutica que inclui uma quantidade eficiente de um oligonucleotídeo modificado ou um complexo do mesmo como descrito aqui. Em uma modalidade, tal método de tratamento de uma infecção causada por HBV e/ou HDV compreende a administração subcutânea segura e eficiente do oligonucleotídeo modificado ou do complexo do mesmo a um ser humano a uma dosagem menor que a esperada de outra maneira com base nos níveis no fígado observados após a administração intravenosa comparável de outra maneira. Por exemplo, em uma modalidade, o oligonucleotídeo modificado ou o complexo do mesmo é REP-2139 ou um complexo do mesmo. Em outra modalidade, o oligonucleotídeo modificado ou o complexo do mesmo compreende um composto STOPSTTM ou um complexo do mesmo altamente potente como

descrito aqui. Por exemplo, em uma modalidade, o composto STOPS™ ou o complexo do mesmo é um oligonucleotídeo modificado ou um complexo do mesmo como descrito aqui, que compreende uma sequência pelo menos parcialmente fosforotioada de unidades A e C alternadas, que tem atividade antiviral independente da sequência contra hepatite B, que é determinada através do Ensaio de Secreção de HBsAg, que está em uma faixa de atividade de “A” menor que 30 nM.

[0112] Outras modalidades descritas aqui se referem ao uso de um oligonucleotídeo modificado ou um complexo do mesmo como descrito aqui na manufatura de um medicamento para tratamento de uma infecção causada por HBV e/ou HDV. Ainda outras modalidades descritas aqui se referem ao uso de um oligonucleotídeo modificado ou um complexo do mesmo como descrito aqui ou uma composição farmacêutica que inclui uma quantidade eficiente de um oligonucleotídeo modificado ou um complexo do mesmo como descrito aqui para tratamento de uma infecção causada por HBV e/ou HDV. Em uma modalidade, estes usos compreendem a administração subcutânea segura e eficiente do oligonucleotídeo modificado ou do complexo do mesmo a um ser humano a uma dosagem menor que a esperada de outra maneira com base nos níveis no fígado observados após a administração intravenosa comparável de outra maneira. Por exemplo, em uma modalidade, o oligonucleotídeo modificado ou o complexo do mesmo é REP-2139 ou um complexo do mesmo. Em outra modalidade, o oligonucleotídeo modificado ou o complexo do mesmo compreende um composto STOPS™ ou um complexo do mesmo altamente potente como descrito aqui. Por exemplo, em uma modalidade, o composto STOPS™ ou o complexo do mesmo é um oligonucleotídeo modificado ou um complexo do mesmo como descrito aqui, que compreende uma sequência pelo menos parcialmente fosforotioada de unidades A e C alternadas, que tem atividade antiviral independente da sequência contra hepatite B, que é determinada

através do Ensaio de Secreção de HBsAg, que está em uma faixa de atividade de “A” menor que 30 nM.

[0113] Algumas modalidades divulgadas aqui se referem a um método de inibição da replicação de HBV e/ou HDV que pode incluir o contato de uma célula infectada com o HBV e/ou o HDV com uma quantidade eficiente de um oligonucleotídeo modificado ou um complexo do mesmo como descrito aqui ou uma composição farmacêutica que inclui uma quantidade eficiente de um oligonucleotídeo modificado ou um complexo do mesmo como descrito aqui. Em uma modalidade, este método de inibição da replicação de HBV e/ou HDV compreende a administração subcutânea segura e eficiente do oligonucleotídeo modificado ou do complexo do mesmo a um ser humano a uma dosagem menor que a esperada de outra maneira com base nos níveis no fígado observados após a administração intravenosa comparável de outra maneira. Por exemplo, em uma modalidade, o oligonucleotídeo modificado ou o complexo do mesmo é REP-2139 ou um complexo do mesmo. Em outra modalidade, o oligonucleotídeo modificado ou o complexo do mesmo compreende um composto STOPST[™] ou um complexo do mesmo altamente potente como descrito aqui. Por exemplo, em uma modalidade, o composto STOPST[™] ou o complexo do mesmo é um oligonucleotídeo modificado ou um complexo do mesmo como descrito aqui, que compreende uma sequência pelo menos parcialmente fosforotioada de unidades A e C alternadas, que tem atividade antiviral independente da sequência contra hepatite B, que é determinada através do Ensaio de Secreção de HBsAg, que está em uma faixa de atividade de “A” menor que 30 nM.

[0114] Outras modalidades descritas aqui se referem ao uso de um oligonucleotídeo modificado ou um complexo do mesmo como descrito aqui na manufatura de um medicamento para inibição da replicação de HBV

e/ou HDV. Ainda outras modalidades descritas aqui se referem ao uso de um oligonucleotídeo modificado ou um complexo do mesmo como descrito aqui ou uma composição farmacêutica que inclui uma quantidade eficiente de um oligonucleotídeo modificado ou um complexo do mesmo como descrito aqui, para inibição da replicação de HBV e/ou HDV. Em uma modalidade, estes usos para inibição da replicação de HBV e/ou HDV compreendem a administração subcutânea segura e eficiente do oligonucleotídeo modificado ou do complexo do mesmo a um ser humano a uma dosagem menor que a esperada de outra maneira com base nos níveis no fígado observados após a administração intravenosa comparável de outra maneira. Por exemplo, em uma modalidade, o oligonucleotídeo modificado ou o complexo do mesmo é REP-2139 ou um complexo do mesmo. Em outra modalidade, o oligonucleotídeo modificado ou o complexo do mesmo compreende um composto STOPSTTM ou um complexo do mesmo altamente potente como descrito aqui. Por exemplo, em uma modalidade, o composto STOPSTTM ou o complexo do mesmo é um oligonucleotídeo modificado ou um complexo do mesmo como descrito aqui, que compreende uma sequência pelo menos parcialmente fosforotioada de unidades A e C alternadas, que tem atividade antiviral independente da sequência contra hepatite B, que é determinada através do Ensaio de Secreção de HBsAg, que está em uma faixa de atividade de “A” menor que 30 nM.

[0115] Em algumas modalidades, a infecção por HBV pode ser uma infecção por HBV aguda. Em algumas modalidades, a infecção por HBV pode ser uma infecção por HBV crônica.

[0116] Algumas modalidades divulgadas aqui se referem a um método de tratamento de cirrose hepática que é desenvolvida devido a uma infecção causada por HBV e/ou HDV que pode incluir a administração a um indivíduo que sofre de cirrose hepática e/ou o contato de uma célula

infectada com o HBV e/ou o HDV em um indivíduo que sofre de cirrose hepática com uma quantidade eficiente de um oligonucleotídeo modificado ou um complexo do mesmo como descrito aqui ou uma composição farmacêutica que inclui uma quantidade eficiente de um oligonucleotídeo modificado ou um complexo do mesmo como descrito aqui. Em uma modalidade, tal método de tratamento de cirrose hepática que é desenvolvida devido a uma infecção causada por HBV e/ou HDV compreende a administração subcutânea segura e eficiente do oligonucleotídeo modificado ou do complexo do mesmo a um ser humano a uma dosagem menor que a esperada de outra maneira com base nos níveis no fígado observados após a administração intravenosa comparável de outra maneira. Por exemplo, em uma modalidade, o oligonucleotídeo modificado ou o complexo do mesmo é REP-2139 ou um complexo do mesmo. Em outra modalidade, o oligonucleotídeo modificado ou o complexo do mesmo compreende um composto STOPSTM ou um complexo do mesmo altamente potente como descrito aqui. Por exemplo, em uma modalidade, o composto STOPSTM ou o complexo do mesmo é um oligonucleotídeo modificado ou um complexo do mesmo como descrito aqui, que compreende uma sequência pelo menos parcialmente fosforotioada de unidades A e C alternadas, que tem atividade antiviral independente da sequência contra hepatite B, que é determinada através do Ensaio de Secreção de HBsAg, que está em uma faixa de atividade de “A” menor que 30 nM.

[0117] Outras modalidades descritas aqui se referem ao uso de um oligonucleotídeo modificado ou um complexo do mesmo como descrito aqui na manufatura de um medicamento para tratamento de cirrose hepática que é desenvolvida devido a uma infecção causada por HBV e/ou HDV, com uma quantidade eficiente do(s) oligonucleotídeo(s) modificado(s). Ainda outras modalidades descritas aqui se referem ao uso de um oligonucleotídeo modificado ou um complexo do mesmo como descrito aqui ou uma

composição farmacêutica que inclui uma quantidade eficiente de um oligonucleotídeo modificado ou um complexo do mesmo como descrito aqui para tratamento de cirrose hepática que é desenvolvida devido a uma infecção causada por HBV e/ou HDV. Em uma modalidade, estes usos para tratamento de cirrose hepática compreendem a administração subcutânea segura e eficiente do oligonucleotídeo modificado ou do complexo do mesmo a um ser humano a uma dosagem menor que a esperada de outra maneira com base nos níveis no fígado observados após a administração intravenosa comparável de outra maneira. Por exemplo, em uma modalidade, o oligonucleotídeo modificado ou o complexo do mesmo é REP-2139 ou um complexo do mesmo. Em outra modalidade, o oligonucleotídeo modificado ou o complexo do mesmo compreende um composto STOPSTTM ou um complexo do mesmo altamente potente como descrito aqui. Por exemplo, em uma modalidade, o composto STOPSTTM ou o complexo do mesmo é um oligonucleotídeo modificado ou um complexo do mesmo como descrito aqui, que compreende uma sequência pelo menos parcialmente fosforotioada de unidades A e C alternadas, que tem atividade antiviral independente da sequência contra hepatite B, que é determinada através do Ensaio de Secreção de HBsAg, que está em uma faixa de atividade de “A” menor que 30 nM.

[0118] Algumas modalidades divulgadas aqui se referem a um método de tratamento de câncer de fígado (tal como carcinoma hepatocelular) que é desenvolvido devido a uma infecção causada por HBV e/ou HDV que pode incluir a administração a um indivíduo que sofre do câncer de fígado e/ou o contato de uma célula infectada com o HBV e/ou o HDV em um indivíduo que sofre do câncer de fígado com uma quantidade eficiente de um oligonucleotídeo modificado ou um complexo do mesmo como descrito aqui ou uma composição farmacêutica que inclui uma quantidade eficiente de um oligonucleotídeo modificado ou um complexo do mesmo como descrito

aqui. Em uma modalidade, tal método de tratamento de câncer de fígado (tal como carcinoma hepatocelular) que é desenvolvido devido a uma infecção causada por HBV e/ou HDV compreende a administração subcutânea segura e eficiente do oligonucleotídeo modificado ou do complexo do mesmo a um ser humano a uma dosagem menor que a esperada de outra maneira com base nos níveis no fígado observados após a administração intravenosa comparável de outra maneira. Por exemplo, em uma modalidade, o oligonucleotídeo modificado ou o complexo do mesmo é REP-2139 ou um complexo do mesmo. Em outra modalidade, o oligonucleotídeo modificado ou o complexo do mesmo compreende um composto STOPS™ ou um complexo do mesmo altamente potente como descrito aqui. Por exemplo, em uma modalidade, o composto STOPS™ ou o complexo do mesmo é um oligonucleotídeo modificado ou um complexo do mesmo como descrito aqui, que compreende uma sequência pelo menos parcialmente fosforotioada de unidades A e C alternadas, que tem atividade antiviral independente da sequência contra hepatite B, que é determinada através do Ensaio de Secreção de HBsAg, que está em uma faixa de atividade de “A” menor que 30 nM.

[0119] Outras modalidades descritas aqui se referem ao uso de um oligonucleotídeo modificado ou um complexo do mesmo como descrito aqui na manufatura de um medicamento para tratamento de câncer de fígado (tal como carcinoma hepatocelular) que é desenvolvido devido a uma infecção causada por HBV e/ou HDV. Ainda outras modalidades descritas aqui se referem ao uso de um oligonucleotídeo modificado ou um complexo do mesmo como descrito aqui ou uma composição farmacêutica que inclui uma quantidade eficiente de um oligonucleotídeo modificado ou um complexo do mesmo como descrito aqui para tratamento de câncer de fígado (tal como carcinoma hepatocelular) que é desenvolvido devido a uma infecção causada por HBV e/ou HDV. Em uma modalidade, estes usos para

tratamento de câncer de fígado (tal como carcinoma hepatocelular) compreendem a administração subcutânea segura e eficiente do oligonucleotídeo modificado ou do complexo do mesmo a um ser humano a uma dosagem menor que a esperada de outra maneira com base nos níveis no fígado observados após a administração intravenosa comparável de outra maneira. Por exemplo, em uma modalidade, o oligonucleotídeo modificado ou o complexo do mesmo é REP-2139 ou um complexo do mesmo. Em outra modalidade, o oligonucleotídeo modificado ou o complexo do mesmo compreende um composto STOPS™ ou um complexo do mesmo altamente potente como descrito aqui. Por exemplo, em uma modalidade, o composto STOPS™ ou o complexo do mesmo é um oligonucleotídeo modificado ou um complexo do mesmo como descrito aqui, que compreende uma sequência pelo menos parcialmente fosforotioada de unidades A e C alternadas, que tem atividade antiviral independente da sequência contra hepatite B, que é determinada através do Ensaio de Secreção de HBsAg, que está em uma faixa de atividade de “A” menor que 30 nM.

[0120] Algumas modalidades divulgadas aqui se referem a um método de tratamento de falência hepática que é desenvolvida devido a uma infecção causada por HBV e/ou HDV que pode incluir a administração a um indivíduo que sofre de falência hepática e/ou o contato de uma célula infectada com o HBV e/ou o HDV em um indivíduo que sofre de falência hepática com uma quantidade eficiente de um oligonucleotídeo modificado ou um complexo do mesmo como descrito aqui ou uma composição farmacêutica que inclui uma quantidade eficiente de um oligonucleotídeo modificado ou um complexo do mesmo como descrito aqui. Em uma modalidade, tal método de tratamento de falência hepática que é desenvolvida devido a uma infecção causada por HBV e/ou HDV compreende a administração subcutânea segura e eficiente do oligonucleotídeo modificado ou do complexo do mesmo a um ser humano a

uma dosagem menor que a esperada de outra maneira com base nos níveis no fígado observados após a administração intravenosa comparável de outra maneira. Por exemplo, em uma modalidade, o oligonucleotídeo modificado ou o complexo do mesmo é REP-2139 ou um complexo do mesmo. Em outra modalidade, o oligonucleotídeo modificado ou o complexo do mesmo compreende um composto STOPSTTM ou um complexo do mesmo altamente potente como descrito aqui. Por exemplo, em uma modalidade, o composto STOPSTTM ou o complexo do mesmo é um oligonucleotídeo modificado ou um complexo do mesmo como descrito aqui, que compreende uma sequência pelo menos parcialmente fosforotioada de unidades A e C alternadas, que tem atividade antiviral independente da sequência contra hepatite B, que é determinada através do Ensaio de Secreção de HBsAg, que está em uma faixa de atividade de “A” menor que 30 nM.

[0121] Outras modalidades descritas aqui se referem ao uso de um oligonucleotídeo modificado ou um complexo do mesmo como descrito aqui na manufatura de um medicamento para tratamento de falência hepática que é desenvolvida devido a uma infecção causada por HBV e/ou HDV. Ainda outras modalidades descritas aqui se referem ao uso de um oligonucleotídeo modificado ou um complexo do mesmo como descrito aqui ou uma composição farmacêutica que inclui uma quantidade eficiente de um oligonucleotídeo modificado ou um complexo do mesmo como descrito aqui para tratamento de falência hepática que é desenvolvida devido a uma infecção causada por HBV e/ou HDV. Em uma modalidade, estes usos para tratamento de falência hepática compreendem a administração subcutânea segura e eficiente do oligonucleotídeo modificado ou do complexo do mesmo a um ser humano a uma dosagem menor que a esperada de outra maneira com base nos níveis no fígado observados após a administração intravenosa comparável de outra maneira. Por exemplo, em uma modalidade, o oligonucleotídeo modificado ou o complexo do mesmo é REP-2139 ou um

complexo do mesmo. Em outra modalidade, o oligonucleotídeo modificado ou o complexo do mesmo compreende um composto STOPSTTM ou um complexo do mesmo altamente potente como descrito aqui. Por exemplo, em uma modalidade, o composto STOPSTTM ou o complexo do mesmo é um oligonucleotídeo modificado ou um complexo do mesmo como descrito aqui, que compreende uma sequência pelo menos parcialmente fosforotioada de unidades A e C alternadas, que tem atividade antiviral independente da sequência contra hepatite B, que é determinada através do Ensaio de Secreção de HBsAg, que está em uma faixa de atividade de “A” menor que 30 nM.

[0122] Vários indicadores para determinação da eficácia de um método de tratamento de uma infecção causada por HBV e/ou HDV também são conhecidos pelos peritos na técnica. Exemplos de indicadores adequados incluem, mas sem limitação a uma redução na carga viral indicada pela redução no DNA do HBV (ou carga), antígeno de superfície do HBV (HBsAg) e e-antígeno do HBV (HBeAg), uma redução na carga viral no plasma, uma redução na replicação viral, uma redução no tempo até a soroconversão (vírus indetectável no soro do paciente), um aumento na taxa de resposta viral prolongada à terapia, uma melhora na função hepática e/ou uma redução de morbidez ou mortalidade em resultados clínicos.

[0123] Em algumas modalidades, uma quantidade eficiente de um oligonucleotídeo modificado ou um complexo do mesmo como descrito aqui é uma quantidade que é eficiente para atingir uma resposta virológica prolongada, por exemplo, uma resposta viral prolongada 12 meses após a conclusão do tratamento.

[0124] Os indivíduos que são clinicamente diagnosticados com uma infecção causada por HBV e/ou HDV incluem indivíduos “naïve” (por exemplo, indivíduos que não foram anteriormente tratados para HBV e/ou

HDV) e indivíduos cujo tratamento prévio para HBV e/ou HDV falhou (indivíduos “cujo tratamento falhou”). Os indivíduos cujo tratamento falhou incluem “incapazes de resposta” (indivíduos que não atingiram uma redução suficiente nos níveis de ALT, por exemplo, indivíduo que falhou em atingir uma redução maior que 1 log₁₀ partindo da linha de base dentro de 6 meses desde o início de uma terapia anti-HBV e/ou anti-HDV) e “reincidentes” (indivíduos que foram tratados anteriormente para HBV e/ou HDV cujos níveis de ALT aumentaram, por exemplo, ALT > o dobro do limite normal superior e DNA de HBV detectável no soro através de ensaios de hibridização). Exemplos adicionais de indivíduos incluem indivíduos com uma infecção causada por HBV e/ou HDV que eram assintomáticos.

[0125] Em algumas modalidades, um oligonucleotídeo modificado ou um complexo do mesmo como descrito aqui pode ser fornecido a um indivíduo que sofre de HBV e/ou HDV cujo tratamento falhou. Em algumas modalidades, um oligonucleotídeo modificado ou um complexo do mesmo como descrito aqui pode ser fornecido a um indivíduo que sofre de HBV e/ou HDV incapaz de resposta. Em algumas modalidades, um oligonucleotídeo modificado ou um complexo do mesmo como descrito aqui pode ser fornecido a um indivíduo que sofre de HBV e/ou HDV reincidente. Em algumas modalidades, o indivíduo pode ter hepatite B crônica positiva para HBeAg. Em algumas modalidades, o indivíduo pode ter hepatite B crônica negativa para HBeAg. Em algumas modalidades, o indivíduo pode ter cirrose hepática. Em algumas modalidades, o indivíduo pode ser assintomático, por exemplo, o indivíduo pode ser afetado com HBV e/ou HDV, mas não exibe quaisquer sintomas da infecção viral. Em algumas modalidades, o indivíduo pode ser imunocomprometido. Em algumas modalidades, o indivíduo pode estar passando por quimioterapia.

[0126] Os exemplos de agentes que foram utilizados para tratar HBV

e/ou HDV incluem interferons (tais como IFN- α e interferons peguillados que incluem PEG-IFN- α -2a) e nucleosídeos/nucleotídeos (tal como lamivudina, telbivudina, adefovir dipivoxil, clevidina, entecavir, tenofovir alafenamida e tenofovir disoproxil). Entretanto, alguns dos inconvenientes associados com o tratamento com interferons são os efeitos colaterais adversos, a necessidade de administração subcutânea e o custo alto. Um inconveniente com o tratamento com nucleosídeo/nucleotídeo pode ser o desenvolvimento de resistência.

[0127] Resistência pode ser uma causa para a falha do tratamento. O termo “resistência” como utilizado aqui refere-se a uma cepa viral que exibe uma resposta retardada, reduzida e/ou nula a um agente antiviral. Em algumas modalidades, um oligonucleotídeo modificado ou um complexo do mesmo como descrito aqui pode ser fornecido a um indivíduo infectado com uma cepa de HBV e/ou HDV que é resistente a um ou mais agentes anti-HBV e/ou anti-HDV. Exemplos de agentes antivirais em que a resistência pode se desenvolver incluem lamivudina, telbivudina, adefovir dipivoxil, clevidina, entecavir, tenofovir alafenamida e tenofovir disoproxil. Em algumas modalidades, o desenvolvimento de cepas de HBV e/ou HDV resistentes é retardado quando um indivíduo é tratado com um oligonucleotídeo modificado que é descrito aqui comparado com o desenvolvimento de cepas de HBV e/ou HDV resistentes a outros agentes antivirais para HBV e/ou HDV, tais como os descritos.

Terapias de Combinação

[0128] Em algumas modalidades, um oligonucleotídeo modificado ou um complexo do mesmo como descrito aqui pode ser utilizado em combinação com um ou mais agentes adicionais para tratamento e/ou inibição da replicação de HBV e/ou HDV. Os agentes adicionais incluem, mas sem limitação a um interferon, análogos de nucleosídeos/nucleotídeos,

um modulador da montagem do capsídeo, um oligonucleotídeo específico para a sequência (tal como oligonucleotídeo antissenso e/ou siRNA), um inibidor de entrada e/ou um imunomodulador de molécula pequena. Por exemplo, em uma modalidade, um oligonucleotídeo modificado ou um complexo do mesmo como descrito aqui pode ser utilizado como um primeiro tratamento em combinação com um ou mais segundos tratamentos para HBV, em que o segundo tratamento compreende um segundo oligonucleotídeo que tem atividade antiviral independente da sequência contra hepatite B, um oligonucleotídeo de siRNA (ou nucleotídeos), um oligonucleotídeo antissenso, um nucleosídeo, um interferon, um imunomodulador, um modulador da montagem do capsídeo ou uma combinação dos mesmos. Exemplos de agentes adicionais incluem interferon alfa 2b recombinante, IFN- α , PEG-IFN- α -2a, lamivudina, telbivudina, adefovir dipivoxil, clevudina, entecavir, tenofovir alafenamida, tenofovir disoproxil, JNJ-3989 (ARO-HBV), RG6004, GSK3228836, AB-729, VIR-2218, DCR-HBVS, JNJ-6379, GLS4, ABI-HO731, JNJ-440, NZ-4, RG7907, AB-423, AB-506 e ABI-H2158. Em uma modalidade, o agente adicional é um modulador da montagem do capsídeo (CAM). Em uma modalidade, o agente adicional é um oligonucleotídeo antissenso (ASO).

[0129] Em algumas modalidades, um oligonucleotídeo modificado ou um complexo do mesmo como descrito aqui pode ser administrado com um ou mais agentes adicionais juntos em uma única composição farmacêutica. Em algumas modalidades, um oligonucleotídeo modificado ou um complexo do mesmo como descrito aqui pode ser administrado com um ou mais agentes adicionais na forma de duas ou mais composições farmacêuticas separadas. Ainda, a ordem de administração de um oligonucleotídeo modificado ou um complexo do mesmo como descrito aqui com um ou mais agentes adicionais pode variar.

EXEMPLOS

[0130] Modalidades adicionais são divulgadas em maiores detalhes nos exemplos a seguir, que não são de forma alguma pretendidos como limitantes do âmbito das Reivindicações.

EXEMPLOS 1-116

[0131] Uma série de oligonucleotídeos modificados que contêm sequências fosforotioadas de unidades A e C alternadas foi sintetizada em um sintetizador ABI 394 utilizando química de fosforamidita padrão. O suporte sólido era vidro com poros controlados (CPG, 1000A, Glen Research, Sterling VA) e os monômeros de blocos de construção são descritos nas Tabelas 4 e 5. O reagente (dimetilamino-metilideno) amino)-3H-1,2,4-ditiazolina-3-tiona (DDTT) foi utilizado como o agente de transferência de enxofre para a síntese de fosforotioatos de oligorribonucleotídeos (ligações PS). Um acoplamento prolongado de solução a 0,1 M de fosforamidita em CH₃CN na presença do ativador 5-(etiltio)-1H-tetrazol a um oligonucleotídeo ligado ao sólido seguido por capeamento, oxidação e desproteção padronizados forneceu oligonucleotídeos modificados. A eficácia de acoplamento em etapas de todas as fosforamiditas modificadas era maior que 95%. Vários oligonucleotídeos modificados que contêm sequências de unidades A e C alternadas, mas que têm ligações fosfodiéster (PO) no lugar das ligações de fosforotioato (PS) também foram produzidos.

Desproteção

[0132] Após a conclusão da síntese, o vidro com poros controlados (CPG) foi transferido para um frasco com tampa de rosca ou tubo de microcentrífuga livre de RNase com tampa de rosca. O oligonucleotídeo foi clivado do suporte com desproteção simultânea de grupos de base e fosfato com 1,0 mL de uma mistura de amônia etanólica (amônia: etanol (3:1))

durante 5-15 h a 55°C. O frasco foi resfriado brevemente em gelo e então a mistura de amônia etanólica foi transferida para um tubo de microcentrífuga novo. O CPG foi lavado 2 x com partes de 0,1 mL de água deionizada, colocado em gelo seco durante 10 min então seco em speed vac.

Quantificação do Oligômero Bruto ou Análise Bruta

[0133] As amostras foram dissolvidas em água deionizada (1,0 mL) e quantificadas como a seguir: O branco foi primeiramente realizado apenas com água (1 mL). 20 uL de amostra e 980 uL de água foram bem misturados em um tubo de microcentrífuga, transferidos para cubeta e a leitura da absorbância foi obtida em 260 nm. O material bruto é seco e armazenado a -20°C.

Purificação do Oligômero por HPLC

[0134] Os oligômeros brutos foram analisados e purificados por HPLC (Dionex PA 100). O sistema de tampão é A = Water B = 0,25 M de Tris-HCl pH 8, C: 0,375 M de Sódio por clorato, vazão 5,0 mL/min, comprimento de onda 260 nm. Injetar primeiro uma pequena quantidade de material (~5 DO) e analisar por LC-MS. Assim que a identidade do material for confirmada o oligômero bruto pode então ser purificado utilizando uma quantidade maior de material, por exemplo, 60 DO por corrida, vazão de 5mL/min. As frações contendo os oligonucleotídeos de comprimento completo são agrupadas juntas, evaporadas e finalmente dessalinizadas como descrito abaixo.

Dessalinização do Oligômero Purificado

[0135] O oligômero seco purificado foi então dessalinizado utilizando Sephadex G-25M (Amersham Biosciences). O cartucho foi condicionado com 10 mL de água. O oligômero purificado dissolvido vigorosamente em 2,5 mL de água livre de RNase foi aplicado no cartucho com eluição em gota muito

lenta. O oligômero livre de sal foi eluído com 3,5 mL de água diretamente para dentro de um frasco com tampa de rosca.

Análise de HPLC e LC/Ms por Eletrospray

[0136] Um oligômero de aproximadamente 0,2 DO é primeiramente seco, redissolvido em água (50 uL) e então pipetado em frascos especiais para análise de HPLC e LC-MS.

[0137] A Tabela 6 resume o comprimento da sequência, unidades A e C alternadas e se a estrutura é de fosforotioato (PS) ou fosfodiéster (PO) para os oligonucleotídeos modificados exemplificados resultantes.

TABELA 6

No.	Comprimento	modificação A	modificação C	Estrutura
1	(AC)20	2'-OMe	2'-OMe	PS
2	(AC)15	2'-OMe	2'-OMe	PS
3	(AC)25	2'-OMe	2'-OMe	PS
4	(AC)30	2'-OMe	2'-OMe	PS
5	(AC)20	2'-O-MOE	2'-O-MOE	PS
6	(AC)20	LNA	LNA	PS
7	(AC)20	2'-F	2'-F	PS
8	(AC)20	2'-O-Propargil	2'-O-Propargil	PS
9	(AC)20	2'-O-butino	2'-O-butino	PS

No.	Comprimento	modificação A	modificação C	Estrutura
10	(AC)20	2'-F-Ara	2'-F-Ara	PS
11	(AC)20	UNA	UNA	PS
12	(AC)20	ENA	ENA	PS
13	(AC)20	2'-OMe	2'-O-MOE	PS
14	(AC)20	2'-OMe	LNA	PS
15	(AC)20	2'-OMe	2'-F	PS
16	(AC)20	2'-OMe	2'-O-Propargil	PS
17	(AC)20	2'-OMe	2'-O-butino	PS
18	(AC)20	2'-OMe	2'-F-Ara	PS
19	(AC)20	2'-OMe	UNA	PS
20	(AC)20	2'-OMe	ENA	PS
21	(AC)20	2'-OMe	2'-NH ₂	PS
22	(AC)20	2'-O-MOE	2'-OMe	PS
23	(AC)20	2'-O-MOE	LNA	PS
24	(AC)20	2'-O-MOE	2'-F	PS
25	(AC)20	2'-O-MOE	2'-O-Propargil	PS
26	(AC)20	2'-O-MOE	2'-O-butino	PS

No.	Comprimento	modificação A	modificação C	Estrutura
27	(AC)20	2'-O-MOE	2'-F-Ara	PS
28	(AC)20	2'-O-MOE	UNA	PS
29	(AC)20	2'-O-MOE	ENA	PS
30	(AC)20	2'-O-MOE	2'-NH ₂	PS
31	(AC)20	LNA	2'-OMe	PS
32	(AC)20	LNA	2'-O-MOE	PS
33	(AC)20	LNA	2'-F	PS
34	(AC)20	LNA	2'-O-Propargil	PS
35	(AC)20	LNA	2'-O-butino	PS
36	(AC)20	LNA	2'-F-Ara	PS
37	(AC)20	LNA	UNA	PS
38	(AC)20	LNA	ENA	PS
39	(AC)20	LNA	2'-NH ₂	PS
40	(AC)20	2'-F	LNA	PS
41	(AC)20	2'-F	2'-OMe	PS
42	(AC)20	2'-F	2'-O-MOE	PS
43	(AC)20	2'-F	2'-O-Propargil	PS

No.	Comprimento	modificação A	modificação C	Estrutura
44	(AC)20	2'-F	2'-O-butino	PS
45	(AC)20	2'-F	2'-F-Ara	PS
46	(AC)20	2'-F	UNA	PS
47	(AC)20	2'-F	ENA	PS
48	(AC)20	2'-F	2'-NH ₂	PS
49	(AC)20	2'-O-Propargil	2'-OMe	PS
50	(AC)20	2'-O-Propargil	2'-O-MOE	PS
51	(AC)20	2'-O-Propargil	LNA	PS
52	(AC)20	2'-O-Propargil	2'-F	PS
53	(AC)20	2'-O-Propargil	2'-O-butino	PS
54	(AC)20	2'-O-Propargil	2'-F-Ara	PS
55	(AC)20	2'-O-Propargil	UNA	PS
56	(AC)20	2'-O-Propargil	ENA	PS
57	(AC)20	2'-O-Propargil	2'-NH ₂	PS
58	(AC)20	2'-O-butino	2'-OMe	PS
59	(AC)20	2'-O-butino	2'-O-MOE	PS
60	(AC)20	2'-O-butino	LNA	PS

No.	Comprimento	modificação A	modificação C	Estrutura
61	(AC)20	2'-O-butino	2'-F	PS
62	(AC)20	2'-O-butino	2'-O-Propargil	PS
63	(AC)20	2'-O-butino	2'-F-Ara	PS
64	(AC)20	2'-O-butino	UNA	PS
65	(AC)20	2'-O-butino	ENA	PS
66	(AC)20	2'-O-butino	2'-NH ₂	PS
67	(AC)20	2'-F-Ara	2'-OMe	PS
68	(AC)20	2'-F-Ara	2'-O-MOE	PS
69	(AC)20	2'-F-Ara	LNA	PS
70	(AC)20	2'-F-Ara	2'-F	PS
71	(AC)20	2'-F-Ara	2'-O-Propargil	PS
72	(AC)20	2'-F-Ara	2'-O-butino	PS
73	(AC)20	2'-F-Ara	UNA	PS
74	(AC)20	2'-F-Ara	ENA	PS
75	(AC)20	2'-F-Ara	2'-NH ₂	PS
76	(AC)20	UNA	2'-OMe	PS
77	(AC)20	UNA	2'-O-MOE	PS

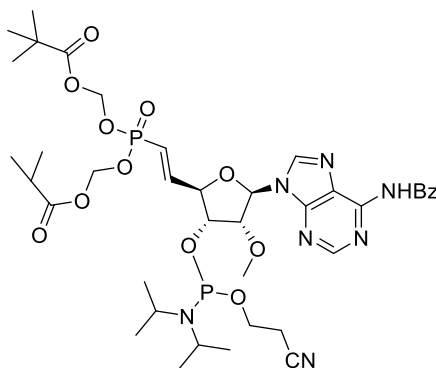
No.	Comprimento	modificação A	modificação C	Estrutura
78	(AC)20	UNA	LNA	PS
79	(AC)20	UNA	2'-F	PS
80	(AC)20	UNA	2'-O-Propargil	PS
81	(AC)20	UNA	2'-O-butino	PS
82	(AC)20	UNA	2'-F-Ara	PS
83	(AC)20	UNA	ENA	PS
84	(AC)20	UNA	2'-NH ₂	PS
85	(AC)20	ENA	2'-OMe	PS
86	(AC)20	ENA	2'-O-MOE	PS
87	(AC)20	ENA	LNA	PS
88	(AC)20	ENA	2'-F	PS
89	(AC)20	ENA	2'-O-Propargil	PS
90	(AC)20	ENA	2'-O-butino	PS
91	(AC)20	ENA	2'-F-Ara	PS
92	(AC)20	ENA	UNA	PS
93	(AC)20	ENA	2'-NH ₂	PS
94	(AC)20	LNA	2'-O-MOE	PS

No.	Comprimento	modificação A	modificação C	Estrutura
95	(AC)20	2'-F	LNA	PS
96	(AC)25	2'-OMe	2'-OMe	PO
97	(AC)25	2'-OMe	2'-OMe	PS
98	(AC)20	2'-F	2'-OMe	PS
99	(AC)20	LNA	2'-O-Me	PS
100	(AC)20	2'-OMe	2'-F	PS
101	(AC)20	2'-OMe	2'-OMe	PO
102	(AC)20	2'-F	2'-O-MOE	PS
103	(AC)30	2'-OMe	2'-OMe	PS
104	(AC)15	2'-OMe	2'-OMe	PS
105	(AC)20	2'-OMe	LNA	PS
106	(AC)20	LNA	LNA	PS
107	(AC)20	2'-OMe	2'-O'MOE	PS
108	(AC)20	2'-O-MOE	2'-OMe	PS
109	(AC)20	2'-OMe	2'-OMe	PS
110	(AC)30	2'-OMe	2'-O-butino	PO
111	(AC)20	2'-F	2'-F	PS

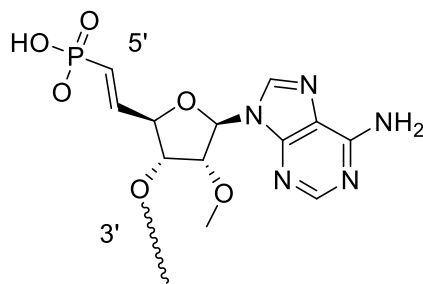
No.	Comprimento	modificação A	modificação C	Estrutura
112	(AC)20	2'-OMe	2'-OMe	PS
113	(AC)15	2'-OMe	2'-OMe	PO
114	(AC)20	2'-O-MOE	2'-O-MOE	PS
115	(AC)20	2'-O-MOE	2'-F	PS
116	(AC)20	LNA	2'-F	PS

EXEMPLOS 117-130

[0138] O efeito da modificação a 5' foi avaliado através da preparação de uma série de oligonucleotídeos fosforotioados de acordo com os métodos descritos anteriormente nos Exemplos 1-116. Oligonucleotídeos com adição de cap terminal foram produzidos através da utilização de um bloco de construção de 5'-fosfonato de vinila para incorporar *endcaps* de 5'-fosfonato de vinila:



bloco de construção de 5'-fosfonato de vinila (5'-VP)



Oligo modificado com *endcap* de 5'-fosfonato de vinila

[0139] Com referência à FIG. 7, o bloco de construção de 5'-fosfonato de vinila (5'-VP) foi preparado como a seguir:

[0140] Preparação do composto **7-2**: A uma solução de **7-1** (15,0 g, 53,3 mmoles) em piridina seca (150 mL) foram adicionados TBSCl (20,0 g, 133,3 mmoles) e Imidazol (10,8 g, 159,9 mmoles). A mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 15 h. A TLC mostrou que **7-1** foi consumido completamente. A mistura de reação foi concentrada a vácuo para produzir resíduo. O resíduo foi extinto com DCM (500 mL). A camada de DCM foi lavada com H₂O (1 L*2) 2 vezes e salmoura. A camada de DCM foi concentrada a vácuo para produzir **7-2** bruto (27,2 g, 53,3 mmoles) na forma de um óleo amarelo. O **7-2** bruto foi utilizado na etapa seguinte diretamente. ESI-LCMS m/z 510,5 [M+H]⁺.

[0141] Preparação do composto **7-3**: A uma solução de **7-2** (26,2 g, 51,3 mmoles) em piridina (183 mL) foi adicionado em gotas o cloreto de benzoíla (15,8 g, 113,0 mmoles) a 5°C. A mistura de reação foi agitada à temperatura ambiente durante 2 horas. A TLC mostrou que o **7-2** foi consumido completamente. A mistura de reação foi extinta com H₂O (4 mL). Então NH₃.H₂O (20 mL) foi adicionado à mistura de reação e agitado à temperatura ambiente durante 30 min. Então a Piridina foi removida da mistura através de concentração sob pressão reduzida. O resíduo foi adicionado à H₂O (100 mL) e extraído com EA (150 mL*3) e as camadas de EA foram combinadas.

A camada de EA foi lavada com salmoura e seca sobre Na_2SO_4 . Filtrada e concentrada para fornecer o **7-3** bruto (45,0 g). ESI-LCMS $m/z = 614,5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$.

[0142] Preparação do composto **7-4**: A uma solução de mistura de **7-3** (44,0 g, bruto) em THF (440 mL) foram adicionados a H_2O (220 mL) e o TFA (220 mL) a 0°C . Então a mistura de reação foi agitada a 0°C durante 1,5 h. A TLC mostrou que o **7-3** foi consumido completamente. O pH da mistura de reação foi ajustado em 7-8 com $\text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$. Então a mistura foi extraída com EA (300 mL*7). A camada de EA combinada foi lavada com salmoura e concentrada a vácuo para fornecer o composto bruto. O composto bruto foi purificado por cromatografia em coluna (EA: PE = 1:5~1:1) para fornecer o composto **7-4** (15,8 g) na forma de um sólido branco. ^1H -RMN (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): $\delta = 11,24$ (s, 1H, trocado por D_2O), 8,77 (s, 2H), 8,04-8,06 (m, 2H), 7,64-7,66 (m, 2H), 7,54-7,58 (m, 2H), 6,14-6,16 (d, $J = 5,9$ Hz, 1H), 5,20-5,23 (m, 1H), 4,58-4,60 (m, 1H), 4,52-4,55 (m, 1H), 3,99-4,01 (m, 1H), 3,69-3,75 (m, 1H), 3,57-3,61 (m, 1H), 3,34 (s, 4H), 0,93 (s, 9H), 0,14-0,15 (d, $J = 1,44$ Hz, 6H). ESI-LCMS $m/z = 500,3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$.

[0143] Preparação do composto **7-5**: A um frasco de fundo arredondado de 500 mL foram adicionados o DMSO (132 mL) e **7-4** (13,2 g, 26,4 mmoles), EDCI (15,19 g, 79,2 mmoles) em rotação à temperatura ambiente. Então a Piridina (2,09 g, 26,4 mmoles, 2,1 mL) foi adicionada à mistura de reação. Após agitar 5 min, o TFA (1,51 g, 13,2 mmoles) foi adicionado à mistura de reação. Então a mistura de reação foi agitada à temperatura ambiente durante 3 h. A LC-MS mostrou que o **7-4** foi consumido completamente. A mistura de reação foi adicionada à água gelada (500 mL) e foi extraída com EA (300 mL*3) 3 vezes. A camada de EA combinada foi lavada com H_2O 2 vezes e salmoura 1 vez. Seca sobre Na_2SO_4 e filtrada. O filtrado foi concentrado para obter o **7-5** bruto (14,6 g) na forma de um sólido branco.

ESI-LCMS $m/z = 516,3$ $[M+H]^+$.

[0144] Preparação do composto **7-6**: O **5A** (24,4 g, 38,5 mmoles) foi adicionado a uma solução de mistura de NaH (2,5 g, 64,3 mmoles, 60% de pureza) em THF (50 mL) a 0°C. Após agitar 15 min, o **7-5** (16,0 g, 32,1 mmoles) em THF (60 mL) foi adicionado à mistura de reação. Então a mistura de reação foi agitada à temperatura ambiente durante 1 h. A LC-MS mostrou que o **7-5** foi consumido completamente. Então a mistura de reação foi extinta com NH_4Cl sat. (500 mL) e extraída com EA (400 mL*3) 3 vezes. A camada de EA combinada foi lavada com salmoura, seca sobre Na_2SO_4 e filtrada. O filtrado foi concentrado a vácuo para obter o composto bruto. O composto bruto foi purificado por c.c (EA: PE = 1:5 ~ 1:1) para fornecer **7-6** (10,0 g, 12,4 mmoles, 38,6% de rendimento) na forma de um sólido branco. ESI-LCMS $m/z = 804,4$ $[M+H]^+$; ^{31}P RMN (162 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 17,01.

[0145] Preparação do composto **7-7**: A um frasco de fundo arredondado de 500 mL foram adicionados o **7-6** (9,0 g, 11,2 mmol) e H_2O (225 mL), HCOOH (225 mL) em rotação. A mistura de reação foi agitada a 26°C durante 15 h. A LC-MS mostrou que o **7-6** foi consumido completamente. A mistura de reação teve o pH ajustado = 6-7 com $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Então a mistura foi extraída com EA (300 mL*3) 3 vezes. A camada de EA combinada foi seca sobre Na_2SO_4 , filtrada e o filtrado foi concentrado para obter o composto bruto. O composto bruto foi purificado por cromatografia em coluna (DCM/MeOH = 100:1 ~ 60:1) para fornecer o produto **7-7** (7,0 g, 10,1 mmoles, 90,6% de rendimento). ^1H -RMN (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 11,11 (s, 1H, trocado por D_2O), 8,71-8,75 (d, $J=14,4$, 2H), 8,04-8,06 (m, 2H), 7,64-7,65 (m, 1H), 7,54-7,58 (m, 2H), 6,88-7,00 (m, 1H), 6,20-6,22 (d, $J=5,4$, 2H), 6,06-6,16 (m, 1H), 5,74-5,75 (d, $J=5,72$, 2H), 5,56-5,64 (m, 4H), 4,64-4,67 (m, 1H), 4,58-4,59 (m, 1H), 4,49-4,52 (m, 1H), 3,37 (s, 3H), 1,09-1,10 (d, $J=1,96$,

18H). ^{31}P RMN (162 MHz, DMS $\text{O}-d_6$) δ 17,45. ESI-LCMS m/z = 690,4 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

[0146] Preparação do composto **5'-VP**: A uma solução de **7-7** (5,5 g, 7,9 mmoles) em DCM (55 mL) foi adicionado o DCI (750 mg, 6,3 mmoles), então CEP[N(iPr) $_2$] $_2$ (3,1 g, 10,3 mmoles) foi adicionada. A mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 2 h. A TLC mostrou que 3,5% de **7,7** permaneceram. A mistura de reação foi lavada com H_2O (40 mL*2) e salmoura (50 mL*2), seca sobre Na_2SO_4 e concentrada para fornecer bruto. O resíduo foi purificado por Flash-Prep-HPLC com as condições a seguir (IntelFlash-1): Coluna, C18 sílica gel; fase móvel, $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (0,5% de NH_4HCO_3) = 1/5 aumentando para $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (0,5% de NH_4HCO_3) = 1/0 dentro do período de 30 min, o produto eluído foi coletado em $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (0,5% de NH_4HCO_3) = 3/1; Detector, UV 254 nm. O produto foi concentrado e extraído com EA (50 mL* 3). A camada de EA combinada foi lavada com salmoura e seca sobre Na_2SO_4 , filtrada e o filtrado foi concentrado para obtenção do **5'-VP** resultante (6,0 g, 98% de pureza) na forma de um sólido branco. ^1H -RMN (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 11,27 (s, 1H, trocado por D_2O), 8,72-8,75 (m, 2H), 8,04-8,06 (m, 2H), 7,54-7,68 (m, 3H) , 6,85-7,05 (m, 1H), 6,09-6,26 (m, 2H), 5,57-5,64 (m, 4H), 4,70-4,87 (m, 3H), 3,66-3,88 (m, 4H), 3,37-3,41 (m, 3H), 2,82-2,86 (m, 2H), 1,20-1,21 (m, 12H) , 1,08-1,09 (m, 18H). ^{31}P RMN (162 MHz, DMSO- d_6): 149,99, 149,16, 17,05, 16,81. ESI-LCMS m/z = 890,8 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

[0147] A Tabela 7 resume o comprimento de sequência, as unidades A e C alternadas e a modificação a 5' para os oligonucleotídeos modificados fosforotioados exemplificados resultantes.

TABELA 7

No .	Comprimento	A	C	Modificação a 5'
117	(AC)17	LNA-A	LNA-(5m)C	OH
118	(AC)18	LNA-A	LNA-(5m)C	OH
119	(AC)19	LNA-A	LNA-(5m)C	OH
120	(AC)17	LNA-A	LNA-(5m)C	Vinil-fosfonato-A
121	(AC)18	LNA-A	LNA-(5m)C	Vinil-fosfonato-A
122	(AC)19	LNA-A	LNA-(5m)C	Vinil-fosfonato-A
123	(AC)20	LNA-A	LNA-(5m)C	Vinil-fosfonato-A
124	(AC)17	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	OH
125	(AC)18	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	OH
126	(AC)19	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	OH

No .	Comprimento	A	C	Modificação a 5'
127	(AC)17	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	Vinil-fosfonato-A
128	(AC)18	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	Vinil-fosfonato-A
129	(AC)19	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	Vinil-fosfonato-A
130	(AC)20	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	Vinil-fosfonato-A

EXEMPLOS 131-174

[0148] O efeito do comprimento de sequência, da incorporação de LNA e da modificação a 5' foi avaliado através da preparação de uma série de oligonucleotídeos fosforotioados de acordo com os métodos descritos anteriormente nos Exemplos 1-116. A Tabela 8 resume o comprimento de sequência, as unidades A e C alternadas, a modificação a 5' e o comprimento e a posição das unidades de LNA para os oligonucleotídeos modificados fosforotioados exemplificados resultantes.

TABELA 8

No.	Comprimento	A	C	Modificação a 5'	Modificação de LNA
131	(AC)17	2'-OMe-A	LNA-(5m)C	OH	
132	(AC)18	2'-OMe-A	LNA-(5m)C	OH	
133	(AC)19	2'-OMe-A	LNA-(5m)C	OH	
134	(AC)20	2'-OMe-A	LNA-(5m)C	OH	
135	(AC)17	2'-OMe-A	LNA-(5m)C	Vinil-fosfonato-A	
136	(AC)18	2'-OMe-A	LNA-(5m)C	Vinil-fosfonato-A	
137	(AC)19	2'-OMe-A	LNA-(5m)C	Vinil-fosfonato-A	
138	(AC)20	2'-OMe-A	LNA-(5m)C	Vinil-fosfonato-A	
139	(AC)17	LNA-A	2'-OMe-(5m)C	OH	
140	(AC)18	LNA-A	2'-OMe-(5m)C	OH	

No.	Comprimen to	A	C	Modificação a 5'	Modificação de LNA
141	(AC)1 9	LNA-A	2'-OMe- (5m)C	OH	
142	(AC)2 0	LNA-A	2'-OMe- (5m)C	OH	
143	(AC)1 7	LNA-A	2'-OMe- (5m)C	Vinil- fosfonato-A	
144	(AC)1 8	LNA-A	2'-OMe- (5m)C	Vinil- fosfonato-A	
145	(AC)1 9	LNA-A	2'-OMe- (5m)C	Vinil- fosfonato-A	
146	(AC)2 0	LNA-A	2'-OMe- (5m)C	Vinil- fosfonato-A	
147	(AC)1 7	UNA-A	LNA-(5m)C	OH	
148	(AC)1 8	UNA-A	LNA-(5m)C	OH	
149	(AC)1 9	UNA-A	LNA-(5m)C	OH	
150	(AC)2 0	UNA-A	LNA-(5m)C	OH	

No.	Comprimento	A	C	Modificação a 5'	Modificação de LNA
151	(AC)17	UNA-A	LNA-(5m)C	Vinil-fosfonato-A	
152	(AC)18	UNA-A	LNA-(5m)C	Vinil-fosfonato-A	
153	(AC)19	UNA-A	LNA-(5m)C	Vinil-fosfonato-A	
154	(AC)20	UNA-A	LNA-(5m)C	Vinil-fosfonato-A	
155	(AC)17	LNA-A	UNA-(5m)C	OH	
156	(AC)18	LNA-A	UNA-(5m)C	OH	
157	(AC)19	LNA-A	UNA-(5m)C	OH	
158	(AC)20	LNA-A	UNA-(5m)C	OH	
159	(AC)20	LNA-A	UNA-(5m)C	OH	Bloco de 4 LNA
160	(AC)17	LNA-A	UNA-(5m)C	Vinil-fosfonato-A	

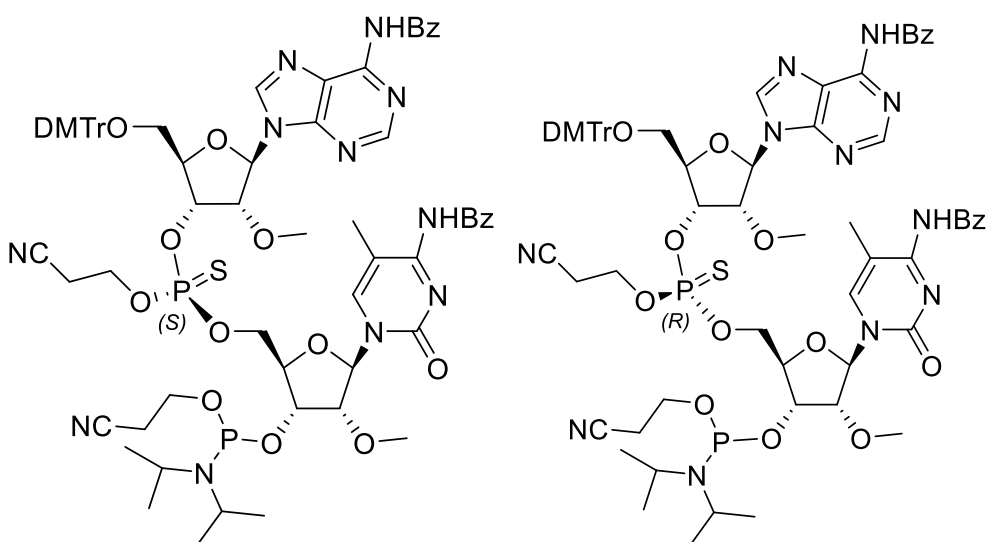
No.	Comprimento	A	C	Modificação a 5'	Modificação de LNA
161	(AC)18	LNA-A	UNA-(5m)C	Vinil-fosfonato-A	
162	(AC)19	LNA-A	UNA-(5m)C	Vinil-fosfonato-A	
163	(AC)20	LNA-A	UNA-(5m)C	Vinil-fosfonato-A	
164	(AC)20	2'-OMe-A LNA-A	2'-OMe-(5m)C LNA-(5m)C	OH	Cada 3ª base é LNA
165	(AC)20	2'-OMe-A LNA-A	2'-OMe-(5m)C LNA-(5m)C	Vinil-fosfonato-A	Cada 3ª base é LNA
166	(AC)20	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C LNA-(5m)C	OH	Cada 4ª base é LNA
167	(AC)20	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C LNA-(5m)C	Vinil-fosfonato-A	Cada 4ª base é LNA

No.	Comprimen to	A	C	Modificação a 5'	Modificação de LNA
168	(AC)1 7	2'-OMe- A	2'-OMe- (5m)C LNA(5m)C	Vinil- fosfonato-A	5 (5m)lnC no meio
169	(AC)1 8	2'-OMe- A	2'-OMe- (5m)C	Vinil- fosfonato-A	6 lnAps(5m)C no meio
170	(AC)1 9	2'-OMe- A	2'-OMe- (5m)C LNA(5m)C	Vinil- fosfonato-A	6 lnAps(5m)C no meio
171	(AC)2 0	2'-OMe- A	2'-OMe- (5m)C LNA(5m)C	OH	5 (5m)lnC no meio
172	(AC)2 0	LNA-A 2'-OMe- A	2'-OMe- (5m)C LNA(5m)C	OH	10 lnAps(5m)C no meio
173	(AC)2 0	2'-OMe- A	2'-OMe- (5m)C LNA(5m)C	Vinil- fosfonato-A	5 (5m)lnC no meio

No.	Comprimento	A	C	Modificação a 5'	Modificação de LNA
174	(AC) ₂ 0	2'-OMe-A LNA-A	2'-OMe-(5m)C LNA-(5m)C	Vinil-fosfonato-A	10 lnAps(5m)C no meio

EXEMPLOS 175-216

[0149] O efeito do comprimento de sequência, da incorporação de LNA, da modificação estereoquímica e da modificação a 5' foi avaliado através da preparação de uma série de oligonucleotídeos fosforotioados de acordo com os métodos descritos anteriormente nos Exemplos 1-116, exceto pelo fato de que os oligonucleotídeos foram preparados por um método modificado utilizando um bloco de construção de dinucleotídeo que consiste de uma unidade A e uma unidade C conectadas através de uma ligação fosforotioato definida estereoquimicamente como a seguir:



2'-OMeAps $\mathbf{R}$ (5m)mC fosforamidita ($\mathbf{9R}$) 2'-OMeAps $\mathbf{S}$ (5m)mC fosforamidita

(9S)

[0150] Com referência às FIGS. 8, 9A e 9B, os blocos de construção de dinucleotídeos **9R** e **9S** foram preparados como a seguir:

[0151] Preparação do composto **8-2**: A uma solução de **8-1** (300,0 g, 445,1 mmoles) em 3000 mL de dioxano seco com uma atmosfera inerte de nitrogênio foi adicionado o ácido levulínico (309,3 g, 2,67 moles) em gotas à temperatura ambiente. Então a diciclohexilcarbodiimida (274,6 g, 1,33 mol) e a 4-dimetilaminopiridina (27,1 g, 222,0 mmoles) foram adicionadas em ordem à temperatura ambiente. A solução resultante foi agitada à temperatura ambiente durante 5 h e diluída com 5000 mL de diclorometano e filtrada. A fase orgânica foi lavada com 2 x 3000 mL de bicarbonato de sódio aquoso a 2% e 1 x 3000 mL de água respectivamente. A fase orgânica foi seca sobre sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. 345,0 g (bruto) de **8-2** foram obtidos na forma de um sólido branco e utilizados na etapa seguinte sem purificação adicional. ESI-LCMS: m/z 774 [M+H]⁺.

[0152] Preparação do composto **8-3**: A uma solução de **8-2** (345 g, 445,1 mmoles) que foi dissolvida em 3000 mL de diclorometano com uma atmosfera inerte de nitrogênio foi adicionado o ácido p-toluenossulfônico (84,6 g, 445,1 mmoles) em gotas a 0 °C. A solução resultante foi agitada a 0 °C durante 0,5 h e diluída com 3000 mL de diclorometano e lavada com 2 x 2000 mL de bicarbonato de sódio aquoso saturado e 1 x 2000 mL de cloreto de sódio aquoso saturado respectivamente. A fase orgânica foi seca sobre sulfato de sódio anidro e concentrada sob pressão reduzida e o resíduo foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel (SiO₂, diclorometano: metanol = 30:1) para fornecer **8-3** (210,0 g, 90% ao longo de duas etapas) na forma de um sólido branco. ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ =12,88 (s, 1H), 8,17-8,10 (m, 3H), 7,62-7,60 (m, 1H), 7,58-7,48 (m, , 2H), 5,97-5,91

(m, 1H), 5,42 (d, $J = 5,9$ Hz, 1H), 5,25 (s, 1H), 4,21-4,08 (m, 2H), 3,78-3,59 (m, 2H), 2,75-2,74 (m, 2H), 2,57 (m, 2H), 2,13 (d, $J = 2,3$ Hz, 3H), 2,02 (s, 3H), 1,81 (m, 1H), 1,77-1,56 (m, 1H), 1,33-0,98 (m, 1H). ESI-LCMS: m/z 474 $[M+H]^+$.

[0153] Preparação do composto **8-4**: A uma solução de **8-3** (210,0 g, 444,9 mmoles) em 2000 mL de acetonitrila com uma atmosfera inerte de nitrogênio foram adicionados **8-3a** (360,0 g, 405,4 mmoles) e ETT (58,0 g, 445,9 mmoles) em ordem a 0°C. A solução resultante foi agitada durante 2 h à temperatura ambiente. Então a mistura foi filtrada e utilizada na etapa seguinte sem purificação adicional. ESI-LCMS: m/z 1258 $[M+H]^+$.

[0154] Preparação dos compostos **8-5** e **8-6**: A uma solução de **8-4** (509,9 g, 405,4 mmoles) em 2000 mL de acetonitrila com uma atmosfera inerte de nitrogênio foram adicionadas piridina (128,0 g, 1,62 mol) e 5-amino-3H-1,2,4-ditiazol-3-tiona (121,8 g, 810,9 mmoles) em ordem à temperatura ambiente. A solução de reação foi agitada durante 30 minutos à temperatura ambiente. A solução resultante foi filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por Flash-Prep-HPLC com as condições a seguir (IntelFlash-1): Coluna, C18 sílica gel; fase móvel, CH_3CN/H_2O (0,5% de NH_4HCO_3) = 1/1 aumentando para CH_3CN/H_2O (0,5% de NH_4HCO_3) = 1/0 dentro do período de 20 min, o produto eluído foi coletado em CH_3CN/H_2O (0,5% de NH_4HCO_3) = 1/0; Detector, UV 254 nm. Isto resultou em uma mistura de **8-5** e **8-6** (430,0 g, 90% ao longo de duas etapas) na forma de um sólido branco. As frações foram diluídas com 3000 mL de diclorometano. A fase orgânica foi seca sobre sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por SFC com as condições a seguir: CHIRALPAK IB N-5 (IB50CD-VD008)/SFC 0,46 cm I.D. $\times$ 25 cm L 10,0 μ L Fase móvel: (DCM/EtOAc=80/20(V/V)), Detector, UV 254 nm. As frações foram

concentradas até que nenhum solvente residual sobrasse sob pressão reduzida. 105,0 g (35,0%) de **8-5** foram obtidos na forma de um sólido branco e utilizados para produzir **9R** como descrito abaixo. ^1H -RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 12,88 (s, 1H), 11,26 (s, 1H), 8,62 (d, J = 8,06 Hz, 2H), 8,18 (m, 2H), 8,05 (d, J = 7,2 Hz, 2H), 7,79 (s, 1H), 7,67-7,48 (m, 6H), 7,40 (d, J = 7,2 Hz, 2H), 7,28-7,18 (m, 7H), 6,86-6,83 (m, 4H), 6,21 (d, J = 6,6 Hz, 1H), 5,91 (d, J = 5,0 Hz, 1H), 5,44-5,41 (m, 1H), 5,28-5,26 (m, 1H), 5,06 (m, 1H), 4,45-4,24 (m, 7H), 3,71 (s, 6H), 3,39 (s, 4H), 3,31 (s, 3H), 2,98 (m, 2H), 2,75 (m, 2H), 2,56 (m, 2H), 2,01 (s, 3H). ^{31}P -RMN (162 MHz, DMSO- d_6) δ = 67,17. ESI-LCMS: m/z 1292 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 170,0 g (56,6%) de **8-6** foram obtidos na forma de um sólido branco e utilizados para produzir **9S** como descrito abaixo. ^1H -RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 12,86 (s, 1H), 11,25 (s, 1H), 8,62 (d, J = 16,6 Hz, 2H), 8,18 (d, J = 7,2 Hz, 2H), 8,05 (m, 2H), 7,78 (s, 1H), 7,67-7,48 (m, 6H), 7,40 (d, J = 7,2 Hz, 2H), 7,28-7,18 (m, 7H), 6,87-6,85 (m, 4H), 6,21 (d, J = 6,8 Hz, 1H), 5,91 (d, J = 5,2 Hz, 1H), 5,43-5,39 (m, 1H), 5,28-5,26 (m, 1H), 5,06 (m, 1H), 4,48-4,21 (m, 7H), 3,72 (s, 6H), 3,36 (s, 4H), 3,26 (s, 3H), 2,95 (m, 2H), 2,73 (m, 2H), 2,55 (m, 2H), 2,04 (s, 3H); ^{31}P -RMN (162 MHz, DMSO- d_6) δ = 66,84; ESI-LCMS: m/z 1292 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

[0155] Preparação do composto **9-1**: A uma solução de **8-5** (100,0 g, 77,4 mmoles) em 700 mL de acetonitrila com uma atmosfera inerte de nitrogênio foi adicionado 0,5 M de hidrato de hidrazina (20,0 g, 0,4 mol) em piridina/ácido acético (3:2) a 0°C. A solução resultante foi agitada durante 0,5 h a 0°C. Então à reação foi adicionada 2,4-pentanodiona de uma vez, foi permitido que a mistura aquecesse à temperatura ambiente e agitasse durante 15 min adicionais. A solução foi diluída com DCM (2000 mL) e lavada com NH_4Cl aq. sat. duas vezes e lavada com salmoura e seca sobre Na_2SO_4 . Então a solução foi concentrada sob pressão reduzida e o resíduo foi purificado por Flash-Prep-HPLC com as condições a seguir (IntelFlash-1): Coluna, C18 sílica gel; fase móvel, $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (0,5% de NH_4HCO_3) = 1/1

aumentando para CH₃CN/H₂O (0,5% de NH₄HCO₃) = 1/0 dentro do período de 20 min, o produto eluído foi coletado em CH₃CN/ H₂O (0,5% de NH₄HCO₃) = 1/0; Detector, UV 254 nm. Isto resultou em **9-1** (67,0 g, 80%) na forma de um sólido branco. ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 12,97 (s, 1H), 11,26 (s, 1H), 8,62 (d, *J* = 11,2 Hz, 2H), 8,19 (d, *J* = 7,2 Hz, 2H), 8,05 (m, 2H), 7,74 (s, 1H), 7,67-7,48. (m, 6H), 7,40 (d, *J* = 7,2 Hz, 2H), 7,28-7,18 (m, 7H), 6,85 (m, 4H), 6,21 (m, 1H), 5,90 (d, *J* = 3,2 Hz, 1H), 5,49-5,43 (m, 2H), 5,05 (m, 1H), 4,45 (m, 1H), 4,40-4,30 (m, 4H), 4,18-4,11 (m, 2H), 3,93 (m, 1H), 3,71 (s, 6H), 3,40-3,32 (m, 8H), 2,98 (m, 2H), 2,04 (s, 3H). ³¹P-RMN (162 MHz, DMSO-d₆) δ = 67,30. ESI-LCMS: *m/z* 1194 [M+H]⁺.

[0156] Preparação do composto **9R**: A uma solução de **9-1** (58,0 g, 48,6 mmoles) em 600 mL de diclorometano com uma atmosfera inerte de nitrogênio foram adicionados CEP[N(iPr)₂]₂ (18,7 g, 62,1 mmoles) e DCI (5,1 g, 43,7 mmoles) em ordem à temperatura ambiente. A solução resultante foi agitada durante 1 hora à temperatura ambiente e diluída com 1000 mL de diclorometano e lavada com 2 x 1000 mL de bicarbonato de sódio aquoso saturado e 1 x 1000 mL de cloreto de sódio aquoso saturado respectivamente. A fase orgânica foi seca sobre sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada até que nenhum solvente residual sobrasse sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por Flash-Prep-HPLC com as condições a seguir (IntelFlash-1): Coluna, C18 sílica gel; fase móvel, CH₃CN/H₂O (0,5% de NH₄HCO₃) = 1/1 aumentando para CH₃CN/H₂O (0,5% de NH₄HCO₃) = 1/0 dentro do período de 20 min, o produto eluído foi coletado em CH₃CN/ H₂O (0,5% de NH₄HCO₃) = 1/0; Detector, UV 254 nm. Isto resultou em **9R** (51,2 g, 70%) na forma de um sólido branco. ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 12,94 (m, 1H), 11,26 (s, 1H), 8,62 (m, 2H), 8,19 (d, *J* = 7,2 Hz, 2H), 8,05 (m, 2H), 7,77 (m, 1H), 7,69-7,46 (m, 6H), 7,39 (d, *J* = 6,6 Hz, 2H), 7,26-7,20 (m, 7H), 6,84 (m, 4H), 6,20 (m, 1H), 5,90 (m, 1H), 5,43 (m, 1H), 5,06 (s, 1H), 4,46-4,17 (m, 7H), 4,12 (m,

1H), 3,82-3,80 (m, 2H), 3,73-3,66 (s, 6H), 3,64-3,58 (m, 2H), 3,48-3,29 (m, 8H), 2,98 (s, 2H), 2,82-2,77 (m, 2H), 2,03 (s, 3H), 1,24-1,15 (m, 12H). ³¹P-RMN (162 MHz, DMSO-d₆) δ = 149,87, 149,80, 67,43, 67,33. ESI-LCMS: m/z 1394 [M+H]⁺.

[0157] Preparação do composto **9-2**: A uma solução de **8-6** (110,0 g, 85,1 mmoles) em 700 mL acetonitrila com uma atmosfera inerte de nitrogênio foi adicionado 0,5 M de hidrato de hidrazina (21,1 g, 423,6 mmoles) em piridina/ácido acético (3:2) a 0°C. A solução resultante foi agitada durante 0,5 h a 0°C. Então à reação foi adicionada 2,4-pentanodiona de uma vez, foi permitido que a mistura aquecesse à temperatura ambiente e agitasse durante 15 min adicionais. A solução foi diluída com DCM (2000 mL) e lavada com NH₄Cl aq. sat. duas vezes e lavada com salmoura e seca sobre Na₂SO₄. Então a solução foi concentrada sob pressão reduzida e o resíduo foi purificado por Flash-Prep-HPLC com as condições a seguir (IntelFlash-1): Coluna, C18 sílica gel; fase móvel, CH₃CN/H₂O (0,5% de NH₄HCO₃) = 1/1 aumentando para CH₃CN/H₂O (0,5% de NH₄HCO₃) = 1/0 dentro do período de 20 min, o produto eluído foi coletado em CH₃CN/ H₂O (0,5% de NH₄HCO₃) = 1/0; Detector, UV 254 nm. Isto resultou em **9-2** (72,0 g, 80%) na forma de um sólido branco. ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 12,94 (s, 1H), 11,24 (s, 1H), 8,61-8,57 (m, 2H), 8,18 (d, *J* = 7,6 Hz, 2H), 8,03 (d, *J* = 7,6 Hz, 2H), 7,74 (s, 1H), 7,66-7,47 (m, 6H), 7,40 (d, *J* = 7,1 Hz, 2H), 7,27-7,20 (m, 7H), 6,86 (m, 4H), 6,20 (d, *J* = 6,6 Hz, 1H), 5,87 (d, *J* = 4,0 Hz, 1H), 5,42 (m, 2H), 5,05 (m, 1H), 4,45 (m, 2H), 4,40-4,24 (m, 1H), 4,22-4,06 (m, 4H), 3,92 (m, 1H), 3,71 (s, 6H), 3,40-3,32 (m, 8H), 2,94 (m, 2H), 2,03 (m, 3H). ³¹P-RMN (162 MHz, DMSO-d₆) δ = 66,87. ESI-LCMS: m/z 1194 [M+H]⁺.

[0158] Preparação do composto **9S**: A uma solução de **9-2** (62,0 g, 51,9 mmoles) em 600 mL de diclorometano com uma atmosfera inerte de nitrogênio foram adicionados CEP[N(iPr)₂]₂ (19,0 g, 63,1 mmoles) e DCI (5,55

g, 47,0 mmoles) em ordem à temperatura ambiente. A solução resultante foi agitada durante 1 hora à temperatura ambiente e diluída com 1000 mL de diclorometano e lavada com 2 x 1000 mL de bicarbonato de sódio aquoso saturado e 1 x 1000 mL de cloreto de sódio aquoso saturado respectivamente. A fase orgânica foi seca sobre sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada até que nenhum solvente residual sobrasse sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por Flash-Prep-HPLC com as condições a seguir (IntelFlash-1): Coluna, C18 sílica gel; fase móvel, CH₃CN/H₂O (0,5% de NH₄HCO₃) = 1/1 aumentando para CH₃CN/H₂O (0,5% de NH₄HCO₃) = 1/0 dentro do período de 20 min, o produto eluído foi coletado em CH₃CN/ H₂O (0,5% de NH₄HCO₃) = 1/0; Detector, UV 254 nm. Isto resultou em **9S** (51,5 g, 70%) na forma de um sólido branco. ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 12,90 (s, 1H), 11,25 (s, 1H), 8,60 (m, 2H), 8,19 (d, *J* = 6,6 Hz, 2H), 8,04 (m, 2H), 7,77 (s, 1H), 7,67-7,48 (m, 6H), 7,41 (d, *J* = 8,0 Hz, 2H), 7,29-7,19 (m, 7H), 6,85 (m, 4H), 6,21 (d, *J* = 6,8 Hz, 1H), 5,91-5,87 (m, 1H), 5,41 (m, 1H), 5,06 (m, 1H), 4,46-4,21 (m, 7H), 4,10 (m, 1H), 3,83-3,75 (m, 2H), 3,73-3,68 (s, 6H), 3,68-3,59 (m, 2H), 3,40-3,32 (m, 8H), 2,93 (m, 2H), 2,80 (m, 2H), 2,02 (s, 3H), 1,18-1,13 (m, 12H). ³¹P-RMN (162 MHz, DMSO-d₆) δ = 149,96, 149,73, 66,99, 66,86. ESI-LCMS: *m/z* 1394 [M+H]⁺.

[0159] O método modificado também utilizou um tempo de acoplamento mais longo (8 min) e um número maior de equivalentes de amiditas (8 equivalentes). A Tabela 9 resume o comprimento de sequência, as unidades A e C alternadas, o número e o tipo (R ou S) de ligações fosforotioato (PS) definidas estereoquimicamente e a modificação a 5' para os oligonucleotídeos modificados fosforotioados exemplificados resultantes.

TABELA 9

No.	Comprimido	A	C	Modificação o PS	Modificação a 5'
175	(AC)17	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	isômero 5 R	OH
176	(AC)18	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	isômero 6 R	OH
177	(AC)19	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	isômero 4 R	OH
178	(AC)20	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	isômero 4 R	OH
179	(AC)20	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	isômero 5 R	OH
180	(AC)20	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	isômero 6 R	OH
181	(AC)20	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	isômero 6 R	Vinil-fosfonato-A
182	(AC)20	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	isômero 7 R	OH
183	(AC)20	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	isômero 13 R	OH
184	(AC)20	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	isômero 20 R	OH

No.	Comprimido	A	C	Modificação PS	Modificação a 5'
185	(AC)20	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	isômero 20 R	Vinil-fosfonato-A
186	(AC)20	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	isômero 19 R	Vinil-fosfonato-A
187	(AC)17	LNA-A	LNA-(5m)C	isômero 5 R	OH
188	(AC)18	LNA-A	LNA-(5m)C	isômero 6 R	OH
189	(AC)19	LNA-A	LNA-(5m)C	isômero 6 R	OH
190	(AC)20	LNA-A	LNA-(5m)C	isômero 4 R	OH
191	(AC)20	LNA-A	LNA-(5m)C	isômero 5 R	OH
192	(AC)20	LNA-A	LNA-(5m)C	isômero 6 R	OH
193	(AC)20	LNA-A	LNA-(5m)C	isômero 6 R,	Vinil-fosfonato-A
194	(AC)20	LNA-A	LNA-(5m)C	isômero 13 R	OH

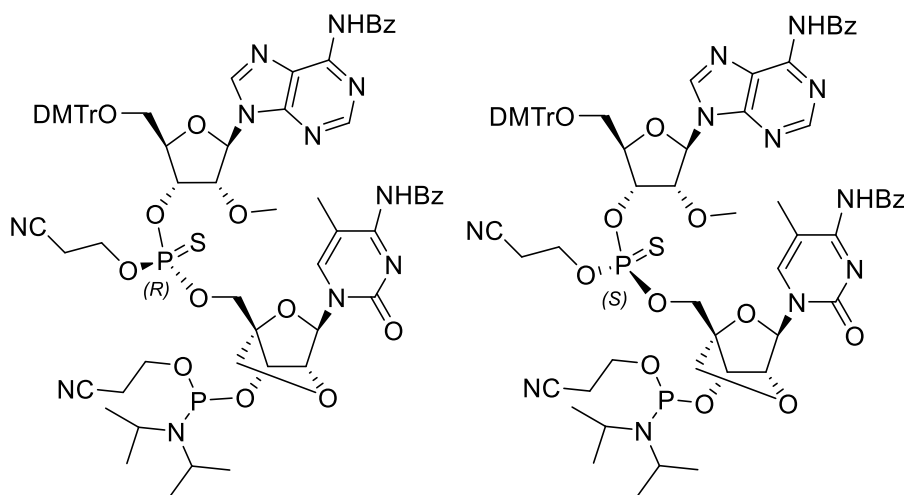
No.	Comprimido	A	C	Modificação do PS	Modificação a 5'
195	(AC)20	LNA-A	LNA-(5m)C	isômero 20 R	OH
196	(AC)20	LNA-A	LNA-(5m)C	isômero 20 R	Vinil-fosfonato-A
197	(AC)17	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	isômero 5 S	OH
198	(AC)18	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	isômero 6 S	OH
199	(AC)19	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	isômero 6 S	OH
200	(AC)20	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	isômero 4 S	OH
201	(AC)20	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	isômero 5 S	OH
202	(AC)20	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	isômero 6 S	OH
203	(AC)20	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	isômero 7 S	OH
204	(AC)20	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	isômero 13 S	OH

No.	Comprimido	A	C	Modificação o PS	Modificação a 5'
205	(AC)20	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	isômero 20 S	OH
206	(AC)20	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	isômero 20 S	Vinil-fosfonato-A
207	(AC)17	LNA-A	LNA-(5m)C	isômero 5 S	OH
208	(AC)18	LNA-A	LNA-(5m)C	isômero 6 S	OH
209	(AC)19	LNA-A	LNA-(5m)C	isômero 6 S	OH
210	(AC)20	LNA-A	LNA-(5m)C	isômero 4 S	OH
211	(AC)20	LNA-A	LNA-(5m)C	isômero 5 S	OH
212	(AC)20	LNA-A	LNA-(5m)C	isômero 6 S	OH
213	(AC)20	LNA-A	LNA-(5m)C	isômero 6 S	Vinil-fosfonato-A
214	(AC)20	LNA-A	LNA-(5m)C	isômero 13 S	OH

No.	Comprimento	A	C	Modificação no PS	Modificação a 5'
215	(AC)20	LNA-A	LNA-(5m)C	isômero 20 S	OH
216	(AC)20	LNA-A	LNA-(5m)C	isômero 20 S	Vinil-fosfonato-A

EXEMPLOS 217-234

[0160] O efeito do comprimento de sequência, da incorporação de LNA, da modificação estereoquímica e da modificação a 5' foi avaliado através da preparação de uma série de oligonucleotídeos fosforotioados de acordo com os métodos descritos anteriormente nos Exemplos 175-216, exceto pelo fato de que os oligonucleotídeos foram preparados por um método modificado utilizando um bloco de construção de dinucleotídeo consistindo de uma unidade A e uma unidade C conectadas através de uma ligação fosforotioato definida estereoquimicamente como a seguir:



2'-OMeAps**R**(5m)lnC fosforamidita (**11R**) 2'-OMeAps**S**(5m)lnC fosforamidita (**11S**)

[0161] Com referência às FIGS. 10, 11A e 11B, os blocos de construção de dinucleotídeos **11R** e **11S** foram preparados como a seguir:

[0162] Preparação do composto **10-2**: A uma solução de **10-1** (50,0 g, 74,0 mmoles) em 500 mL de dioxano seco com uma atmosfera inerte de nitrogênio foi adicionado o ácido levulínico (51,5 g, 44,4 moles) em gotas à temperatura ambiente. Então a diciclohexilcarbodiimida (45,7 g, 0,2 mol) e a 4-dimetilaminopiridina (4,6 g, 37,0 mmoles) foram adicionadas em ordem à temperatura ambiente. A solução resultante foi agitada à temperatura ambiente durante 5 h e diluída com 3000 mL de diclorometano e filtrada. A fase orgânica foi lavada com 2 x 1000 mL de bicarbonato de sódio aquoso a 2% e 1 x 1000 mL de água respectivamente. A fase orgânica foi seca sobre sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. 52,0 g (bruto) de **10-2** foram obtidos na forma de um sólido branco e utilizados na etapa seguinte sem purificação adicional. ESI-LCMS: m/z 774 [M+H]⁺.

[0163] Preparação do composto **10-3**: A uma solução de **10-2** (52,0 g, 67,0 mmoles) que foi dissolvida em 400 mL de diclorometano com uma atmosfera inerte de nitrogênio foi adicionado o ácido p-toluenossulfônico (51,5 g, 0,4 mol) em gotas a 0 °C. A solução resultante foi agitada a 0 °C durante 0,5 h e diluída com 2000 mL de diclorometano e lavada com 2 x 1000 mL de bicarbonato de sódio aquoso saturado e 1 x 1000 mL de cloreto de sódio aquoso saturado respectivamente. A fase orgânica foi seca sobre sulfato de sódio anidro e concentrada sob pressão reduzida e o resíduo foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel (SiO₂, diclorometano: metanol = 30:1) para fornecer **10-3** (32,0 g, 80% ao longo de duas etapas) na forma de um sólido branco. ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 13,05 (s, 1H), 8,20-7,91 (m, 4H), 7,60-7,49 (m, 4H), 5,57 (m, 2H), 5,32 (d, J = 10,8

Hz, 1H), 4,88 (s, 1H), 4,49 (s, 1H), 4,18 (s, 1H), 3,91-3,78 (m, 5H), 2,74-2,69 (m, 4H), 2,59-2,49 (m, 7H), 2,10 (s, 5H), 2,06 (s, 4H), 1,74-1,49 (m, 3H), 1,26-1,02 (m, 3H). ESI-LCMS: m/z 472 $[M+H]^+$.

[0164] Preparação do composto **10-4**: A uma solução de **10-3** (28,0 g, 59,4 mmoles) em 300 mL de acetonitrila com uma atmosfera inerte de nitrogênio foram adicionados **8-3a** (50,0 g, 56,3 mmoles) e ETT (7,9 g, 59,4 mmoles) em ordem a 0°C. A solução resultante foi agitada durante 2 h à temperatura ambiente. Então a mistura foi filtrada e utilizada na etapa seguinte sem purificação adicional. ESI-LCMS: m/z 1258 $[M+H]^+$.

[0165] Preparação de compostos **10-5** e **10-6**: A uma solução de **10-4** (70,9 g, 56,3 mmoles) em 300 mL de acetonitrila com uma atmosfera inerte de nitrogênio foram adicionadas piridina (17,8 g, 225,2 mmoles) e 5-amino-3H-1,2,4-ditiazol-3-tiona (16,9 g, 112,6 mmoles) em ordem à temperatura ambiente. A solução de reação foi agitada durante 30 minutos à temperatura ambiente. A solução resultante foi filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por Flash-Prep-HPLC com as condições a seguir (IntelFlash-1): Coluna, C18 sílica gel; fase móvel, CH₃CN/H₂O (0,5% de NH₄HCO₃) = 1/1 aumentando para CH₃CN/H₂O (0,5% de NH₄HCO₃) = 1/0 dentro do período de 20 min, o produto eluído foi coletado em CH₃CN/H₂O (0,5% de NH₄HCO₃) = 1/0; Detector, UV 254 nm. Isto resultou em uma mistura de **10-5** e **10-6**. As frações foram diluídas com 3000 mL de diclorometano. A fase orgânica foi seca sobre sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por SFC com as condições a seguir: CHIRAL CEL OD-H/SFC 20mm*250mmL 5um (Fase A: CO₂; Fase B: 50% etanol-50% acetonitrila), Detector, UV 220 nm. As frações foram concentradas até que nenhum solvente residual sobrasse sob pressão reduzida. 9,0 g (25,7%) de **10-5** foram obtidos na forma de um sólido branco e utilizados para produzir **11R** como descrito abaixo. ¹H-RMN (400

MHz, DMSO- d_6) δ = 13,06 (s, 1H), 11,28 (s, 1H), 8,63 (d, J = 20 Hz, 2H), 8,20 (m, 2H), 8,05 (d, J = 8 Hz, 2H), 7,84 (s, 1H), 7,67-7,39 (m, 8H), 7,28-7,19 (m, 7H), 6,86-6,83 (m, 4H), 6,24 (d, J = 6,6 Hz, 1H), 5,66 (s, 2H), 5,45-5,43(m, 1H), 5,10-5,03(m, 2H), 4,82-4,76(m, 1H), 4,60 (s, 1H), 4,50-4,33 (m, 4H), 4,03-3,96 (m, 2H), 3,72 (s, 6H), 3,41-3,35 (m, 7H), 3,03-3,00 (m, 2H), 2,75-2,72 (m, 2H), 2,56-2,53 (m, 2H), 2,08-2,05 (m, 6H). ^{31}P -RMN (162 MHz, DMSO- d_6) δ = 67,02. ESI-LCMS: m/z 1290 $[\text{M}+\text{H}]^+$. 15,0 g (42,8%) de **10-6** foram obtidos na forma de um sólido branco e utilizados para produzir **11S** como descrito abaixo. ^1H -RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 13,05 (s, 1H), 11,26 (s, 1H), 8,63 (d, J = 24 Hz, 2H), 8.-7,96(m, 4H), 7,76 (s, 1H), 7,67-7,39 (m, 8H), 7,28-7,19 (m, 7H), 6,86 (d, J = 7,2 Hz, 4H), 6,24 (d, J = 6,4 Hz, 1H), 5,76 (s, 1H), 5,63 (s, 1H), 5,43-5,41(m, 1H), 5,12(m, 1H), 4,97(s, 1H), 4,82-4,79(m, 1H), 4,57-4,49 (m, 3H), 4,27-4,25 (m, 2H), 4,07-4,03 (m, 2H), 3,72 (s, 6H), 3,44-3,36 (m, 6H), 2,96 (m, 2H), 2,74-2,71 (m, 2H), 2,55-2,53 (m, 2H), 2,08 (s, 3H), 1,94 (s, 3H). ^{31}P -RMN (162 MHz, DMSO- d_6) δ = 66,58. ESI-LCMS: m/z 1290 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

[0166] Preparação do composto **11-1**: A uma solução de **10-5** (10,0 g, 7,7 mmoles) em 100 mL acetonitrila com uma atmosfera inerte de nitrogênio foi adicionado 0,5 M de hidrato de hidrazina (1,8 g, 37,5 mmoles) em piridina/ácido acético (3:2) a 0°C. A solução resultante foi agitada durante 0,5 h a 0°C. Então à reação foi adicionada 2,4-pentanodiona de uma vez, foi permitido que a mistura aquecesse à temperatura ambiente e agitasse durante 15 min adicionais. A solução foi diluída com DCM (500 mL) e lavada com NH_4Cl aq. sat. duas vezes e lavada com salmoura e seca sobre Na_2SO_4 . Então a solução foi concentrada sob pressão reduzida e o resíduo foi purificado por Flash-Prep-HPLC com as condições a seguir (IntelFlash-1): Coluna, C18 sílica gel; fase móvel, $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (0,5% de NH_4HCO_3) = 1/1 aumentando para $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (0,5% de NH_4HCO_3) = 1/0 dentro do período de 20 min, o produto eluído foi coletado em $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (0,5% de NH_4HCO_3)

= 1/0; Detector, UV 254 nm. Isto resultou em **11-1** (6,0 g, 65%) na forma de um sólido branco. ^1H -RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 13,13 (s, 1H), 11,28 (s, 1H), 8,63 (d, J = 20 Hz, 2H), 8,21 (d, J = 8 Hz, 2H), 8,06-7,95 (m, 3H), 7,80 (s, 1H), 7,67-7,48 (m, 8H), 7,40 (d, J = 7,6 Hz, 2H), 7,32-7,19 (m, 10H), 6,85 (m, 5H), 6,24 (d, J = 8 Hz, 1H), 6,04 (d, J = 4,0 Hz, 1H), 5,57 (s, 2H), 5,44-5,42 (m, 1H), 5,19-5,17 (m, 2H), 5,10-5,08 (m, 1H), 4,80-4,76 (m, 2H), 4,50 (d, J = 5,6 Hz, 1H), 4,37-4,32 (m, 4H), 4,06-3,99 (m, 2H), 3,81 (m, 1H), 3,72 (s, 7H), 3,40-3,36 (m, 8H), 3,03-3,00 (m, 2H), 2,05 (m, 3H). ^{31}P -RMN (162 MHz, DMSO- d_6) δ = 67,21. ESI-LCMS: m/z 1192 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

[0167] Preparação do composto **11R**: A uma solução de **11-1** (6,0 g, 5,0 mmoles) em 60 mL de diclorometano com uma atmosfera inerte de nitrogênio foram adicionados CEP[N(iPr) $_2$] $_2$ (1,9 g, 6,5 mmoles) e DCI (0,6 g, 5,0 mmoles,) em ordem à temperatura ambiente. A solução resultante foi agitada durante 1 horas à temperatura ambiente e diluída com 1000 mL de diclorometano e lavada com 2 x 250 mL de bicarbonato de sódio aquoso saturado e 1 x 250 mL de cloreto de sódio aquoso saturado respectivamente. A fase orgânica foi seca sobre sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada até que nenhum solvente residual sobrasse sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por Flash-Prep-HPLC com as condições a seguir (IntelFlash-1): Coluna, C18 sílica gel; fase móvel, CH $_3$ CN/H $_2$ O (0,5% de NH $_4$ HCO $_3$) = 1/1 aumentando para CH $_3$ CN/H $_2$ O (0,5% de NH $_4$ HCO $_3$) = 1/0 dentro do período de 20 min, o produto eluído foi coletado em CH $_3$ CN/ H $_2$ O (0,5% de NH $_4$ HCO $_3$) = 1/0; Detector, UV 254 nm. Isto resultou em **11R** (5,0 g, 70%) na forma de um sólido branco. ^1H -RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 13,10 (s, 1H), 11,28 (s, 1H), 8,20 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 8,04 (d, J = 7,2 Hz, 2H), 7,79 (d, J = 14 Hz, 2H), 7,67-7,48 (m, 6H), 7,39 (d, J = 7,2 Hz, 2H), 7,27-7,18 (m, 7H), 6,85-6,82 (m, 4H), 6,23-6,20 (m, 1H), 5,64 (d, J = 6,0 Hz, 1H), 5,44-5,41 (m, 1H), 5,08-5,07 (m, 1H), 4,82-4,77 (m, 1H), 4,56-4,46 (m, 3H), 4,36-4,30 (m, 2H), 4,22 (d, J = 7,2 Hz, 1H), 3,98 (m, 1H), 3,89 (m, 1H), 3,71 (s, 7H), 3,59-3,55

(m, 2H), 3,40-3,34 (m, 10H), 3,02-2,98 (m, 2H), 2,77-2,72 (m, 2H), 2,08-2,05 (m, 3H), 1,13-1,08 (m, 12H). ^{31}P -RMN (162 MHz, DMSO- d_6) δ = 148,71, 148,11, 67,51, 67,44. ESI-LCMS: m/z 1392 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

[0168] Preparação do composto **11-2**: A uma solução de **10-6** (10,0 g, 7,7 mmoles) em 100 mL acetonitrila com uma atmosfera inerte de nitrogênio foi adicionado 0,5 M de hidrato de hidrazina (1,8 g, 37,5 mmoles) em piridina/ácido acético (3:2) a 0°C. A solução resultante foi agitada durante 0,5 h a 0°C. Então a reação foi adicionada 2,4-pentanodiona de uma vez, foi permitido que a mistura aquecesse à temperatura ambiente e agitasse durante 15 min adicionais. A solução foi diluída com DCM (500 mL) e lavada com aq. sat. NH_4Cl duas vezes e lavada com salmoura e seca sobre Na_2SO_4 . Então a solução foi concentrada sob pressão reduzida e o resíduo foi purificado por Flash-Prep-HPLC com as condições a seguir (IntelFlash-1): Coluna, C18 sílica gel; fase móvel, $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (0,5% de NH_4HCO_3) = 1/1 aumentando para $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (0,5% de NH_4HCO_3) = 1/0 dentro do período de 20 min, o produto eluído foi coletado em $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (0,5% de NH_4HCO_3) = 1/0; Detector, UV 254 nm. Isto resultou em **11-2** (7,5 g, 80%) na forma de um sólido branco. ^1H -RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 13,11 (s, 1H), 11,26 (s, 1H), 8,63 (d, J = 20 Hz, 2H), 8,20 (d, J = 7,2 Hz, 2H), 8,15 (m, 3H), 7,73 (s, 1H), 7,66-7,47. (m, 8H), 7,41 (d, J = 7,6 Hz, 2H), 7,32-7,19 (m, 10H), 6,85 (m, 5H), 6,24 (m, 1H), 5,99 (s, 1H), 5,54 (s, H), 5,41(m, 1H), 5,10(m, 1H), 4,79-4,75(m, 1H), 4,57-4,49 (m, 3H), 4,30-4,24 (m, 4H), 4,02 (m, 2H), 3,85 (m, 1H), 3,72 (s, 7H), 3,38-3,35 (m, 7H), 2,95 (m, 2H), 1,98 (m, 3H). ^{31}P -RMN (162 MHz, DMSO- d_6) δ = 66,79. ESI-LCMS: m/z 1192 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

[0169] Preparação do composto **11S**: A uma solução de **11-2** (7,0 g, 5,0 mmoles) em 70 mL de diclorometano com uma atmosfera inerte de nitrogênio foram adicionados $\text{CEP}[\text{N}(\text{iPr})_2]_2$ (2,0 g, 6,5 mmoles) e DCI (0,6 g, 5,0 mmoles) em ordem à temperatura ambiente. A solução resultante foi

agitada durante 1 horas à temperatura ambiente e diluída com 1000 mL de diclorometano e lavada com 2 x 250 mL de bicarbonato de sódio aquoso saturado e 1 x 250 mL de cloreto de sódio aquoso saturado respectivamente. A fase orgânica foi seca sobre sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada até que nenhum solvente residual sobrasse sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por Flash-Prep-HPLC com as condições a seguir (IntelFlash-1): Coluna, C18 sílica gel; fase móvel, CH₃CN/H₂O (0,5% de NH₄HCO₃) = 1/1 aumentando para CH₃CN/H₂O (0,5% de NH₄HCO₃) = 1/0 dentro do período de 20 min, o produto eluído foi coletado em CH₃CN/ H₂O (0,5% de NH₄HCO₃) = 1/0; Detector, UV 254 nm. Isto resultou em **11S** (6,3 g, 70%) na forma de um sólido branco. ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 13,10 (s, 1H), 11,27 (s, 1H), 8,65(s, 1H), 8,61(s, 1H), 8,19 (m, 2H), 8,02 (d, *J* = 7,2 Hz, 2H), 7,76-7,73 (m, 1H), 7,66-7,47 (m, 6H), 7,40 (d, *J* = 7,2 Hz, 2H), 7,28-7,19 (m, 7H), 6,86-6,85 (m, 4H), 6,24 (d, *J* = 6,8 Hz, 1H), 5,62 (m, 1H), 5,43-5,41 (m, 1H), 5,10 (s, 1H), 4,84-4,78 (m, 1H), 4,66-4,49 (m, 3H), 4,30-4,18 (m, 3H), 4,04-3,95 (m, 2H), 3,83-3,77 (m, 1H), 3,72 (s, 7H), 3,62-3,54 (m, 2H), 3,44-3,32 (m, 6H), 2,96-2,92 (m, 2H), 2,77-2,72 (m, 2H), 1,98-1,97 (m, 3H), 1,12-1,11 (m, 12H). ³¹P-RMN (162 MHz, DMSO-d₆) δ = 148,53, 148,09, 67,04. ESI-LCMS: *m/z* 1392 [M+H]⁺.

[0170] Como nos Exemplos 175-216, o método modificado também utilizou um tempo de acoplamento mais longo (8 min) e um número maior de equivalentes de amiditas (8 equivalentes). A Tabela 10 resume o comprimento de sequência, as unidades A e C alternadas, o número e o tipo (R ou S) de ligações fosforotioato (PS) definidas estereoquimicamente e a modificação a 5' para os oligonucleotídeos modificados fosforotioados exemplificados resultantes.

TABELA 10

No.	Com prim ento	A	C	Modificação PS	modificação a 5'
21 7	(AC)1 7	2'-OMe-A	2'-OMe- (5m)C	5; 2'- OMeApsR(5m)lnC	OH
21 8	(AC)1 8	2'-OMe-A	2'-OMe- (5m)C	6; 2'- OMeAps R (5m)lnC	OH
21 9	(AC)1 9	2'-OMe-A	2'-OMe- (5m)C	6; 2'- OMeAps R (5m)lnC	OH
22 0	(AC)2 0	2'-OMe-A	2'-OMe- (5m)C	6; 2'- OMeAps R (5m)lnC	OH
22 1	(AC)2 0	2'-OMe-A	2'-OMe- (5m)C	20; 2'- OMeAps R (5m)lnC	OH
22 2	(AC)1 7	2'-OMe-A	2'-OMe- (5m)C	5; 2'- OMeAps R (5m)lnC	Vinil- fosfonato-A
22 3	(AC)1 8	2'-OMe-A	2'-OMe- (5m)C	6; 2'- OMeAps R (5m)lnC	Vinil- fosfonato-A
22 4	(AC)1 9	2'-OMe-A	2'-OMe- (5m)C	6; 2'- OMeAps R (5m)lnC	Vinil- fosfonato-A
22 5	(AC)2 0	2'-OMe-A	2'-OMe- (5m)C	6; 2'- OMeAps R (5m)lnC	Vinil- fosfonato-A
22 6	(AC)2 0	2'-OMe-A	2'-OMe- (5m)C	20; 2'- OMeAps R (5m)lnC	Vinil- fosfonato-A

No.	Com prim ento	A	C	Modificação PS	modificação a 5'
22 7	(AC)1 7	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	5; 2'-OMeAps S (5m)lnC	OH
22 8	(AC)1 8	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	6; 2'-OMeAps S (5m)lnC	OH
22 9	(AC)1 9	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	6; 2'-OMeAps S (5m)lnC	OH
23 0	(AC)2 0	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	6; 2'-OMeAps S (5m)lnC	OH
23 1	(AC)2 0	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	20; 2'-OMeAps S (5m)lnC	OH
23 2	(AC)1 7	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	5; 2'-OMeAps S (5m)lnC	Vinil-fosfonato-A
23 3	(AC)1 8	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	6; 2'-OMeAps S (5m)lnC	Vinil-fosfonato-A
23 4	(AC)1 9	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	6; 2'-OMeAps S (5m)lnC	Vinil-fosfonato-A

EXEMPLOS 235-240

[0171] O efeito de ramificação foi avaliado através da preparação de uma série de oligonucleotídeos fosforotioados que tem um projeto duplo ramificado em que dois dos oligonucleotídeos são ligados um ao outro através de um grupo de ligação. Um exemplo de um oligonucleotídeo

fosforotioado que tem um projeto duplo é ilustrado na FIG. 1. A Tabela 11 resume o comprimento de sequência, as unidades A e C alternadas e a modificação a 5' para os oligonucleotídeos fosforotioados exemplificados resultantes.

TABELA 11

No .	Comprimento	A	C	Modificação a 5'
23 5	(AC)9-(5m)lnC	LNA-A	LNA-(5m)C	5' OH, 19mer
23 6	(AC)15-(5m)lnC	LNA-A	LNA-(5m)C	5' OH, 31mer
23 7	(AC)20-(5m)lnC	LNA-A	LNA-(5m)C	5' OH, 41mer
23 8	(AC)9-(5m)mC	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	5' OH, 19mer
23 9	(AC)15-(5m)mC	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	5' OH, 31mer
24 0	(AC)20-(5m)mC	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	5' OH, 41mer

EXEMPLOS 241-246

[0172] O efeito de ramificação foi avaliado através da preparação de uma série de oligonucleotídeos fosforotioados que tem um projeto triplo ramificado em que três oligonucleotídeos fosforotioados são ligados um aos outros através de um grupo de ligação. Um exemplo de um oligonucleotídeo

fosforotioado que tem um projeto triplo é ilustrado na FIG. 2. A Tabela 12 resume o comprimento de sequência, as unidades A e C alternadas e a modificação a 5' para os oligonucleotídeos fosforotioados exemplificados resultantes.

TABELA 12

No.	Comprimento	A	C	Modificação a 5'
241	(AC)10-TREB-(5m)mC	LNA-A	LNA-(5m)C	5' OH, 31mer
242	(AC)13- TREB-(5m)mC	LNA-A	LNA-(5m)C	5' OH, 40mer
243	(AC)15- TREB-(5m)mC	LNA-A	LNA-(5m)C	5' OH, 46mer
244	(AC)10-TREB-(5m)mC	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	5' OH, 31mer
245	(AC)13- TREB-(5m)mC	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	5' OH, 40mer
246	(AC)15- TREB-(5m)mC	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	5' OH, 46mer

EXEMPLOS 247-252

[0173] O efeito da modificação de ácido nucleico com ponte de amido (AmNA-(N-Me)) e da modificação de ácido nucleico com ponte de espirociclopropileno (scp-BNA) foi avaliado através da preparação de uma série de oligonucleotídeos fosforotioados modificados. A AmNA-N-Me 6-*N*-

benzoiladenosina (A^{Bz}), a 4-*N*-benzoil -5-metil citidina foram obtidas na Luxna Biotech Co, Ltd e monômeros de scp-BNA fosforamidita com 6-*N*-benzoiladenosina (A^{Bz}), 4-*N*-benzoil-5-metil citidina foram sintetizados através da utilização do procedimento descrito nas referências Takao Yamaguchi, Masahiko Horiba e Satoshi Obika; *Chem. Commun.* 2015, 51, 9737-9740 e Masahiko Horiba, Takao Yamaguchi e Satoshi Obika; *Journal of Organic Chemistry*, 2016, 81, 11000-11008. Os monômeros foram secos em um dessecador a vácuo com dessecante (P_2O_5 , à temperatura ambiente durante 24 horas). Para as modificações de AmNA e scp-BNA, a síntese foi realizada em uma escala de 1 μ M em uma direção 3' para 5' com os monômeros de fosforamidita diluídos até uma concentração de 0,12 M em CH_3CN anidro na presença de 0,3 M de ativador 5-(benziltio)-1H-tetrazol (tempo de acoplamento 16-20 min) em um oligonucleotídeo ligado ao sólido seguido pela adição de cap modificado, oxidação e desproteção para produzir os oligonucleotídeos modificados. A eficiência do acoplamento em etapas de todas as fosforamiditas modificadas era maior que 97%. A DDTT (dimetilamino-metilideno) amino)-3H-1, 2, 4-ditiazolina-3-tiona foi utilizada como o agente de transferência de enxofre para a síntese dos fosforotioatos de oligorribonucleotídeos. Os suportes sólidos carregando os oligonucleotídeos foram lavados com solução de DEA a 20 % em acetonitrila durante 15 min então a coluna foi lavada vigorosamente com AcCN. O suporte foi aquecido a 65 °C com diisopropilamina:água:metanol (1:1:2) durante 5 h em um bloco quente para clivar do suporte e desproteger os grupos de proteção lábeis com base. A Tabela 13 resume o comprimento de sequência, as unidades A e C alternadas e a modificação a 5' para os oligonucleotídeos modificados fosforotioados exemplificados resultantes.

TABELA 13

No.	Comprimento	A	C	Modificação a 5'
247	(AmAps(5m)AmC)20	AmNA(NMe)-A	AmNA(NMe)-(5m)C	5' OH, 40mer, Tudo AmNA
248	(ScpAps(5m)scpC)20	Scp-BNA-A	Scp-BNA-(5m)C	5' OH, 40mer, Tudo Scp-BNA
249	AmAps(5m)mC(AC)19	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	Uma AmNA na extremidade a 5', 40mer
250	(AC)19-mAps(5m)AmC	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	Uma AmNA na extremidade a 3', 40mer
251	ScpAps(5m)mC(AC)19	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	Uma ScpA na extremidade a 5', 40mer
252	(AC)19-mAps(5m)ScpC	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	Uma ScpC na extremidade a 3', 40mer

EXEMPLOS 253-256

[0174] O efeito da ligação de um ligante de direcionamento foi avaliado através da preparação de uma série de oligonucleotídeos fosforotioados modificados. Os ligantes de direcionamento, colesterol e um tocoferol (vitamina E), foram ligados aos oligonucleotídeos fosforotioados através de um grupo de ligação de óxido de alquilenos (tetraetileno glicol, TEG) de acordo com os métodos descritos anteriormente nos Exemplos 1-116 exceto pelo fato de que a síntese da fase sólida foi conduzida sobre suportes de colesterol e tocoferol com ligação através de um ligante TEG para conjugação a 3' enquanto que o acoplamento final da fosforamidita forneceu os oligonucleotídeos conjugados a 5'. As FIGS. 3A-D e a Tabela 14 ilustram as estruturas e resumem o comprimento de sequência, as unidades A e C alternadas e os ligantes de direcionamento para os oligonucleotídeos modificados fosforotioados exemplificados resultantes.

TABELA 14

No.	Comprimento	A	C	Ligante de Direcionamento
253	Chol-(AC)20	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	5'-Colesterol, 40mer
254	(AC)20- Chol	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	3'-Colesterol, 40mer
255	Toco-(AC)20	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	5'-Tocoferol, 40mer
256	(AC)20-Toco	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	3'-Tocoferol, 40mer

EXEMPLOS 257-268

[0175] O efeito da ligação de um ligante de direcionamento foi avaliado através da preparação de uma série de oligonucleotídeos fosforotioados modificados. A N-acetilgalactosamina (GalNac) foi ligada aos oligonucleotídeos fosforotioados via vários grupos de ligação através da reação com um bloco de construção de GalNac como ilustrado na FIG. 4A. As GalNac-3 e GalNac-5 amiditas foram obtidas na AM Chemicals LLC e na Glen Research respectivamente. GalNac-4 e GalNac-6 foram obtidas na AM Chemicals LLC. A Tabela 15 ilustra as estruturas e resume o comprimento de sequência, as unidades A e C alternadas e ligantes de direcionamento para os oligonucleotídeos modificados fosforotioados exemplificados resultantes.

TABELA 15

No.	Comprimento	A	C	Ligante de Direcionamento
257	GalNac3ps- GalNac3ps- GalNac3po-(AC)20	2'-OMe-A	2'-OMe- (5m)C	5'-GalNac-3; 40mer
258	(AC)20-po- GalNac3ps- GalNac3ps- GalNac3	2'-OMe-A	2'-OMe- (5m)C	3'-GalNac-3; 40mer
259	GalNac3ps- GalNac3ps- GalNac3po-(AC)20	LNA-A	LNA-(5m)C	5'-GalNac-3; 40mer

No.	Comprimento	A	C	Ligante de Direcionamento
260	(AC)20-po-GalNAc3ps-GalNAc3ps-GalNAc3	LNA-A	LNA-(5m)C	3'-GalNAc-3; 40mer
261	GalNAc4ps-GalNAc4ps-GalNAc4po-(AC)20	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	5'-GalNAc-4; 40mer
262	(AC)20-po-GalNAc4ps-GalNAc4ps-GalNAc4	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	3'-GalNAc-4; 40mer
263	GalNAc4ps-GalNAc4ps-GalNAc4po-(AC)20	LNA-A	LNA-(5m)C	5'-GalNAc-4; 40mer
264	(AC)20-po-GalNAc4ps-GalNAc4ps-GalNAc4	LNA-A	LNA-(5m)C	3'-GalNAc-4; 40mer
265	GalNAc5ps-GalNAc5ps-GalNAc5po-(AC)20	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	5'-GalNAc-5; 40mer

No.	Comprimento	A	C	Ligante de Direcionamento
266	(AC)20-po-GalNAc5ps-GalNAc5ps-GalNAc5	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	3'-GalNAc-5; 40mer
267	GalNAc5ps-GalNAc5ps-GalNAc5po-(AC)20	LNA-A	LNA-(5m)C	5'-GalNAc-5; 40mer
268	(AC)20-po-GalNAc5ps-GalNAc5ps-GalNAc5	LNA-A	LNA-(5m)C	3'-GalNAc-5; 40mer

EXEMPLOS 269-272

[0176] O efeito da ligação de um ligante de direcionamento foi avaliado através da preparação de uma série de oligonucleotídeos fosforotioados modificados. A N-acetilgalactosamina (GalNAc) foi ligada aos oligonucleotídeos fosforotioados via um grupo de ligação através da preparação dos oligonucleotídeos de partida, da formação de um precursor através de ligação de um grupo de ligação C₆-NH₂ no 5'-terminal e então da reação do precursor com um éster de GalNAc. As sequências foram sintetizadas na escala de 10 µmoles utilizando suporte universal (Carga de 65 µmoles/g). O ligante C₆-NH₂ foi ligado ao 5'-terminal para formar o precursor através da reação com 6-(4-monometoxitritilamino)hexil-(2-cianoetil)-(N, N-diisopropil)-fosforamidita em 0,1 M de acetonitrila teve um

tempo de acoplamento de 10 min. Os suportes sólidos carregando oligonucleotídeo fosforotioado foram aquecidos à temperatura ambiente com solução aquosa de amônia/metilamina (1:1) durante 3 h em um agitador para clivar do suporte e desproteger os grupos de proteção lábeis com base.

[0177] Após a purificação IEX e a dessalinização, os precursores foram dissolvidos em tampão bicarbonato de sódio a 0,2 M, pH 8,5 (0,015 mM) e 5-7 equivalentes molares de éster de GalNAc dissolvidos em DMSO foram adicionados. As estruturas dos ésteres de GalNAc são ilustradas na FIG. 4B. A mistura de reação foi agitada à temperatura ambiente durante 4 h. A amostra foi analisada para confirmar a ausência de precursor. A esta amônia aquosa (28% em peso) foi adicionada (5× volume de reação) e agitada à temperatura ambiente durante 2-3 h. A mistura de reação foi concentrada sob pressão reduzida e o resíduo resultante foi dissolvido em água e purificado por HPLC em uma coluna de troca aniônica forte.

[0178] A Tabela 16 ilustra as estruturas e resume o comprimento de sequência, as unidades A e C alternadas e os ligantes de direcionamento para os oligonucleotídeos modificados fosforotioados exemplificados resultantes. GalNAc-1 e GalNAc-2 foram preparados de acordo com os procedimentos descritos em *J. Med. Chem.* 2016 59(6) 2718-2733 e WO 2017/021385A1, respectivamente.

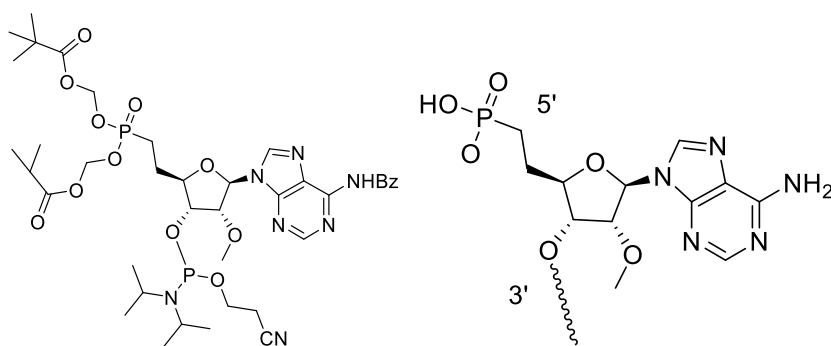
TABELA 16

No.	Comprimento	A	C	Ligante de Direcionamento
269	GalNAc1-NH-C6-po-(AC)20	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	5'-GalNAc-1; 40mer

No.	Comprimento	A	C	Ligante de Direcionamento
270	GalNAc1-NH-C6-po-(AC)20	LNA-A	LNA-(5m)C	5'-GalNAc-1; 40mer
271	GalNAc2-NH-C6-po-(AC)20	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	5'-GalNAc-2; 40mer
272	GalNAc2-NH-C6-po-(AC)20	LNA-A	LNA-(5m)C	5'-GalNAc-2; 40mer

EXEMPLOS 273-281

[0179] O efeito da modificação a 5' foi avaliado através da preparação de uma série de oligonucleotídeos fosforotioados de acordo com os métodos descritos anteriormente, exceto pelo fato de que o bloco de construção de fosfonato de 5'-etila (EP) a seguir foi utilizado para incorporar *endcaps* de fosfonato de 5'-etila:



Bloco de construção de fosfonato de 5'-etila (5'-EP) *Endcap* de fosfonato de 5'-etila

[0180] Com referência à FIG. 5, o bloco de construção de fosfonato de

5'-etila foi preparado como a seguir:

[0181] A uma mistura de **5-1** (3,0 g, 4,35 mmoles, 1 *eq*) em MeOH (5 mL) foi adicionado Pd/C (900 mg, 72,50 μ moles, 10% de pureza) sob N₂. A suspensão foi degaseificada a vácuo e purgada com H₂ várias vezes. A mistura foi agitada sob H₂ (15 psi) a 20 °C durante 12 h. ¹H RMN e ³¹P RMN mostraram que o **5-1** foi consumido completamente para formar o produto desejado. A mistura de reação foi filtrada e concentrada para fornecer 2,2-dimetilpropanoato de [2-[(2R,3R,4R,5R)-5-(6-benzamidopurin-9-il)-3-hidróxi-4-metóxi-tetrahidrofuran-2-il]etil-(2,2-dimetilpropanoilo)oximetóxi]fosforil]oximetila, composto **5-2**, (2,8 g, 4,05 mmoles, 93,06% de rendimento) na forma de um sólido branco, ¹H RMN (400 MHz, CD₃OD) δ = 8,75 (s, 1H), 8,53 (s, 1H), 8,08 (d, *J*=7,5 Hz, 2H), 7,68 - 7,61 (m, 1H), 7,59 - 7,50 (m, 2H), 7,23 - 7,17 (m, 1H), 7,15 - 7,10 (m, 1H), 6,15 (d, *J*=4,2 Hz, 1H), 5,71 - 5,61 (m, 4H), 4,57 (t, *J*=4,7 Hz, 1H), 4,41 (t, *J*=5,3 Hz, 1H), 4,09 - 3,99 (m, 1H), 3,49 (s, 3H), 2,16 - 1,97 (m, 4H), 1,17 (d, *J*=3,5 Hz, 18 H); ³¹P RMN (162 MHz, CD₃CN) δ = 32,91 (s, 1P).

[0182] A uma solução de **5-2** (2,3 g, 3,33 mmoles, 1 *eq*) em DCM (30 mL) foi adicionada 1H-imidazol-4,5-dicarbonitrila (589,06 mg, 4,99 mmoles, 1,5 *eq*) seguida por 3-bis(diisopropilamino)fosfaniloxipropanonitrila (2,00 g, 6,65 mmoles, 2,11 mL, 2,0 *eq*) e a mistura foi agitada a 25 °C durante 2 h. A TLC indicou que a maior parte do **5-2** foi consumida e um novo ponto importante foi formado. A mistura de reação foi lavada com H₂O (50 mL*2) e salmoura (50 mL*2), seca sobre Na₂SO₄ e concentrada para fornecer um resíduo. O resíduo foi purificado por coluna Flash-C-18 utilizando as condições a seguir: Coluna, C18 sílica gel; fase móvel, água e acetonitrila (0%-70% acetonitrila) para fornecer 2,2-dimetilpropanoato de [2-[(2R,3R,4R,5R)-5-(6-benzamidopurin-9-il)-3-[2-cianoetóxi-(diisopropilamino)fosfanil]óxi-4-metóxi-tetrahidrofuran-2-il]etil-(2,2-

dimetilpropanoiloimetóxi)fosforil]oximetila, (bloco de construção de **5'-EP**), (1,4 g, 1,53 mmol, 45,88% de rendimento, 97,2% de pureza) na forma de um sólido amarelo claro. LCMS (ESI): RT = 3,785 min, m/z calculado para C₄₀H₆₀N₇O₁₂P₂ 892,37 [M+H]⁺, encontrado 892,0. HPLC: Fase móvel: 10mMol de NH₄Ac em água (solvente C) e acetonitrila (solvente D), **sing** o gradiente de eluição 80%-100% (solvente D) ao longo de 10 minutos e reter a 100% durante 5 minutos a uma vazão de 1,0 mL/minuto; Coluna30: Waters Xbridge C18 3,5um,150*4,6mm; ¹H RMN (400MHz, CD₃CN) δ = δ = 9,40 (s, 1H), 8,67 (s, 1H), 8,27 (d, J=1,8 Hz, 1H), 8,01 (d, J=7,5 Hz, 2H), 7,68 - 7,60 (m, 1H), 7,58 - 7,52 (m, 2H), 6,05 (dd, J=5,1, 8,4 Hz, 1H), 5,62 - 5,54 (m, 4H), 4,68 (t, J=1,8, 5,0 Hz, 1H), 4,64 - 4,55 (m, 1H), 4,25 - 4,11 (m, 1H), 3,93 - 3,66 (m, 4H), 3,40 (d, J=19,2 Hz, 3H), 2,75 - 2,67 (m, 2H), 2,14 - 1,95 (m, 4H), 1,25 - 1,20 (m, 12H), 1,15 - 1,11 (m, 18H); ³¹P RMN (162MHz, CD₃CN) δ = 149,95 , 149,27, 32,29, 32,05.

[0183] A Tabela 17 resume o comprimento de sequência, as unidades A e C alternadas, o número e o tipo (R ou S) de ligações fosforotioato (PS) definidas estereoquimicamente e modificação LNA para os oligonucleotídeos fosforotioados modificados com adição de *endcap* de 5'-EP exemplificados resultantes.

TABELA 17

No	Comp rimen to	A	C	Modificação PS	Comentários
27 3	(AC)2 0	2'O-Me-A	2'-OMe- (5m)C	PS	40mer
27	(AC)2	LNA-A	LNA-(5m)C	PS	40mer

4	0				
27 5	(AC)2 0	2'-OMe-A	2'-OMe- (5m)C	20; 2'- OMeAps R (5m)lnC	isômero 20 R, 41mer
27 6	(AC)2 0	2'-OMe-A	2'-OMe- (5m)C	19; 2'- OMeAps R (5m)lnC	isômero 19 R, 40mer
27 7	(AC)2 0	2'-OMe-A	LNA-(5m)C	PS	40mer 2'-OMe/LNA Alternados
27 8	(AC)2 0	2'-OMe-A LNA-A	2'-OMe- (5m)C LNA-(5m)C	PS	Cada 3ª base é LNA
27 9	(AC)2 0	2'-OMe-A	2'-OMe- (5m)C LNA-(5m)C	PS	Cada 4ª base é LNA
28 0	(AC)2 0	2'-OMe-A	2'-OMe- (5m)C LNA-(5m)C	PS	5 LNA no meio
28 1	(AC)2 0	2'-OMe-A LNA-A	2'-OMe- (5m)C LNA-(5m)C	PS	10 LNA no meio

EXEMPLOS 282-298

[0184] A FIG. 6A descreve os compostos nos. 282-295, que foram preparados de acordo com os métodos descritos anteriormente.

EXEMPLOS 296-304

[0185] O efeito de comprimento de sequência, incorporação de LNA e incorporação de RNA foi avaliado através da preparação de uma série de oligonucleotídeos fosforotioados de acordo com os métodos descritos anteriormente. Os resultados são resumidos na Tabela 18.

TABELA 18

No.	Comprimento	A	C	Modificação RNA
296	(AC)20	2'-OMe-A	LNA-(5m)C	5 RNA
297	(AC)20	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	7 RNA
298	(AC)20	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	14 RNA
299	(AC)15	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	5 RNA
300	(AC)15	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	10 RNA
301	(AC)20	LNA-A	LNA-(5m)C	7 RNA
302	(AC)20	LNA-A	LNA-(5m)C	14 RNA
303	(AC)15	LNA-A	LNA-(5m)C	5 RNA
304	(AC)15	LNA-A	LNA-(5m)C	10 RNA

EXEMPLOS 305-313

[0186] O efeito de comprimento de sequência, incorporação de LNA e estrutura foi avaliado através da preparação de uma série de oligonucleotídeos fosforotioados de acordo com os métodos descritos anteriormente. Os resultados são resumidos na Tabela 19.

TABELA 19

No.	Comprimento	A	C	Estrutura
305	(AC)20	LNA-A	LNA-(5m)C	40mer; 20 PO; 19 PS
306	(AC)20	LNA-A	LNA-(5m)C	40mer; 7 PO; 32 PS
307	(AC)20	LNA-A	LNA-(5m)C	40mer; 14 PO; 25 PS
308	(AC)15	LNA-A	LNA-(5m)C	30mer; 5 PO; 24 PS
309	(AC)15	LNA-A	LNA-(5m)C	30mer; 10 PO; 19 PS
310	(AC)20	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	40mer; 7 PO; 32 PS
311	(AC)20	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	40mer; 14 PO; 25 PS
312	(AC)15	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	30mer; 5 PO; 24

				PS
313	(AC)15	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	30mer; 10 PO; 19 PS

EXEMPLOS 314-322

[0187] O efeito de comprimento de sequência, incorporação de LNA e *endcap* de fosfonato de etila foi avaliado através da preparação de uma série de oligonucleotídeos fosforotioados de acordo com os métodos descritos anteriormente. Os resultados são resumidos na Tabela 20.

TABELA 20

No.	Comprimento	A	C	Modificação
314	(AC)20	2'-OMe-A	LNA-(5m)C	Fosfonato de etila-A
315	(AC)20	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	19 R bloco de dímero; Fosfonato de etila-A
316	(AC)20	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	5 LNA, Fosfonato de etila-A
317	(AC)20	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C LNA-(5m)C	40mer; Cada 4 ^a base é LNA Fosfonato de etila-A
318	(AC)20	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	40mer; Cada 3 ^a base é LNA

			LNA-(5m)C	Fosfonato de etila-A
319	(AC)20	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	40mer; Fosfonato de etila-A
320	(AC)18	2'-OMe-A	LNA-(5m)C	36mer; 2'-OMe e LNA Alternados
321	(AC)20	2'-OMe-A LNA-A	2'-OMe-(5m)C LNA-(5m)C	36mer; Cada 3ª base é LNA
322	(AC)20	2'-OMe-A	LNA-(5m)C	36mer; Cada 4ª base é LNA

EXEMPLOS 323-324

[0188] O efeito de incorporação de LNA e *endcap* de fosfato foi avaliado através da preparação de oligonucleotídeos fosforotioados de acordo com os métodos descritos anteriormente. Os resultados são resumidos na Tabela 21.

TABELA 21

No.	Comprimento	A	C	<i>Endcap</i>
323	(AC)20	LNA-A	LNA-(5m)C	5'-Fosfato
324	(AC)20	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	5'-Fosfato

EXEMPLOS 325-338

[0189] O efeito do nível de incorporação de LNA foi avaliado através da preparação de uma série de oligonucleotídeos fosforotioados de acordo com os métodos descritos anteriormente. Os resultados são resumidos na Tabela 22.

TABELA 22

No.	Comprimento	A	C	Modificação
325	(AC)20	2'-OMe-A LNA-A	2'-OMe-(5m)C LNA-(5m)C	40mer; 75% de 2'-OMe, 25% de LNA
326	(AC)20	2'-OMe-A LNA-A	2'-OMe-(5m)C LNA-(5m)C	40mer; 67,5% de 2'-OMe 37,5% de LNA
327	(AC)20	2'-O-MOE-A LNA-A	2'-O-MOE-(5m)C LNA-(5m)C	40mer; 75% de 2'-O-MOE, 25% de LNA
328	(AC)20	2'-O-MOE-A LNA-A	2'-O-MOE-(5m)C LNA-(5m)C	40mer; 67,5% de 2'-O-MOE 37,5% de LNA
329	(AC)20	2'-OMe-A LNA-A	2'-OMe-(5m)C LNA-(5m)C	40mer; 75% de LNA, 25% de 2'-OMe (bloco de 10mer)

No.	Comprimento	A	C	Modificação
330	(AC)20	2'-OMe-A LNA-A	2'-OMe-(5m)C LNA-(5m)C	40mer; 50% de LNA; 50% de 2'-OMe(bloco de 20mer)
331	(AC)20	2'-O-MOE-A LNA-A	2'-O-MOE-(5m)C LNA-(5m)C	40mer; 75% de LNA, 25% de 2'-O-MOE (bloco de 10mer)
332	(AC)20	2'-O-MOE-A LNA-A	2'-O-MOE-(5m)C LNA-(5m)C	40mer; 50% de LNA; 50% de 2'-O-MOE (bloco de 20mer)
333	(AC)20	LNA-A DNA-A	LNA-(5m)C DNA-(5m)C	40mer; 7 DNA
334	(AC)20	LNA-A DNA-A	LNA-(5m)C DNA-(5m)C	40mer; 14 DNA
335	(AC)20	LNA-A DNA-A	LNA-(5m)C DNA-(5m)C	30mer; 5 DNA
336	(AC)20	LNA-A DNA-A	LNA-(5m)C DNA-(5m)C	30mer; 10 DNA
337	(AC)20	LNA-A DNA-A	LNA-(5m)C DNA-(5m)C	40mer; 50% de LNA; 50% de DNA (bloco de DNA de 10mer)

No.	Comprimento	A	C	Modificação
338	(AC)20	LNA-A DNA-A	LNA-(5m)C DNA-(5m)C	40mer; 50% de LNA; 50% de DNA (bloco de DNA de 20mer)

EXEMPLOS 339-340

[0190] O efeito da incorporação de ScpA e AmNA foi avaliado através da preparação de oligonucleotídeos fosforotioados de acordo com os métodos descritos anteriormente. Os resultados são resumidos na Tabela 23.

TABELA 23

No.	Compri mento	A	C	Modificação
339	(AC)20	2'-OMe-A	LNA-(5m)C	Uma ScpA na extremidade a 3', 40mer
340	(AC)20	2'-OMe-A	LNA-(5m)C	Uma AmNA na extremidade a 3', 40mer

EXEMPLOS 341-346

[0191] O efeito da incorporação de GNA e UNA foi avaliado através da preparação de uma série de oligonucleotídeos fosforotioados de acordo com os métodos descritos anteriormente. Os resultados são resumidos na Tabela 24.

TABELA 24

No.	Comprimento	A	C
341	(AC)20	LNA-A	GNA-(5m)C
342	(AC)20	GNA-A	2'-OMe-(5m)C
343	(AC)20	2'-OMe-A	GNA-(5m)C
345	(AC)20	UNA-A	UNA-(5m)C
346	(AC)20	UNA-A	UNA-(5m)C

EXEMPLOS 347-350

[0192] O efeito da ligação de um ligante de direcionamento foi avaliado através da preparação de uma série de oligonucleotídeos fosforotioados modificados de acordo com os métodos descritos anteriormente. Os resultados são resumidos na Tabela 25.

TABELA 25

No.	Comprimento	A	C	Modificação
347	GalNAc5ps- GalNAc5ps- GalNAc5po- (AC)20	2'-OMe- A	LNA- (5m)C	40mer, 2'-OMe-LNA alternado; 5'-GalNac
348	GalNAc5ps- GalNAc5ps- GalNAc5po- (AC)20	2'-OMe- A	2'-OMe- (5m)C LNA- (5m)C	40mer, cada 4ª base é LNA; 5'-GalNac

No.	Comprimento	A	C	Modificação
349	GalNAc5ps- GalNAc5ps- GalNAc5po- (AC)20	2'-OMe- A	2'-OMe- (5m)C LNA-A	40mer, 5 LNA; 5'- GalNac
350	GalNAc5ps- GalNAc5ps- GalNAc5po- (AC)20	2'-OMe- A	LNA- (5m)C	40mer, 2'-OMe-LNA 5 RNA alternados; 5'- GalNac

EXEMPLOS 351-355

[0193] O efeito da ligação de um ligante de direcionamento de colesterol ou tocoferol foi avaliado através da preparação de uma série de oligonucleotídeos fosforotioados modificados de acordo com os métodos descritos anteriormente. Os resultados são resumidos na Tabela 26.

TABELA 26

No.	Comprimento	A	C	Ligante de Direcionamento
351	Chol-(AC)20	2'-OMe-A	(5m)- Propargil-C	3'-Colesterol, 40mer
352	(AC)20- Chol	2'-OMe-A	(5m)- Propargil-C	3'-Palmitoil, 40mer
353	(AC)20	3'-OMe-A	3'-OMe- (5m)C	3'-OMe, 40mer

No.	Comprimento	A	C	Ligante de Direcionamento
354	(AC)20- Chol	3'-OMe-A	3'-OMe-(5m)C	3'-colesterol, 40mer
355	(AC)20- Toco	3'-OMe-A	3'-OMe-(5m)C	3'-Tocoferol, 40mer

EXEMPLOS 356-358

[0194] O efeito da estrutura de *endcap* (metila, alila, citosina) foi avaliado através da preparação de oligonucleotídeos fosforotioados de acordo com os métodos descritos anteriormente. Os resultados são resumidos na Tabela 27.

TABELA 27

No.	Comprimento	A	C	<i>Endcap</i>
356	(AC)20	2'-OMe-A	LNA-(5m)C	40mer, 4'-Me na extremidade a 5'
357	(AC)20	2'-OMe-A 3'-C-allil-A	LNA-A LNA-(5m)C	40mer, 5 3'-C-alil-A
358	(AC)20	LNA-A	LNA-(5m)C	40mer, Cy-5 na extremidade a 3'

EXEMPLOS 359-362

[0195] O efeito da inclusão de bases G e U bases foi avaliado através da preparação de oligonucleotídeos fosforotioados de acordo com os métodos descritos anteriormente. Os compostos são resumidos na Tabela 28.

TABELA 28

No.	Compri mento	Base 1	Base 2	Modificação
359	(AG)20	2'-OMe-A	2'-OMe-G	repetição AG
360	(GA)20	2'-OMe-G	2'-OMe-A	repetição GA
361	(CA)20	2'-OMe- (5m)C	2'-OMe-A	repetição CA
362	(AU)20	2'-OMe-A	2'-OMe-U	repetição AU

EXEMPLOS 363-376

[0196] O efeito de comprimento de sequência foi avaliado através da preparação de uma série de oligonucleotídeos fosforotioados de acordo com os métodos descritos anteriormente. Os compostos são resumidos na Tabela 29.

TABELA 29

No.	Comprimento	A	C	Modificação
363	(AC)14	2'-OMe-A	2'-OMe-C	28mer
364	(AC)15-A	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	31mer

No.	Comprimento	A	C	Modificação
365	(AC)17	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	34mer
366	(AC)18-A	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	37mer
367	(AC)20	2'-OMe-A	2'-OMe-C	20mer
368	(AC)9	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	18mer
369	(AC)9-A	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	19mer
370	(AC)10	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	20mer
371	(AC)9-A	LNA-A	LNA-(5m)C	19mer
372	(AC)9	LNA-A	LNA-(5m)C	18mer
373	(AC)15	LNA-A	LNA-(5m)C	30mer
374	(AC)12-A	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	25mer
375	(AC)20	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	40mer, isômeros 5 S
376	(AC)10	LNA-A	LNA-(5m)C	20 mer

EXEMPLOS 377-380 E 384

[0197] O efeito da incorporação de RNA foi avaliado através da preparação de uma série de oligonucleotídeos fosforotioados de acordo com os métodos descritos anteriormente. Os resultados são resumidos na Tabela 30.

TABELA 30

No.	Comprimento	A	C	Modificação
377	(AC)20	2'-OMe-A Ribo-A	LNA-(5m)C	40mer, 4 RNA
378	(AC)20	2'-OMe-A Ribo-A	LNA-(5m)C	40mer, 3 RNA
379	(AC)20	2'-OMe-A Ribo-A	LNA-(5m)C	40mer, 2 RNA
380	(AC)20	2'-OMe-A UNA-A	2'-OMe-(5m)C UNA-(5m)C	40mer, blocos de 4mer de 2'-OMe e UNA
384	(AC)20	2'-OMe-A Ribo-A	LNA-(5m)C	40mer, 1 RNA

EXEMPLOS 381-383

[0198] O efeito da incorporação de 4etl (4-etil-LNA) foi avaliado através da preparação de uma série de oligonucleotídeos fosforotioados de acordo com os métodos descritos anteriormente. Os monômeros de 4etl foram preparados de acordo com métodos conhecidos (Seth, P.P., J. Org. Chem. 2010, 75, (5), 1569–1581). Os resultados são resumidos na Tabela 31.

TABELA 31

No.	Comprimento	A	C	Modificação
381	(AC)20	4etl-A	4etl-(5m)C	40mer, 100% de 4etl
382	(AC)20	2'-OMe-A	4etl-(5m)C	40mer, 50% de 4etl
383	(AC)20	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C 4etl-(5m)C	40mer, 25% de 4etl

EXEMPLOS 385-389

[0199] O efeito da incorporação de nmLNA (N-metil LNA) A e C foi avaliado através da preparação de uma série de oligonucleotídeos fosforotioados de acordo com os métodos descritos anteriormente. Os monômeros de nmLNA foram obtidos de fornecedores comerciais (Bio-Synthesis Inc., Lewisville, TX). Os resultados são resumidos na Tabela 32.

TABELA 32

No.	Comprimento	A	C	Modificação
385	(AC)20	2'-OMe-A nmLNA-A	LNA-(5m)C	40mer, 1 nmLNA
386	(AC)20	2'-OMe-A nmLNA-A	LNA-(5m)C	40mer, 3 nmLNA

No.	Comprimento	A	C	Modificação
387	(AC)20	2'-OMe-A nmLNA-A	LNA-(5m)C nmLNA (5m)- C	40mer, 3 nmLNA
388	(AC)20	2'-OMe-A	LNA-(5m)C nmLNA (5m)- C	40mer, 3 nmLNA
389	(AC)20	2'-OMe-A nmLNA-A	LNA-(5m)C nmLNA (5m)- C	40mer, 4 nmLNA

EXEMPLOS 390-392

[0200] O efeito da incorporação de AmNA e Scp-BNA A e C foi avaliado através da preparação de uma série de oligonucleotídeos fosforotioados de acordo com os métodos descritos anteriormente. Os resultados são resumidos na Tabela 33 (ver também a Tabela 23).

TABELA 33

No.	Comprimento	A	C	Modificação
390	(AC)20	2'-OMe-A	AmNA-(5m)C	40mer, 20 AmNA(50%)

No.	Comprimento	A	C	Modificação
391	(AC)20	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C Scp-(5m)C	40mer, 10 scp-BNA (25%)
392	(AC)20	2'-OMe-A Scp-A	2'-OMe-(5m)C	40mer, 5 scp-BNA (12,5%)

EXEMPLO B1

ENSAIO DE SECREÇÃO DE HBSAG E ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

[0201] A atividade antiviral independente da sequência contra hepatite B (que é determinada através do Ensaio de Secreção de HBsAg) e a citotoxicidade de um número de compostos oligonucleotídicos modificados exemplificados foram determinadas como descrito abaixo e resumido nas Tabelas 34-35 e nas FIGS. 6A e 6B.

Protocolo de Ensaio de Liberação de HBsAgCultura de Células

[0202] As células HepG2.2.15 foram mantidas em meio DMEM com 10% de soro fetal bovino (FBS) e 1% de penicilina/estreptomicina, 1% de Glutamina, 1% de aminoácidos não essenciais, 1% de Piruvato de Sódio e 380 ug/mL de G418. As células foram mantidas a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂.

Ensaio de Secreção de HBsAg

[0203] As células HepG2.2.15 foram crescidas em meio DMEM como descrito anteriormente. As células foram plaqueadas a uma concentração de 45.000 células/poço em placas de 96 poços revestidas com colágeno I.

Imediatamente após a adição das células, os compostos de teste foram adicionados.

[0204] Compostos selecionados também podem ser testados após a transfecção com Lipofectamine® RNAiMAX. O Reagente de Transfecção Lipofectamine® RNAiMAX (Thermo Fisher) é utilizado seguindo as instruções do fabricante.

[0205] A concentração inibidora de 50% (EC₅₀) e a concentração citotóxica de 50% (CC₅₀; abaixo) foram avaliadas através da solubilização em 1 X PBS a 100 X a concentração de teste final desejada. Cada composto foi então diluído em série (1:3) até 8 concentrações distintas até 10X a concentração de teste final desejada em meio DMEM com 10% de FBS. Uma amostra de 10 µL dos compostos 10X no meio de cultura de células foi utilizada para tratar as células HepG2.2.15 em um formato de 96 poços. As células foram incubadas inicialmente com os compostos durante 3 dias a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂.

[0206] Três dias após a adição do composto/transfecção substituir o meio e o composto por meio/composto novo com RNAiMax e incubar durante mais 3 dias para um tempo de incubação total de 6 dias. Coletar tanto o sobrenadante de células quanto o lisado de células (ver abaixo) para quantificação de HbsAg.

[0207] O HBsAg secretado foi medido quantitativamente utilizando o kit de ELISA para HBsAg (Autobio-CL0310).

[0208] A EC₅₀, a concentração do fármaco necessária para reduzir a secreção de HBsAg em 50% em relação ao valor de controle de células não tratadas foi calculada partindo da representação gráfica da porcentagem de redução do nível de HBsAg contra as concentrações do fármaco utilizando Microsoft Excel (função forecast).

[0209] Montar um conjunto de placas paralelas que serão utilizadas para testar a citotoxicidade celular induzida pelo composto (ver abaixo).

Ensaio de Citotoxicidade

[0210] As células HepG2.2.15 foram cultivadas e tratadas como descrito anteriormente. No Dia 6, a citotoxicidade celular foi avaliada utilizando um ensaio de proliferação de células (CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay; Promega) de acordo com as instruções do fabricante ou uma alternativa adequada.

[0211] A CC₅₀, a concentração do fármaco necessária para reduzir a viabilidade celular em 50% em relação ao valor de controle de células não tratadas foi calculada partindo da representação gráfica da porcentagem de redução de células viáveis contra as concentrações de fármaco utilizando Microsoft Excel (função forecast).

TABELA 34 – POTÊNCIA E CITOTOXICIDADE

Composto No.	EC₅₀ (µM)	CC₅₀ (µM)
3	B	A
6	A	B
8	B	A
9	A	A
10	A	A
12	A	A
13	B	A

Composto No.	EC₅₀ (μM)	CC₅₀ (μM)
18	C	A
20	B	B
23	B	B
26	C	A
34	B	A
36	B	A
38	A	A
39	B	C
44	A	A
45	A	A
63	B	A
97	B	A
98	B	A
99	B	A
105	B	A
106	B	A
120	C	A

Composto No.	EC₅₀ (μM)	CC₅₀ (μM)
121	B	A
122	B	A
127	B	A
128	D	A
129	D	A
130	B	A
134	A	A
142	C	A
147	D	A
148	D	A
149	B	A
150	A	A
151	D	A
152	D	A
153	B	A
158	B	A
159	C	A

Composto No.	EC₅₀ (μM)	CC₅₀ (μM)
178	A	A
179	A	A
180	A	A
182	A	A
183	A	A
184	A	A
190	B	A
191	B	A
192	A	A
199	B	A
200	C	A
201	B	A
202	B	A
204	B	A
205	B	A
220	C	A
221	A	A

Composto No.	EC₅₀ (μM)	CC₅₀ (μM)
223	C	A
235	D	B
236	D	B
237	A	B
238	D	A
239	D	A
240	B	A
241	B	A
242	A	A
243	A	A
244	C	A
245	D	A

[0212] Potência: **A:** ≥ 5 vezes maior que (2'-OMe-A; 2'-OMe-C); **B:** ≥ 2 vezes maior que (2'-OMe-A; 2'-OMe-C) e < 5 vezes maior que (2'-OMe-A; 2'-OMe-C); **C:** maior ou igual a (2'-OMe-A; 2'-OMe-C) e < 2 vezes maior que (2'-OMe-A; 2'-OMe-C); **D:** menor que (2'-OMe-A; 2'-OMe-C).

[0213] Citotoxicidade: **A:** $\geq 2 \mu\text{M}$; **B:** $< 2 \mu\text{M}$

TABELA 35 – POTÊNCIA E CITOTOXICIDADE

Composto No.¹	EC₅₀	CC₅₀
6, 274, 283	A	B
376	D	A
371	D	A
372	D	A
273, 282	D	A
367	C	A
368	D	A
369	D	A
370	D	A
345	B	A
346	A	A
351	D	B
352	D	B
373	B	B
308	C	A
239	D	A
235	D	B
236	D	B

Composto No.¹	EC₅₀	CC₅₀
237	A	B
301	A	B
303	B	B
305	C	A
315	C	A
309	D	B
297	C	A
298	D	A
300	D	A
312	D	A
313	D	A
299	D	A
304	D	A
302	D	A
307	D	A
375	B	A
201	C	A
202	C	A

Composto No.¹	EC₅₀	CC₅₀
203	B	A
204	D	A
205	D	A
353	B	A
351	D	A
352	D	A
178	A	A
179	A	A
180	C	A
182	A	A
183	D	A
184, 290	A	A
177	B	A
374	D	A
363	D	A
364	D	A
365	D	A
366	D	A

Composto No.¹	EC₅₀	CC₅₀
238	D	A
240	B	A
241	B	A
242	A	A
243	A	A
130	A	A
380	D	A
310	D	A
311	D	A
254	D	A
325	D	A
326	D	A
327	D	A
328	D	A
158	B	A
150	A	A
159	C	A
341	D	A

Composto No.¹	EC₅₀	CC₅₀
342	B	A
244	C	A
245	C	A
343	B	A
329	C	A
330	B	B
331	D	A
332	D	A
333	B	A
334	B	A
335	C	A
336	C	A
337	A	B
338	B	B
117	B	A
118	B	A
134, 277, 284	A	A
142	C	A

Composto No.¹	EC₅₀	CC₅₀
190	B	A
191	B	A
192	B	A
210	B	A
211	B	A
212	B	A
218	C	A
223	C	A
221	A	A
127	D	A
128	C	A
129	C	A
120	B	A
121	B	A
122	A	A
181	C	A
147	D	A
148	D	A

Composto No.¹	EC₅₀	CC₅₀
149	B	A
151	D	A
152	D	A
153	B	A
294	B	A
276, 291	A	A
275, 295	A	B
173, 293	A	A
165, 287	B	A
167, 289	B	A
164, 286	C	A
166, 288	A	A
171, 280, 292	B	A
314	A	B
281, 316	A	A
296	A	A
285	A	B
251	A	A

Composto No.¹	EC₅₀	CC₅₀
356	A	A
320	A	A
321	A	B
322	B	A
317	A	B
318	B	B
319	A	B
357	A	A
339	A	A
252	A	A
340	A	A
250	A	A
359	D	A
360	D	A
361	D	A
362	D	A
12	A	A
20	B	A

Composto No.¹	EC₅₀	CC₅₀
38	A	A
385	A	A
386	A	A
387	A	A
388	A	A
389	A	A
376	A	A
377	A	A
378	A	A
379	A	A
384	A	A
381	A	A
382	A	A
383	B	A
390	A	B
391	A	B
392	B	B

[0214] ¹ Um número de compostos descritos aqui é referido por mais

de um único composto no. como indicado aqui e em outro local ao longo de toda esta divulgação.

[0215] Potência: A: $EC_{50} < 30$ nM; B: $EC_{50} \geq 30$ nM e $EC_{50} < 100$ nM; C: $EC_{50} \geq 100$ nM e $EC_{50} < 300$ nM; D: $EC_{50} > 300$ nM.

[0216] Citotoxicidade: **A:** $CC_{50} \geq 1000$ nM; **B:** $CC_{50} < 1000$ nM

EXEMPLO B2

ENSAIO DE INFECÇÃO *IN VIVO*

[0217] As células HepG2-NTCP foram mantidas em meio DMEM/F12 com 10% de soro fetal bovino (FBS) e 1% de penicilina/estreptomicina, 1% de Glutamina, 1% de aminoácidos não essenciais, 1% de Piruvato de Sódio. As células foram mantidas a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂.

[0218] As células HepG2-NTCP foram ressuspensas com o meio mencionado acima e plaqueadas a uma concentração de 15.000 células/poço em placas de 96 poços revestidas com colágeno I. No segundo dia (dia 0), as células foram infectadas com HBV (HBV purificado de células HepAD38) a 200 moi (ge) na presença de 4% de PEG8000 e 2% de DMSO e incubadas a 37°C durante toda a noite. O inóculo foi aspirado e as células foram lavadas três vezes com DMEM/F12 com 2% de FBS antes da substituição pelo meio de cultura de HepG2-NTCP.

[0219] Tratar as células no dia 5. No Dia 5, os compostos de teste foram diluídos 3 vezes com meio Opti-MEM I e misturados com o reagente de transfecção Lipofectamine® RNAiMAX seguindo as instruções do fabricante. Após a substituição do meio no Dia 8, os compostos de teste foram transfectados como descrito. Após a incubação durante 3 dias adicionais, o sobrenadante foi coletado e o HBsAg foi medido por ELISA (Diasino). A viabilidade celular foi medida com CellTiter-Glo (Promega).

[0220] A EC₅₀, a concentração do fármaco necessária para reduzir a secreção de HBsAg em 50% em relação ao valor de controle de células não tratadas, foi calculada partindo da representação gráfica da porcentagem de redução do nível de HBsAg contra as concentrações de fármaco utilizando a função forecast do Microsoft Excel ou GraphPad Prism e resumida na Tabela 36.

TABELA 36 – POTÊNCIA E CITOTOXICIDADE

Composto No.	EC₅₀	CC₅₀
6, 274, 283	A	A
273, 282	C	A
315	D	A
290	A	A
184		
134, 277, 284	A	A
192	A	A
221	A	A
294	C	A
291	A	A
276		
295	B	A
275		

Composto No.	EC₅₀	CC₅₀
173, 293	B	A
165, 287	A	A
167, 289	B	A
164, 286	B	A
166, 288	B	A
171, 280, 292	B	A
314	A	A
281, 316	C	A
296	A	A
285	A	A
251	B	A
356	A	A
320	A	A

[0221] Potência: A: EC₅₀ < 30 nM; B: EC₅₀ ≥ 30 nM e EC₅₀ < 100 nM; C: EC₅₀ ≥ 100 nM e EC₅₀ < 300 nM; D: EC₅₀ > 300 nM.

[0222] Citotoxicidade: **A:** CC₅₀ ≥ 1000 nM; **B:** CC₅₀ < 1000 nM

EXEMPLO B3

ENSAIO DE SECREÇÃO DE HBSAG PARA COMBINAÇÕES

[0223] A atividade antiviral independente da sequência contra hepatite

B (que é determinada através do Ensaio de Secreção de HBsAg) de compostos oligonucleotídicos modificados exemplificados em combinação com oligonucleotídeos antissenso (ASOs) foi determinada como descrito abaixo e resumida na Tabela 37.

Cultura de Células

[0224] As células HepG2.2.15 foram mantidas em meio DMEM/F12 com 10% de soro fetal bovino (FBS) e 1% de penicilina/estreptomicina, 1% de Glutamina, 1% de aminoácidos não essenciais, 1% de Piruvato de Sódio. As células foram mantidas a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂.

Ensaio de Secreção de HBsAg

[0225] As células HepG2.2.15 foram crescidas em meio DMEM/F12 como descrito anteriormente. As células foram inoculadas a uma concentração de 35.000 células/poço em placas de 96 poços revestidas com colágeno I. Imediatamente após a adição das células, adicionar os compostos de teste. Fazer transfecções duplas nos dias 0 e 3.

Método de transfecção

[0226] Transfecção com Lipofectamine® RNAiMAX. O Lipofectamine® RNAiMAX Transfection Reagent (Thermo Fisher, cat#: 13778-150) é utilizado seguindo as instruções do fabricante.

[0227] A: misturar RNAiMAX (0,3ul/poço para placa de 96 poços) com Opti-MEM I (fazer 20% extra), incubar durante 5 min a RT.

[0228] B: diluir as combinações de ASOs e os oligonucleotídeos modificados em Opti-MEM I para produzir 40x de concentração final (8 pontos, diluição de 3 vezes, incluir concentração 0nM). A concentração máxima é aproximadamente 100 – 200 vezes do valor de EC₅₀. Então

misturar diluições em volume igual tanto do composto¹ quanto do composto² na direção oposta como indicado no gráfico mostrado na FIG. 23.

[0229] Misturar A e B em volume igual (fazer 20% de volume extra), incubar durante mais 5-10 min. Então adicionar a mistura de A e B a 1/10 do volume de cultura final em cada poço, girar as placas durante 10 segundos com as mãos. Deve haver pelo menos triplicatas para as placas. Incubar a 37°C durante 3 dias, trocar o meio, repetir o processo de transfecção. No dia 6 após o tratamento, coletar o sobrenadante para ensaio de ELISA, medir a viabilidade celular com CellTiter-Glo (Promega).

Análise de dados

[0230] Para analisar a sinergia, a porcentagem de redução de HBsAg (ou DNA) é calculada para cada poço. Porcentagem de redução = $(1 - \text{poço} / \text{media de controle sem fármaco}) \times 100$. Estes números são inseridos no MacSinergy II e o volume de sinergia/antagonismo é obtido seguindo a instrução do software.

[0231] Volume de sinergia <25 indica sem sinergia/antagonismo.

[0232] Volume de sinergia 25-50 indica baixa sinergia/antagonismo.

[0233] Volume de sinergia 50-100 indica sinergia/antagonismo moderado.

[0234] Volume de sinergia >100 indica sinergia/antagonismo forte.

[0235] Volume de sinergia >1.000 indica possíveis erros, verificar os dados.

[0236] Porcentagem de viabilidade celular = $(\text{poço} / \text{média de controle sem fármaco}) \times 100$. Monitorar a citotoxicidade como descrito anteriormente.

Quantificação de HBsAg

[0237] O HBsAg secretado foi medido quantitativamente utilizando HBsAg ELISA Kit (Autobio-CL0310). Os valores de sinergia para as combinações de oligonucleotídeos modificados com ASOs são fornecidos na Tabela 37.

TABELA 37 – SINERGIA DE COMBINAÇÕES

Composto No.	ASO¹	HBsAg 95% de Volume de Sinergia
166, 288	ASO-1	335,08
134, 277, 284	ASO-2	52,98
296	ASO-2	43,05

¹ASO-1 é um HBV ASO SSO-1 não conjugado que é divulgado em Javanbakht, H. *et al.* Molecular Therapy: Nucleic Acids Vol. 11 June 2018, que tem a estrutura a seguir: 5'-
lnApslnGpsln(5m)CpsGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsApsln(5m)CpslnGpslnG-3. ASO-2 é um ASO que tem uma estrutura que é descrita para o ASO referido como a Sequência #9 no Pedido de Patente U.S. número de série 62/855.793, que é incorporado aqui como referência e particularmente com a finalidade de descrever a estrutura da Sequência #9.

EXEMPLO B4

ENSAIO DE SECREÇÃO DE HBSAG PARA COMBINAÇÕES

[0238] A atividade antiviral independente da sequência contra hepatite B (que é determinada através do Ensaio de Secreção de HBsAg) de

compostos oligonucleotídicos modificados exemplificados em combinação com um ASO, modulador da montagem do capsídeos (CAM composto 1 ou CAM composto 2) ou análogo de nucleosídeo (Entecavir, ETV) foi determinada como descrito abaixo e resumida na Tabela 38.

Cultura de Células

[0239] O procedimento de ensaio a seguir descreve o ensaio antiviral de HBV. Este ensaio utiliza células HepG2.2.15, que foram transfectadas com genoma de HBV e quantificação do DNA de HBV extracelular como ponto final. A viabilidade celular é avaliada em paralelo através da medida do conteúdo de ATP intracelular utilizando o reagente CellTiter-Glo® da Promega.

Ensaio de Secreção de HBsAg

[0240] As células HepG2.2.15 foram crescidas em meio DMEM/F12 como descrito anteriormente. As células foram inoculadas a uma concentração de 35.000 células/poço em placas de 96 poços revestidas com colágeno I. Imediatamente após a adição das células, adicionar os compostos de teste. Fazer transfecções duplas nos dias 0 e 3.

Ensaio de quantificação do DNA de HBV

[0241] O DNA extracelular foi isolado com o QIAamp 96 DNA Blood Kit seguindo o manual do fabricante. O DNA de HBV foi então quantificado por qPCR com iniciadores e sondas específicos para o HBV que são especificados abaixo utilizando o FastStart Universal MasterMix da Roche em um ABI-7900HT. O programa de ciclos da PCR consistia de 95°C durante 10 min, seguidos por 40 ciclos a 95°C durante 15 s e 60°C durante 1 min.

Itens	Nome	Sequência (5' → 3')
Iniciador de HBV	HBV-para frente	GTGTCTGCGGCGTTTATCA
	HBV-para trás	GACAAACGGGCAACATACCTT
Sonda de HBV	sonda de HBV	FAM-CCTCTKCATCCTGCTGCTATGCCTCATC-TAMRA

Método de transfecção

[0242] Transfecção com Lipofectamine® RNAiMAX. O Lipofectamine® RNAiMAX Transfection Reagent (Thermo Fisher, cat#: 13778-150) é utilizado seguindo as instruções do fabricante.

[0243] A: misturar RNAiMAX (0,3ul/poço para placa de 96 poços) com Opti-MEM I (fazer 20% extra), incubar durante 5 min à temperatura ambiente.

[0244] B: diluir combinações de CAM, ASO ou ETV com oligonucleotídeos modificados em Opti-MEM I para produzir 40x de final concentração (8 pontos, diluição de 3 vezes, incluir a concentração 0nM). A concentração máxima é aproximadamente 100 – 200 vezes o valor de EC₅₀. Então mistura diluições em volumes iguais tanto do composto1 quanto do composto2 na direção oposta como indicado no gráfico mostrado na FIG. 23.

[0245] Misturar A e B em volumes iguais (fazer 20% de volume extra),

incubar durante mais 5-10 min. Então adicionar a mistura de A e B a 1/10 do volume de cultura final em cada poço, girar as placas durante 10 segundos com as mãos. Deve haver pelo menos triplicatas para as placas. Incubar a 37°C durante 4 h antes da adição de ASO, ETV ou CAMs para deixar as células se recuperarem da transfecção. No dia 3 após o tratamento, coletar o sobrenadante para ensaio de ELISA, medir a viabilidade celular com CellTiter-Glo (Promega).

Análise dos dados

[0246] Os dados de sinergia foram analisados como descrito no Exemplo B3 acima.

Quantificação de HBsAg

[0247] O HBsAg secretado foi medido de forma quantitativa utilizando o HBsAg ELISA Kit (Autobio-CL0310). Os valores de sinergia para as combinações de oligonucleotídeos modificados com ASOs são fornecidos na Tabela 38.

TABELA 38 – SINERGIA DE COMBINAÇÕES

Composto No.	ASO, CAM ou ETV¹	DNA do HBV	DNA de HBV 95% de Volume de Sinergia
166, 288	ASO-1	Aditivo	23,99
134, 277, 284	ETV	Sinergia	25,91
134, 277, 284	CAM composto 1	Aditivo	1,35
134, 277, 284	CAM composto 2	Sinergia	41,86

¹ Composto CAM 1 é um CAM que tem uma estrutura que é descrita para o composto CAM referido como o composto 3 na WO2017/181141, que é incorporada aqui como referência e particularmente com a finalidade de descrever a estrutura do composto 3. O composto CAM 2 é um CAM que tem uma estrutura que é descrita para o composto CAM referido como o composto 1 na U.S. No. de Série 62/805.725, que é incorporada aqui como referência e particularmente com a finalidade de descrever a estrutura do composto 1. ASO-1 é como descrito anteriormente para a Tabela 37.

EXEMPLO B5

EXPOSIÇÃO DO FÍGADO EM PRIMATAS NÃO HUMANOS

[0248] Exposições do fígado terminal em primatas não humanos foram avaliadas através da dosagem dos compostos oligonucleotídicos modificados exemplificados a fêmeas de macacos cinomolgos pela rota intravenosa (IV) ou subcutânea (SC). Para a rota IV, o composto foi administrado em veículo de solução salina tamponada com fosfato (PBS) esterilizado e infundido ao longo de um período de 2 h a 1 mL/kg. Para dosagem subcutânea, o veículo também era PBS esterilizada e o composto foi administrado na forma de um único bolo a 1 mL/kg. Havia dois animais por grupo de dose e os dados mostrados são a média dos dois animais. Os níveis no fígado foram determinados no ponto de tempo de 24 horas. As doses utilizadas para este estudo e os dados obtidos são mostrados na FIG. 12. De forma inesperada, a exposição do fígado após a administração subcutânea a primatas não humanos é muito maior que a esperada com base nos níveis de exposição do fígado resultantes de dosagem intravenosa comparável de outra maneira.

EXEMPLO B6

ENSAIO DE PBMC

[0249] O efeito de compostos oligonucleotídicos modificados exemplificados sobre a liberação de citocinas das células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foi avaliado como descrito abaixo e resumido na Tabela 39 e nas FIGS. 13-22.

[0250] As placas leucocitárias (N=3) foram obtidas no Stanford Blood Center e foram processadas para isolar as PBMC seguindo o protocolo padronizado de Aragen utilizando centrifugação em gradiente de densidade de Ficoll. As PBMC (1 milhão/mL) foram suspensas em meio de cultura completo (RPMI suplementado com 10% de FBS e PSG Heat Inactivated-Low IgG) e plaqueadas a 100 µL/poço em uma placa de fundo arredondado de 96 poços. As PBMC foram tratadas com os artigos de teste (lista no próximo slide) (faixa de concentração: 10 µM a 0 µM - diluição de 3 vezes) e PHA e Poly IC (faixa de concentração: 10 µg/mL a 0 µg/mL - diluição de 3 vezes). Tudo foi montado em triplicatas. Após 24 horas de incubação em um incubador de cultura de células padrão umedecido a 37°C/5% de CO₂, os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -80°C até serem analisados em relação às citocinas. As citocinas (GM-CSF, IL-1b, IL-2, IL-6, IL-10, IL-8, IL-12p70, IFNγ, TNFα) foram testadas no Intellicyt iQue Screener e analisadas utilizando o software de análise ForeCyt. A citocina (IFNα) foi testada por ELISA padronizado. Os resultados são expressos na forma de pg/mL calculado com base na curva padrão.

TABELA 39

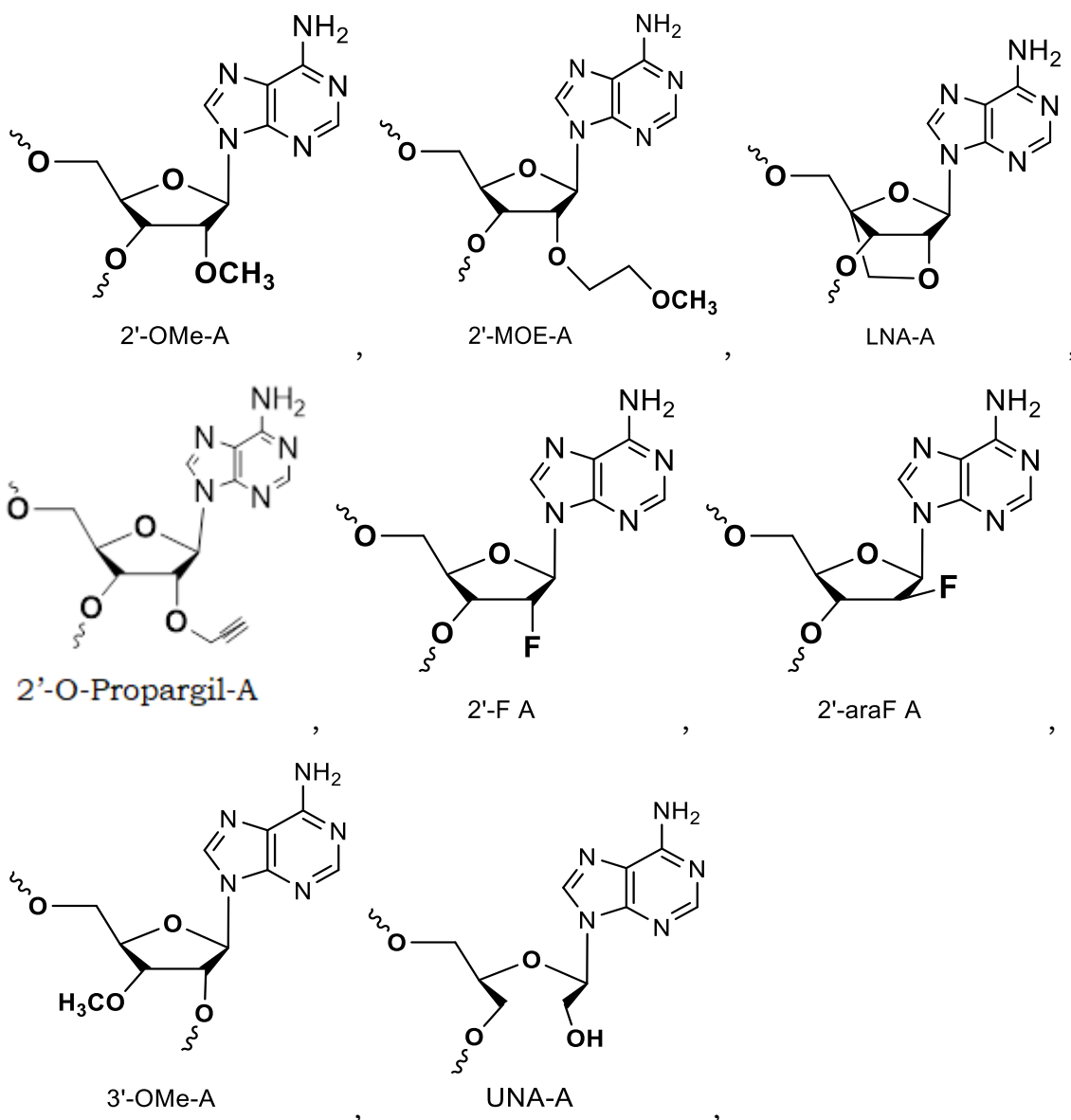
Composto No.	FIG. No.	Reação Imunológica¹
PHA Control	13	Forte
REP-2139	14	Fraca
171, 280, 292	15	Fraca
296	16	Nenhuma
134, 277, 284	17	Fraca
166, 288	18	Nenhuma
167, 289	19	Nenhuma
281, 316	20	Nenhuma
294	21	Fraca
276, 291	22	Fraca

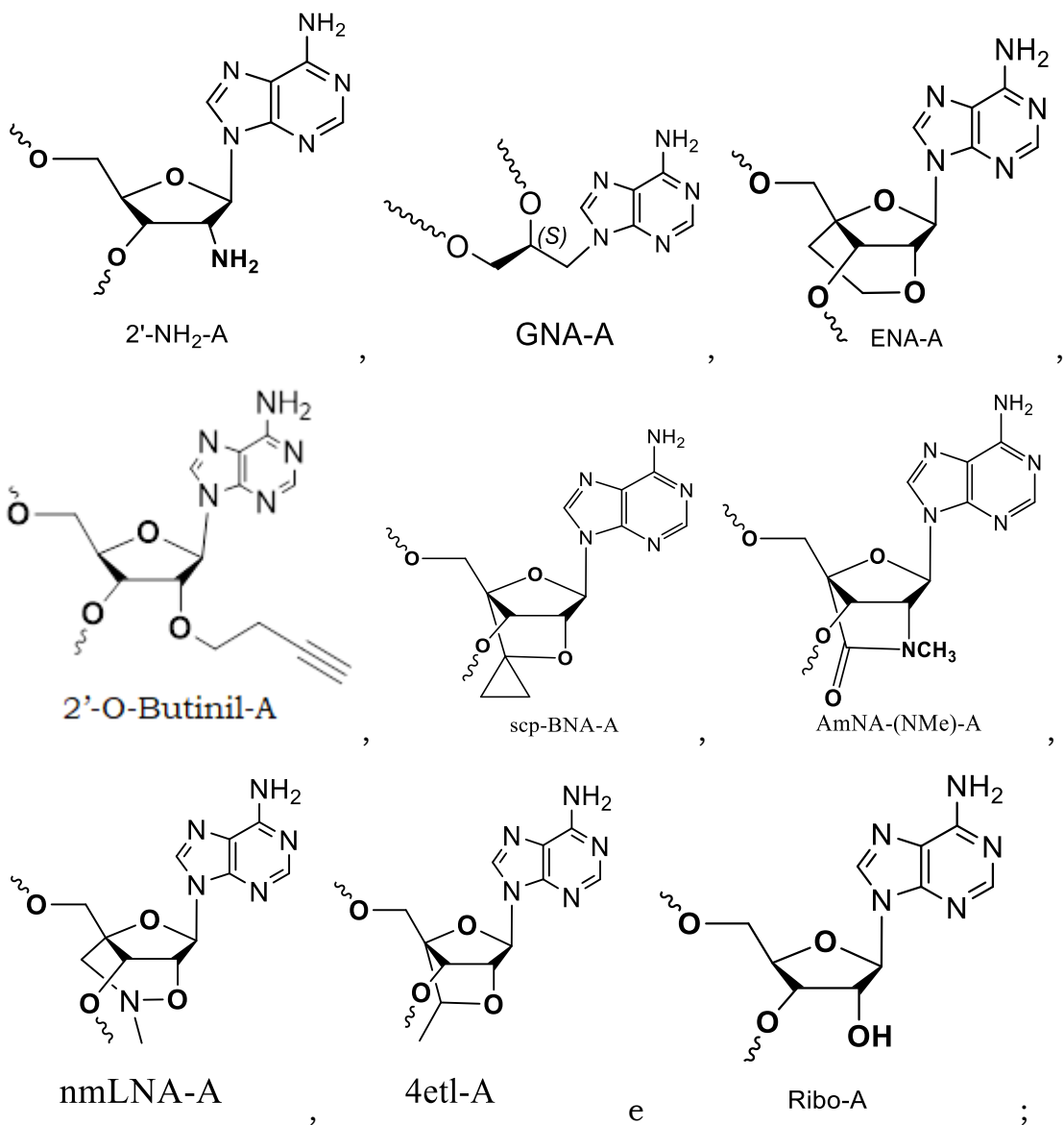
¹Forte: indução significativa observada e mais de dois tipos de citocinas no painel testado; Fraca: indução observada em um ou mais tipos de citocinas no painel testado; Nenhuma: nenhuma indução observada em qualquer citocina no painel testado.

REIVINDICAÇÕES

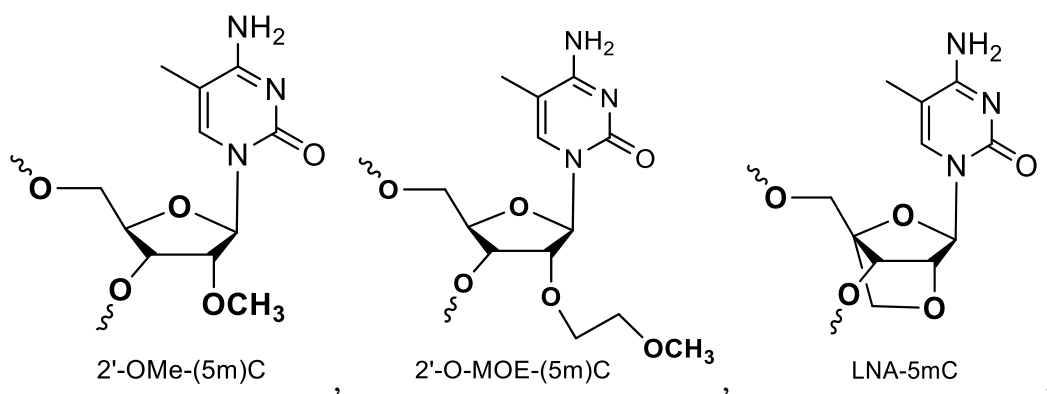
1. Oligonucleotídeo Modificado ou Complexo do Mesmo, que tem atividade antiviral independente da sequência contra hepatite B, que compreende uma sequência pelo menos parcialmente fosforotioada de unidades A e C alternadas, **caracterizado** por que:

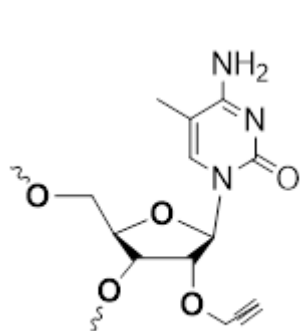
as unidades A compreendem uma ou mais selecionadas a partir de:



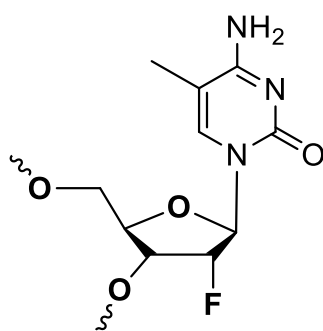


as unidades C compreendem uma ou mais selecionadas a partir de

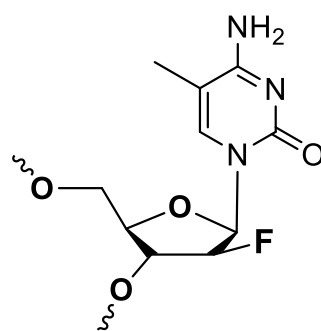




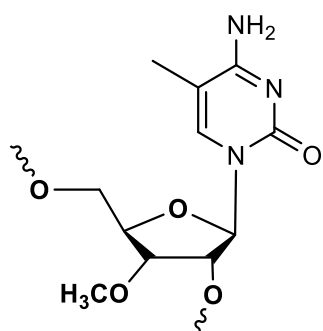
2'-O-Propargil- (5m)C



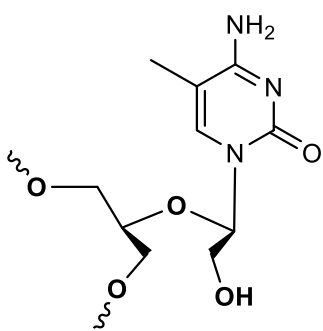
2'-F(5m)C



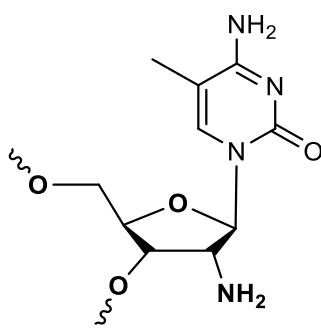
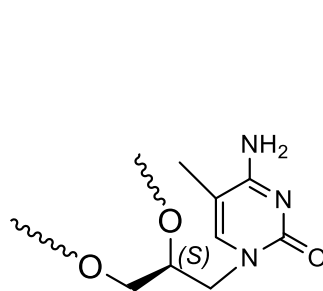
2'-araF(5m)C



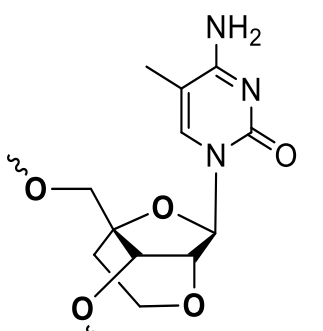
3'-OMe (5m)C



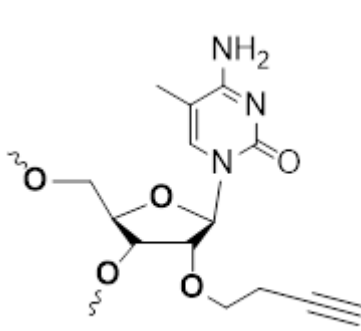
UNA-(5m)C

2'-NH₂ (5m)C

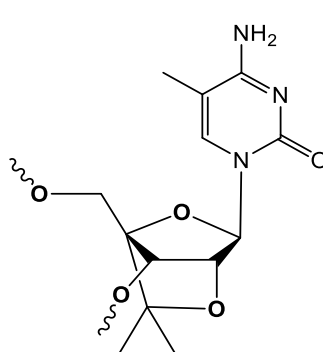
GNA-(5m)C



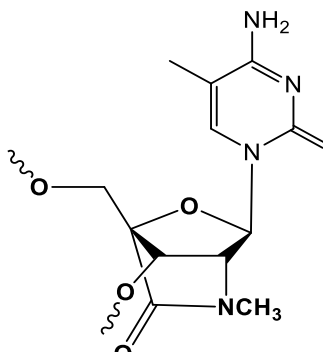
ENA-5mC



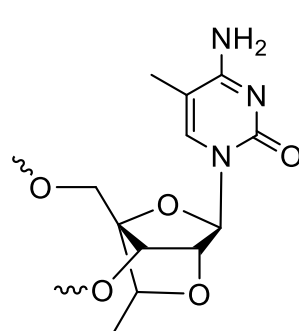
2'-O-Butinil- (5m)C



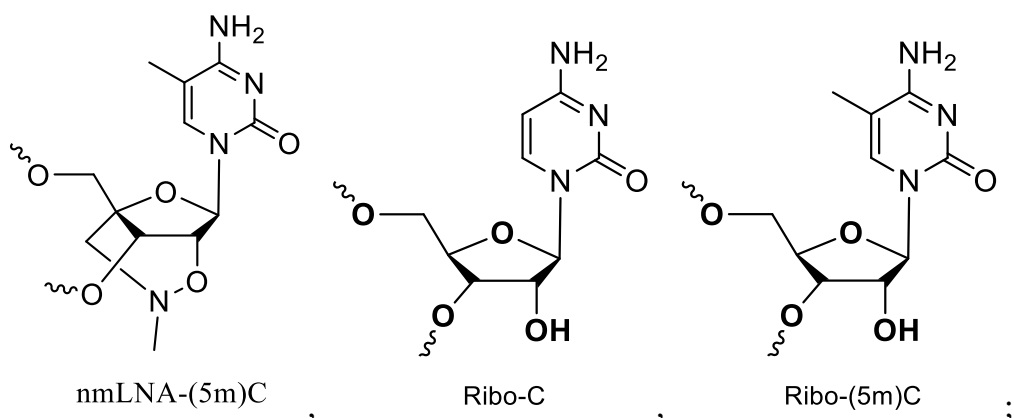
scp-BNA-(5m)C



AmNA-(NMe)-(5m)C



4etl-(5m)C



cada $\sim\text{O}$ terminal é independentemente hidroxila, um fosforotioato de O,O-dihidrogênio, um bifosfato de hidrogênio, um *endcap* ou um grupo de ligação;

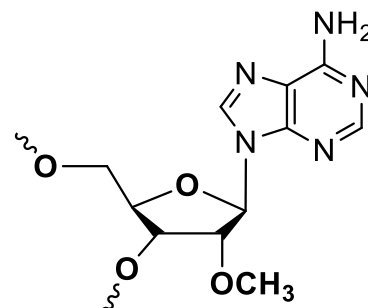
cada $\sim\text{O}$ interno é uma ligação que contém fósforo com uma unidade A ou C vizinha, a ligação contendo fósforo sendo uma ligação fosforotioato ou uma ligação modificada selecionada a partir de fosfodiéster, fosforoditioato, metilfosfonato, difosforotioato 5'-fosforamidato, 3',5'-fosfordiamidato, 5'-tiofosforamidato, 3',5'-tiofosfordiamidato ou difosfodiéster; e

a atividade antiviral independente da sequência contra hepatite B, que é determinada através do HBsAg Secretion Assay, é maior que àquela de um composto de referência, em que o composto de referência é o 40-mer oligonucleotídeo fosforotioado AC conhecido como REP 2139;

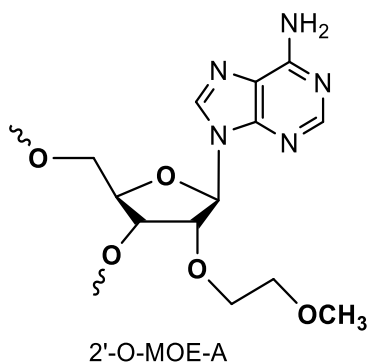
com a condição de que, quando a sequência de unidades A e C alternadas compreender uma unidade Ribo-A, a sequência compreende ainda pelo menos uma unidade A que deixa de ser a unidade Ribo-A; e

com a condição de que, quando a sequência de unidades A e C alternadas compreender uma unidade Ribo-C, a sequência compreende ainda pelo menos uma unidade C que deixa de ser a unidade Ribo-C.

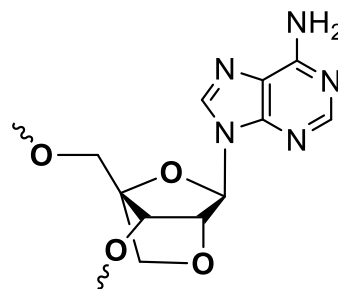
2. Oligonucleotídeo Modificado ou Complexo do Mesmo, de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizado** por que a unidade A é uma ou



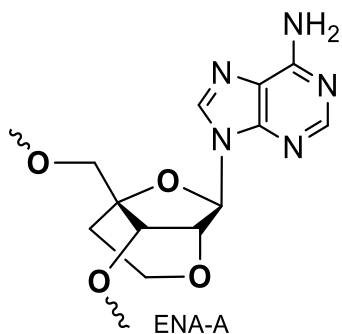
mais selecionadas a partir de 2'-OMe-A e



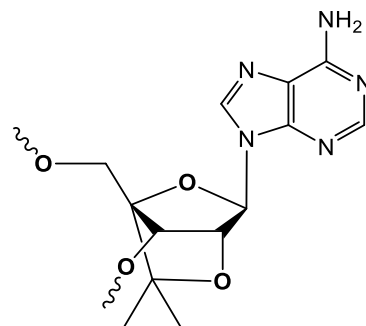
3. Oligonucleotídeo Modificado ou Complexo do Mesmo, de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizado** por que a unidade A é uma ou



mais selecionadas a partir de LNA-A e

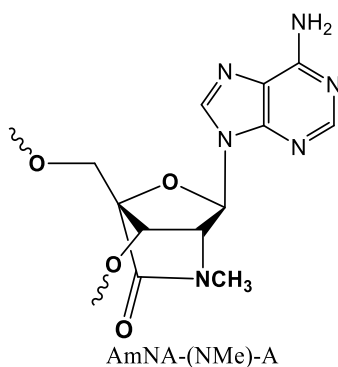


4. Oligonucleotídeo Modificado ou Complexo do Mesmo, de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizado** por que a unidade A é uma ou



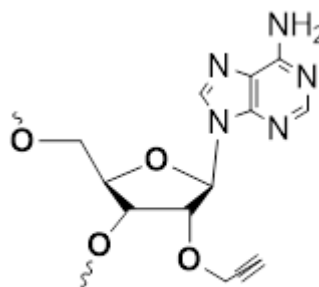
scp-BNA-A

mais selecionadas a partir de



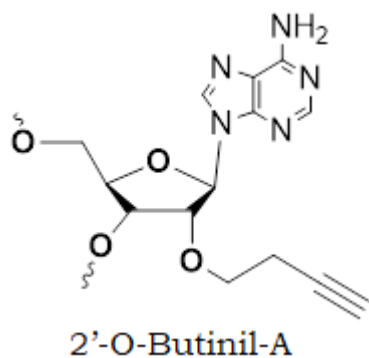
AmNA-(NMe)-A

5. Oligonucleotídeo Modificado ou Complexo do Mesmo, de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizado** por que a unidade A é uma ou

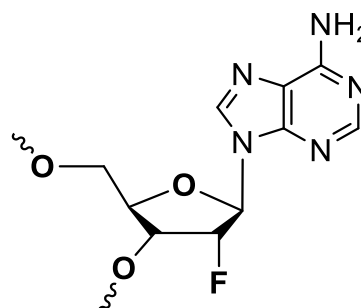


2'-O-Propargil-A

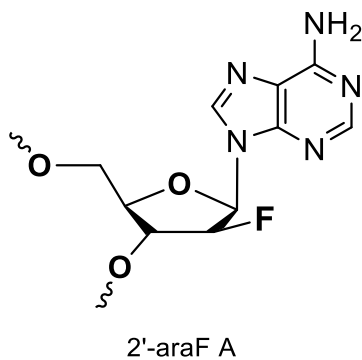
mais selecionadas a partir de



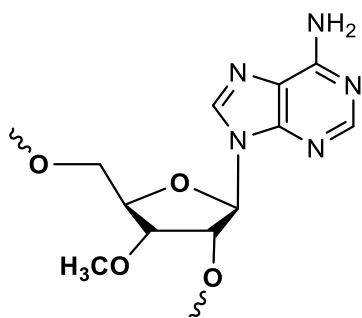
6. Oligonucleotídeo Modificado ou Complexo do Mesmo, de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizado** por que a unidade A é uma ou



mais selecionadas a partir de 2'-F A e

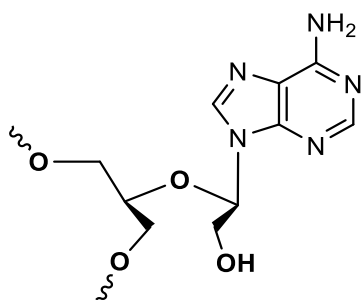


7. Oligonucleotídeo Modificado ou Complexo do Mesmo, de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizado** por que a unidade A é



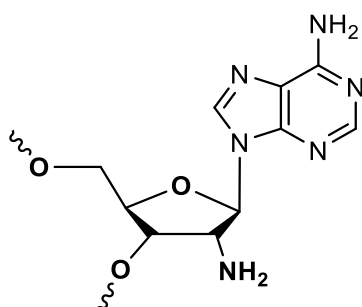
3'-OMe-A

8. Oligonucleotídeo Modificado ou Complexo do Mesmo, de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizado** por que a unidade A é

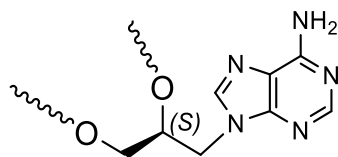


UNA-A

9. Oligonucleotídeo Modificado ou Complexo do Mesmo, de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizado** por que a unidade A é

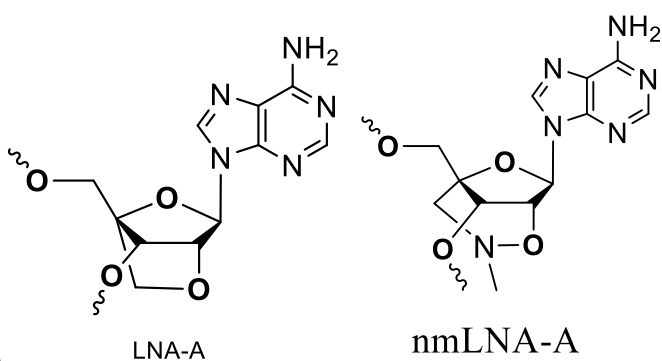
2'-NH₂-A

10. Oligonucleotídeo Modificado ou Complexo do Mesmo, de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizado** por que a unidade A é

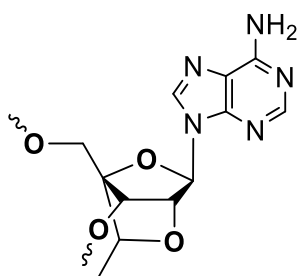


GNA-A

11. Oligonucleotídeo Modificado ou Complexo do Mesmo, de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizado** por que a unidade A é uma ou



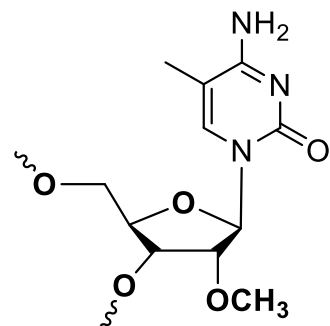
mais selecionadas a partir de



4etl-A

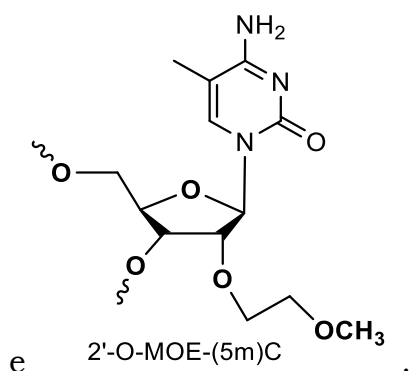
e

12. Oligonucleotídeo Modificado ou Complexo do Mesmo, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 1 a 11, **caracterizado** por que

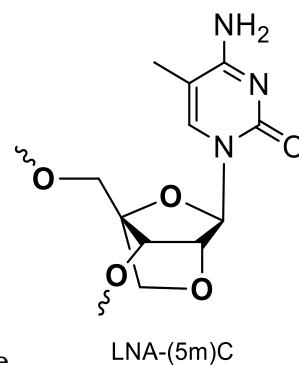


2'-OMe-(5m)C

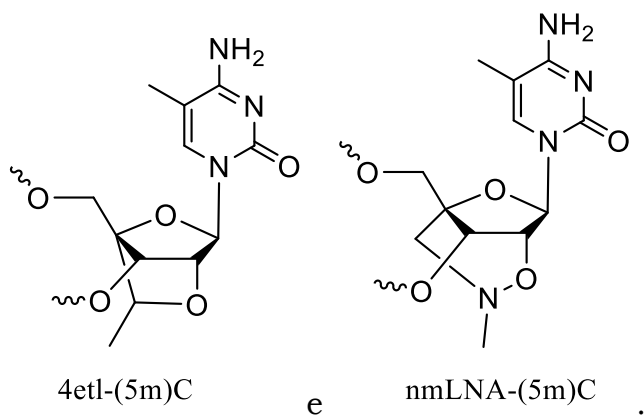
a unidade C é uma ou mais selecionadas a partir de



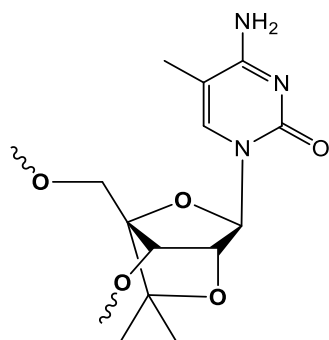
13. Oligonucleotídeo Modificado ou Complexo do Mesmo, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 1 a 11, **caracterizado** por que



a unidade C é uma ou mais selecionadas a partir de



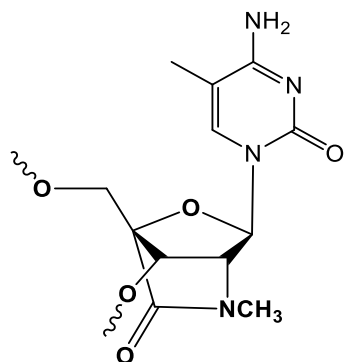
14. Oligonucleotídeo Modificado ou Complexo do Mesmo, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 1 a 11, **caracterizado** por que



a unidade C é

scp-BNA-(5m)C .

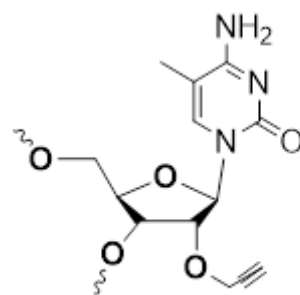
15. Oligonucleotídeo Modificado ou Complexo do Mesmo, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 1 a 11, **caracterizado** por que



a unidade C é

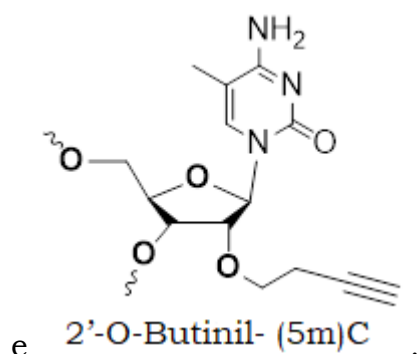
AmNA-(NMe)-(5m)C .

16. Oligonucleotídeo Modificado ou Complexo do Mesmo, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 1 a 11, **caracterizado** por que

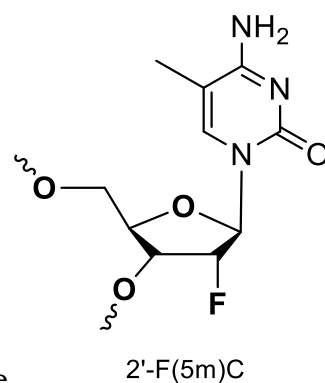


a unidade C é uma ou mais selecionadas a partir de

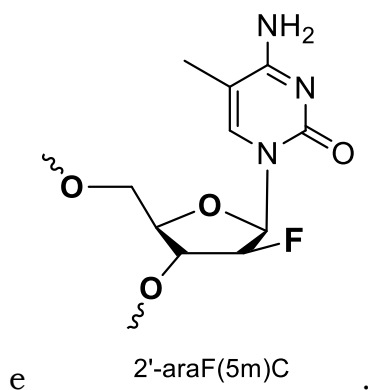
2'-O-Propargil- (5m)C



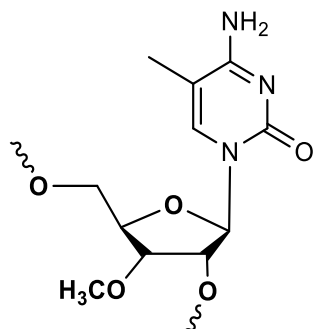
17. Oligonucleotídeo Modificado ou Complexo do Mesmo, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 1 a 11, **caracterizado** por que



a unidade C é uma ou mais selecionadas a partir de

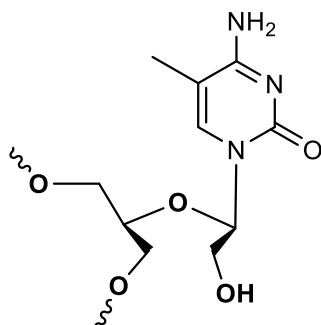


18. Oligonucleotídeo Modificado ou Complexo do Mesmo, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 1 a 11, **caracterizado** por que



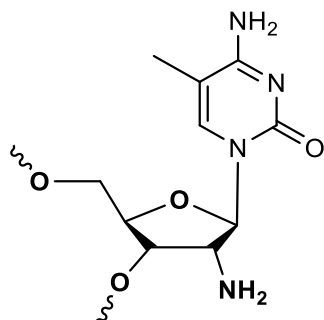
a unidade C é 3'-OMe- (5m)C .

19. Oligonucleotídeo Modificado ou Complexo do Mesmo, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 1 a 11, **caracterizado** por que



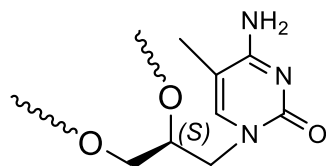
a unidade C é UNA-(5m)C .

20. Oligonucleotídeo Modificado ou Complexo do Mesmo, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 1 a 11, **caracterizado** por que



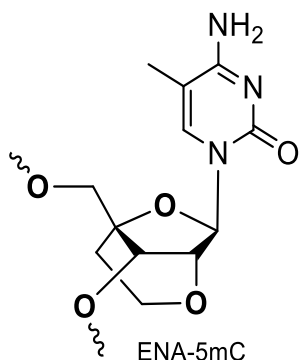
a unidade C é 2'-NH₂ (5m)C .

21. Oligonucleotídeo Modificado ou Complexo do Mesmo, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 1 a 11, **caracterizado** por que



a unidade C é GNA-(5m)C .

22. Oligonucleotídeo Modificado ou Complexo do Mesmo, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 1 a 11, **caracterizado** por que



a unidade C é ENA-5mC .

23. Oligonucleotídeo Modificado ou Complexo do Mesmo, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 1 a 22, **caracterizado** por que é parcialmente fosforotioado.

24. Oligonucleotídeo Modificado ou Complexo do Mesmo, de acordo com a Reivindicação 23, **caracterizado** por que é pelo menos 85% fosforotioado.

25. Oligonucleotídeo Modificado ou Complexo do Mesmo, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 1 a 22, **caracterizado** por que é totalmente fosforotioado.

26. Oligonucleotídeo Modificado ou Complexo do Mesmo, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 23 a 25, **caracterizado** por que compreende pelo menos uma ligação fosforotioato definida estereoquimicamente.

27. Oligonucleotídeo Modificado ou Complexo do Mesmo, de acordo

com a Reivindicação 26, **caracterizado** por que compreende pelo menos 6 ligações fosforotioato definidas estereoquimicamente.

28. Oligonucleotídeo Modificado ou Complexo do Mesmo, de acordo com a Reivindicação 26 ou 27, **caracterizado** por que pelo menos uma ligação fosforotioato definida estereoquimicamente tem uma configuração R.

29. Oligonucleotídeo Modificado ou Complexo do Mesmo, de acordo com a Reivindicação 26 ou 27, **caracterizado** por que pelo menos uma ligação fosforotioato definida estereoquimicamente tem uma configuração S.

30. Oligonucleotídeo Modificado ou Complexo do Mesmo, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 1 a 29, **caracterizado** por que compreende um *endcap* a 5'.

31. Oligonucleotídeo Modificado ou Complexo do Mesmo, de acordo com a Reivindicação 30, **caracterizado** por que o *endcap* a 5' é

selecionado a partir de

$$\text{HO}-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})-\text{CR}^1=\text{CR}^2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}, \quad \text{HO}-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}, \quad \text{HO}-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$$

, em que R¹ e R² são cada um individualmente selecionados a partir de hidrogênio, deutério, fosfato, tioC₁₋₆alquila e ciano.

32. Oligonucleotídeo Modificado ou Complexo do Mesmo, de acordo com a Reivindicação 31, **caracterizado** por que R¹ e R² são ambos hidrogênio.

33. Oligonucleotídeo Modificado ou Complexo do Mesmo, de acordo com a Reivindicação 31, **caracterizado** por que R¹ e R² deixam ambos de

com qualquer uma das Reivindicações de 1 a 35, **caracterizado** por que a sequência pelo menos parcialmente fosforotioada de unidades A e C alternadas tem um comprimento de sequência na faixa de 30 unidades a 50 unidades.

39. Oligonucleotídeo Modificado ou Complexo do Mesmo, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 1 a 35, **caracterizado** por que a sequência pelo menos parcialmente fosforotioada de unidades A e C alternadas tem um comprimento de sequência na faixa de 34 unidades a 46 unidades.

40. Oligonucleotídeo Modificado ou Complexo do Mesmo, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 1 a 35, **caracterizado** por que a sequência pelo menos parcialmente fosforotioada de unidades A e C alternadas tem um comprimento de sequência na faixa de 36 unidades a 44 unidades.

41. Oligonucleotídeo Modificado ou Complexo do Mesmo, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 1 a 40, **caracterizado** por que pelo menos um $\sim\text{O}$ terminal é um grupo de ligação.

42. Oligonucleotídeo Modificado ou Complexo do Mesmo, de acordo com a Reivindicação 41, **caracterizado** por que compreende ainda pelo menos um segundo oligonucleotídeo que é ligado ao oligonucleotídeo modificado através do grupo de ligação.

43. Oligonucleotídeo Modificado ou Complexo do Mesmo, de acordo com a Reivindicação 41, **caracterizado** por que compreende ainda um ligante de direcionamento que é ligado ao oligonucleotídeo modificado através do grupo de ligação.

44. Oligonucleotídeo Modificado ou Complexo do Mesmo, de acordo com a Reivindicação 43, **caracterizado** por que o ligante de

direcionamento compreende N-acetilgalactosamina (GalNac), GalNac triantenário, um tocoferol ou colesterol.

45. Oligonucleotídeo Modificado ou Complexo do Mesmo, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 1 a 44, **caracterizado** por que pelo menos algumas das unidades A deixam de ser 2'O-metiladas no anel de ribose.

46. Oligonucleotídeo Modificado ou Complexo do Mesmo, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 1 a 45, **caracterizado** por que pelo menos algumas das unidades C deixam de ser 2'O-metiladas no anel de ribose.

47. Oligonucleotídeo Modificado ou Complexo do Mesmo, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 1 a 46, **caracterizado** por que a sequência pelo menos parcialmente fosforotioada de unidades A e C alternadas compreende ainda uma ou mais modificações em uma ligação fosforotioato.

48. Oligonucleotídeo Modificado ou Complexo do Mesmo, de acordo com a Reivindicação 47, **caracterizado** por que a modificação na ligação fosforotioato é uma ligação modificada selecionada a partir de fosfodiéster, fosforoditioato, metilfosfonato, difosforotioato 5'-fosforamidato, 3',5'-fosfordiamidato, 5'-tiofosforamidato, 3',5'-tiofosfordiamidato ou difosfodiéster.

49. Oligonucleotídeo Modificado ou Complexo do Mesmo, de acordo com a Reivindicação 48, **caracterizado** por que a ligação modificada é uma ligação fosfodiéster.

50. Oligonucleotídeo Modificado ou Complexo do Mesmo, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 1 a 46, **caracterizado** por que compreende ainda pelo menos duas sequências parcialmente fosforotioadas de unidades A e C alternadas ligadas juntas para formar

um concatâmero.

51. Oligonucleotídeo Modificado ou Complexo do Mesmo, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 1 a 50, **caracterizado** por que a atividade antiviral independente da sequência contra hepatite B é pelo menos 2 vezes maior que a do composto de referência.

52. Oligonucleotídeo Modificado ou Complexo do Mesmo, de acordo com a Reivindicação 51, **caracterizado** por que a atividade antiviral independente da sequência contra hepatite B é pelo menos 5 vezes maior que a do composto de referência.

53. Oligonucleotídeo Modificado ou Complexo do Mesmo, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 1 a 52, **caracterizado** por que o oligonucleotídeo modificado tem um valor EC50, que é determinado através do HBsAg Secretion Assay, que é menor que 30 nM.

54. Oligonucleotídeo Modificado ou Complexo do Mesmo, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 1 a 52, **caracterizado** por que o oligonucleotídeo modificado tem um valor EC50, que é determinado através do HBsAg Secretion Assay, que está na faixa de 30 nM até menos que 100 nM.

55. Oligonucleotídeo Modificado ou Complexo do Mesmo, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 1 a 52, **caracterizado** por que o oligonucleotídeo modificado tem um valor EC50, que é determinado através do HBsAg Secretion Assay, que está na faixa de 100 nM até menos que 300 nM.

56. Oligonucleotídeo Modificado ou Complexo do Mesmo, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 1 a 52, **caracterizado** por que o oligonucleotídeo modificado tem um valor EC50, que é determinado através do HBsAg Secretion Assay, que é maior que 300 nM.

57. Oligonucleotídeo Modificado ou Complexo do Mesmo, de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizado** por que a sequência pelo menos parcialmente fosforotioada tem um comprimento de sequência e unidades A e C alternadas que são apresentadas nas Tabelas 6-33 e nas FIGS. 6A-6B.

58. Complexo de Oligonucleotídeo Modificado, conforme definido em qualquer uma das Reivindicações de 1 a 57, **caracterizado** por que o complexo é um complexo quelado.

59. Complexo de Oligonucleotídeo Modificado, de acordo com a Reivindicação 58, **caracterizado** por que o complexo é um complexo quelado com cálcio, magnésio ou zinco do oligonucleotídeo modificado.

60. Complexo de Oligonucleotídeo Modificado, conforme definido em qualquer uma das Reivindicações de 1 a 57, **caracterizado** por que o complexo é um complexo de íon indicador monovalente.

61. Complexo de Oligonucleotídeo Modificado, de acordo com a Reivindicação 60, **caracterizado** por que o complexo é um complexo de lítio, sódio ou potássio do oligonucleotídeo modificado.

62. Oligonucleotídeo Modificado ou Complexo do Mesmo, de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizado** por que:

a sequência pelo menos parcialmente fosforotioada de unidades A e C alternadas é pelo menos 85% fosforotioada;

a sequência pelo menos parcialmente fosforotioada de unidades A e C alternadas tem um comprimento de sequência na faixa de 36 unidades a 44 unidades;

as unidades A compreendem pelo menos 12 unidades de 2'-OMe-A e pelo menos 1 unidade de Ribo-A;

as unidades C compreendem pelo menos 15 unidades de LNA-5mC; e

o oligonucleotídeo modificado tem um valor EC50, que é determinado através do HBsAg Secretion Assay, que é menor que 30 nM.

63. Oligonucleotídeo Modificado ou Complexo do Mesmo, de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizado** por que:

a sequência pelo menos parcialmente fosforotioada de unidades A e C alternadas é pelo menos 85% fosforotioada;

a sequência pelo menos parcialmente fosforotioada de unidades A e C alternadas tem um comprimento de sequência na faixa de 36 unidades a 44 unidades;

as unidades A compreendem pelo menos 15 unidades de 2'-OMe-A;

as unidades C compreendem pelo menos 7 unidades de LNA-5mC; e

o oligonucleotídeo modificado tem um valor EC50, que é determinado através do HBsAg Secretion Assay, que é menor que 50 nM.

64. Oligonucleotídeo Modificado ou Complexo do Mesmo, de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizado** por que:

a sequência pelo menos parcialmente fosforotioada de unidades A e C alternadas é pelo menos 85% fosforotioada;

a sequência pelo menos parcialmente fosforotioada de unidades A e C alternadas tem um comprimento de sequência na faixa de 36 unidades a 44 unidades;

as unidades A compreendem pelo menos 15 unidades de 2'-OMe-A;

as unidades C compreendem pelo menos 3 unidades de LNA-5mC; e

o oligonucleotídeo modificado tem um valor EC50, que é determinado através do HBsAg Secretion Assay, que é menor que 100 nM.

65. Oligonucleotídeo Modificado ou Complexo do Mesmo, de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizado** por que:

a sequência pelo menos parcialmente fosforotioada de unidades A e C alternadas é pelo menos 85% fosforotioada;

a sequência pelo menos parcialmente fosforotioada de unidades A e C alternadas tem um comprimento de sequência na faixa de 36 unidades a 44 unidades;

as unidades A compreendem pelo menos 18 unidades de 2'-OMe-A;

as unidades C compreendem pelo menos 15 unidades de LNA-5mC; e

o oligonucleotídeo modificado tem um valor EC50, que é determinado através do HBsAg Secretion Assay, que é menor que 30 nM.

66. Complexo de Oligonucleotídeo Modificado, conforme definido em qualquer uma das Reivindicações de 62 a 65, **caracterizado** por que o complexo é um complexo de íon indicador monovalente que compreende um complexo de sódio ou potássio do oligonucleotídeo modificado.

67. Composição Farmacêutica, **caracterizada** por que compreende

uma quantidade de oligonucleotídeo modificado ou complexo do mesmo, conforme definido em qualquer uma das Reivindicações de 1 a 66, que é eficiente para o tratamento de um indivíduo infectado com hepatite B; e um carreador farmacêuticamente aceitável.

68. Composição Farmacêutica, caracterizada por que compreende uma quantidade de oligonucleotídeo modificado ou complexo do mesmo, conforme definido em qualquer uma das Reivindicações de 1 a 66, que é eficiente para o tratamento de um indivíduo infectado com hepatite D; e um carreador farmacêuticamente aceitável.

69. Tratamento Para Hepatite B, Hepatite D ou Ambas, caracterizado por que compreende uma quantidade eficiente de oligonucleotídeo modificado ou complexo do mesmo, conforme definido em qualquer uma das Reivindicações de 1 a 66 ou a composição farmacêutica conforme definida na Reivindicação 67 ou 68.

70. Método de Tratamento de Hepatite B, caracterizado por que compreende a administração de uma quantidade eficiente de oligonucleotídeo modificado ou complexo do mesmo, conforme definido em qualquer uma das Reivindicações de 1 a 66, a composição farmacêutica conforme definida na Reivindicação 67 ou 68 ou o tratamento conforme definido na Reivindicação 71, a um indivíduo que necessita do mesmo.

71. Método de Tratamento de Hepatite B, de acordo com a Reivindicação 70, caracterizado por que o oligonucleotídeo modificado ou complexo do mesmo é administrado ao indivíduo através de uma rota parenteral.

72. Método de Tratamento de Hepatite B, de acordo com a Reivindicação 70, caracterizado por que o oligonucleotídeo modificado ou complexo do mesmo é administrado ao indivíduo de forma

intravenosa.

73. Método de Tratamento de Hepatite B, de acordo com a Reivindicação 70, **caracterizado** por que o oligonucleotídeo modificado ou complexo do mesmo é administrado ao indivíduo forma subcutânea.

74. Método de Tratamento de Hepatite B, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 70 a 73, **caracterizado** por que compreende ainda a administração de uma quantidade eficiente de um segundo tratamento para hepatite B ao indivíduo.

75. Método de Tratamento de Hepatite B, de acordo com a Reivindicação 74, **caracterizado** por que o segundo tratamento para hepatite B compreende um segundo oligonucleotídeo que tem atividade antiviral independente da sequência contra hepatite B, um oligonucleotídeo de siRNA, um oligonucleotídeo antissenso, um nucleosídeo, um interferon, um imunomodulador, um modulador de montagem do capsídeo ou uma combinação dos mesmos.

76. Método de Tratamento de Hepatite B, de acordo com a Reivindicação 75, **caracterizado** por que o segundo tratamento para hepatite B compreende um oligonucleotídeo antissenso.

77. Método de Tratamento de Hepatite B, de acordo com a Reivindicação 75, **caracterizado** por que o segundo tratamento para hepatite B compreende um modulador de montagem do capsídeo.

78. Método de Tratamento de Hepatite D, **caracterizado** por que compreende a administração de uma quantidade eficiente de oligonucleotídeo modificado ou complexo do mesmo, conforme definido em qualquer uma das Reivindicações de 1 a 66, a composição farmacêutica, conforme definida na Reivindicação 67 ou 68 ou o tratamento, conforme definido na Reivindicação 69, a um indivíduo que necessita do mesmo.

79. Método de Tratamento de Hepatite D, de acordo com a Reivindicação 78, **caracterizado** por que o oligonucleotídeo modificado ou complexo do mesmo é administrado ao indivíduo através de uma rota parenteral.

80. Método de Tratamento de Hepatite D, de acordo com a Reivindicação 78, **caracterizado** por que o oligonucleotídeo modificado ou complexo do mesmo é administrado ao indivíduo de forma intravenosa.

81. Método de Tratamento de Hepatite D, de acordo com a Reivindicação 78, **caracterizado** por que o oligonucleotídeo modificado ou complexo do mesmo é administrado ao indivíduo de forma subcutânea.

82. Método de Tratamento de Hepatite D, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 78 a 81, **caracterizado** por que compreende ainda a administração de uma quantidade eficiente de um segundo tratamento para hepatite D ao indivíduo.

83. Método de Tratamento de Hepatite D, de acordo com a Reivindicação 82, **caracterizado** por que o segundo tratamento para hepatite D compreende um segundo oligonucleotídeo que tem atividade antiviral independente da sequência contra hepatite D, um oligonucleotídeo antissenso, um nucleosídeo, um interferon, um modulador de montagem do capsídeo ou uma combinação dos mesmos.

84. Método de Tratamento de Hepatite D, de acordo com a Reivindicação 83, **caracterizado** por que o segundo tratamento para hepatite D compreende um oligonucleotídeo antissenso.

85. Método de Tratamento de Hepatite D, de acordo com a Reivindicação 83, **caracterizado** por que o segundo tratamento para hepatite D compreende um modulador de montagem do capsídeo.

86. Método de Tratamento de Hepatite B ou Hepatite D, caracterizado por que compreende a administração de forma subcutânea de uma quantidade eficiente de um oligonucleotídeo antiviral ou complexo do mesmo a um indivíduo que necessita do mesmo, em que a atividade antiviral do oligonucleotídeo ocorre principalmente através de um modo de ação independente da sequência.

87. Método de Tratamento de Hepatite B ou Hepatite D, de acordo com a Reivindicação 86, **caracterizado** por que o oligonucleotídeo antiviral é REP 2139, REP 2055, REP 2165 ou um complexo quelado do mesmo.

88. Método de Tratamento de Hepatite B ou Hepatite D, de acordo com a Reivindicação 86, **caracterizado** por que o oligonucleotídeo antiviral é o oligonucleotídeo modificado ou complexo do mesmo, conforme definido em qualquer uma das Reivindicações de 1 a 66, a composição farmacêutica, conforme definida na Reivindicação 67 ou 68 ou o tratamento, conforme definido na Reivindicação 69.

89. Método de Tratamento de Hepatite B ou Hepatite D, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 86 a 88, **caracterizado** por que compreende a administração de forma subcutânea de uma quantidade segura e eficiente do oligonucleotídeo antiviral ou complexo do mesmo a um indivíduo humano que necessita da mesma, a uma dosagem menor que a de outra maneira esperada com base nos níveis no fígado observados após a administração intravenosa comparável de outra maneira.

90. Oligonucleotídeo Modificado ou Complexo do Mesmo, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 1 a 66, **caracterizado** por que é para uso no tratamento de hepatite B.

91. Oligonucleotídeo Modificado ou Complexo do Mesmo, de acordo

com qualquer uma das Reivindicações de 1 a 66, **caracterizado** por que é para uso no tratamento de hepatite D.

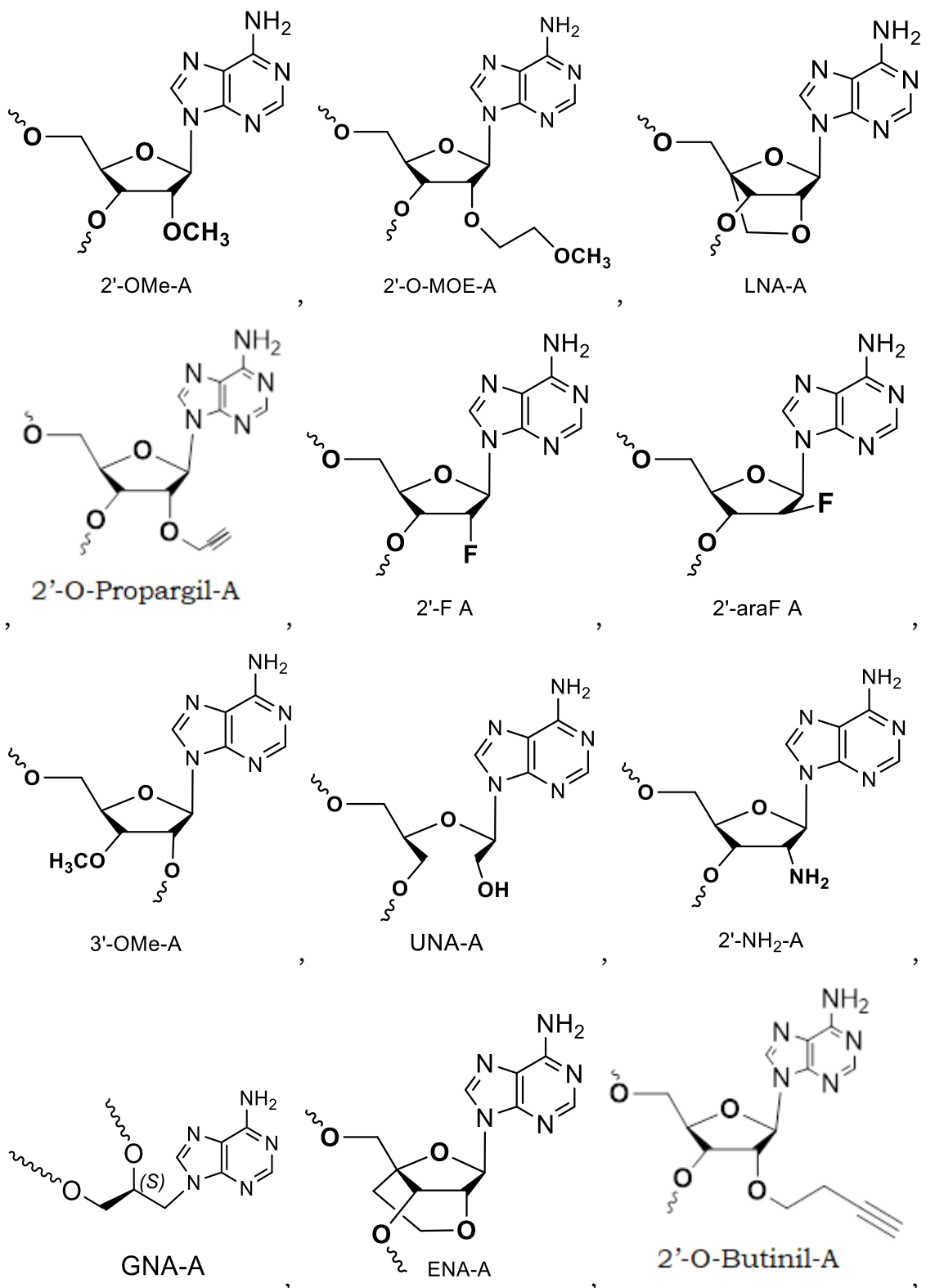
92. Uso do Oligonucleotídeo Modificado ou Complexo do Mesmo, conforme definido em qualquer uma das Reivindicações de 1 a 66, **caracterizado** por que é na preparação de um medicamento para o tratamento da hepatite B.

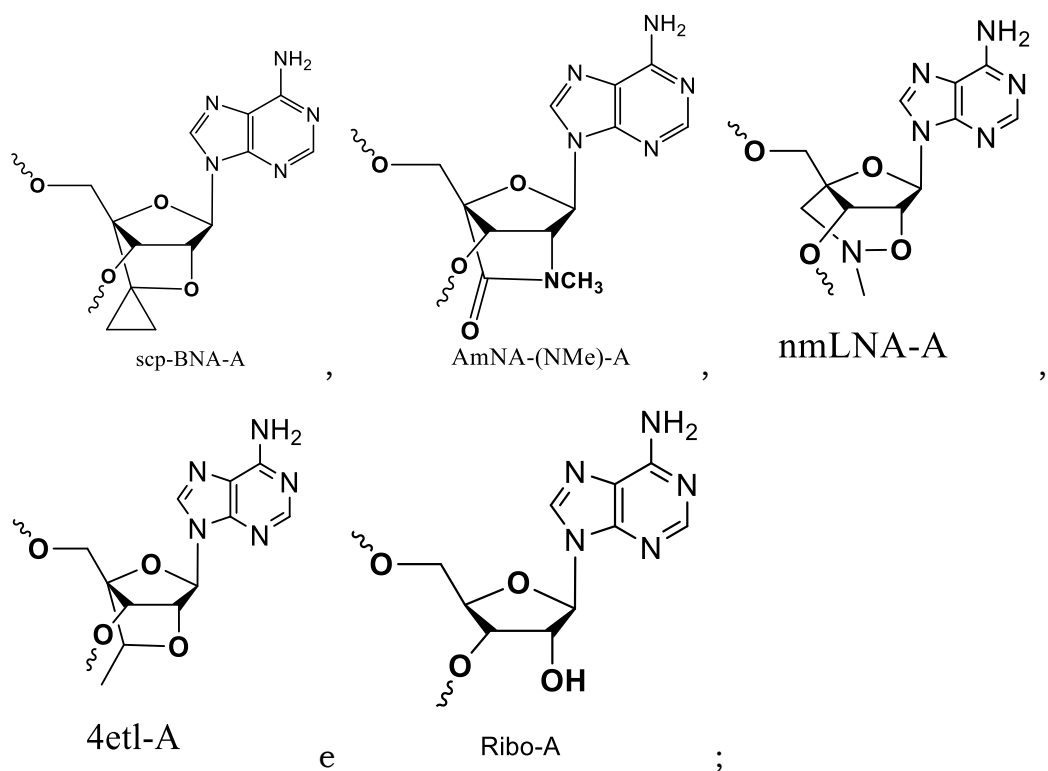
93. Uso do Oligonucleotídeo Modificado ou Complexo do Mesmo, conforme definido em qualquer uma das Reivindicações de 1 a 66, **caracterizado** por que é na preparação de um medicamento para o tratamento da hepatite D.

94. Oligonucleotídeo Modificado ou Complexo do Mesmo, de acordo com a Reivindicação 90 ou 91 ou o uso, conforme definido na Reivindicação 92 ou 93, **caracterizado** por que o uso compreende a administração de forma subcutânea de uma quantidade segura e eficiente do oligonucleotídeo antiviral ou complexo do mesmo a um indivíduo humano que necessita da mesma, a uma dosagem menor que a de outra maneira esperada com base nos níveis no fígado observados após a administração intravenosa comparável de outra maneira.

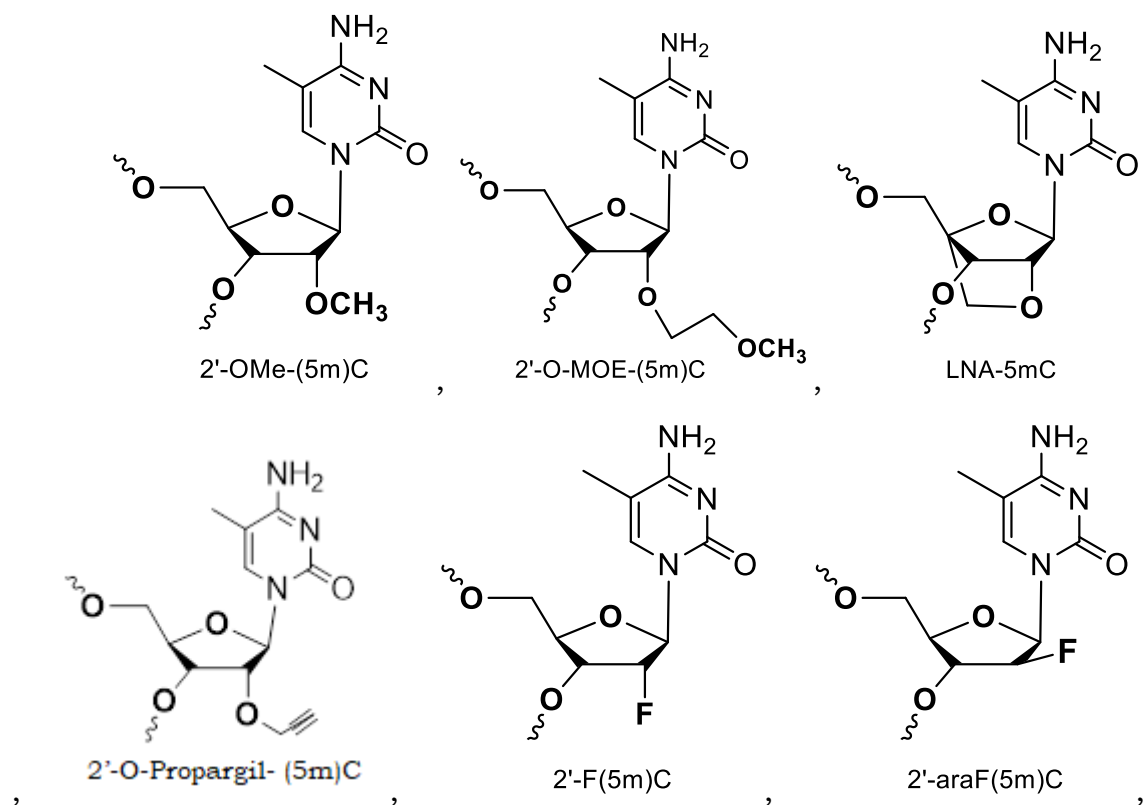
95. Dinucleotídeo, que consiste numa unidade A e uma unidade C conectadas através da ligação fosforotioato definida estereoquimicamente, **caracterizado** por que:

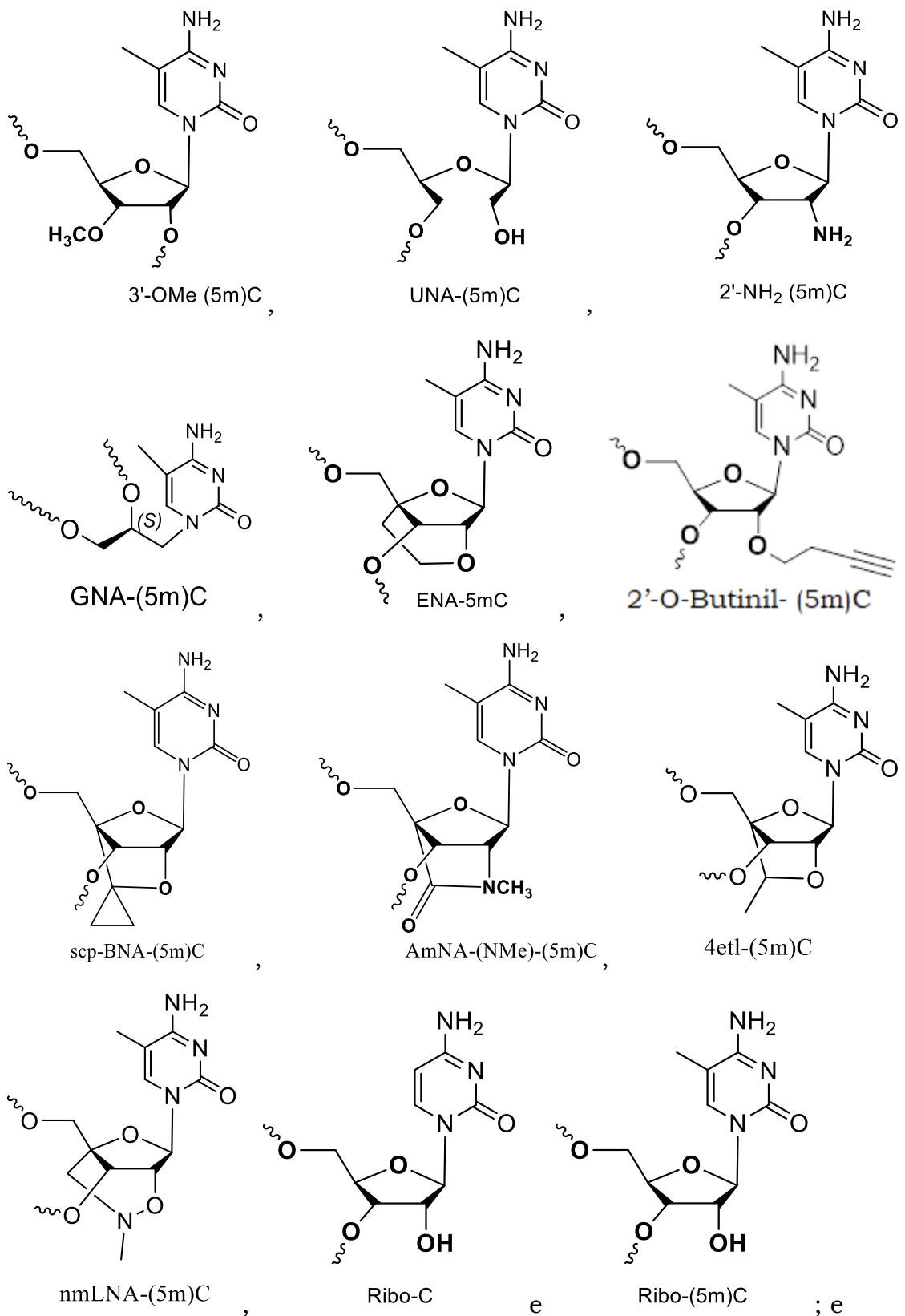
as unidades A compreendem uma ou mais selecionadas a partir de:





as unidades C compreendem uma ou mais selecionadas a partir de





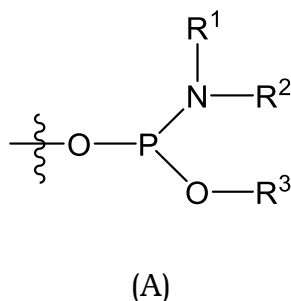
cada $\sim\text{O}$ é independentemente hidroxila, um fosforotioato

de O,O-dihidrogênio, uma fosforamidita, um éter dimetoxitritílico ou a ligação fosforotioato definida estereoquimicamente.

96. Dinucleotídeo, de acordo com a Reivindicação 95, **caracterizado** por que é com a condição de que o dinucleotídeo deixa de compreender ambas a unidade de Ribo-A e a unidade Ribo-C.

97. Dinucleotídeo, de acordo com a Reivindicação 95, **caracterizado** por que é selecionado a partir dos dinucleotídeos que compreendem ou consistem em quaisquer dois dos monômeros de blocos de construção descritos nas Tabelas 4 e 5.

98. Dinucleotídeo, de acordo com a Reivindicação 95 ou 96, **caracterizado** por que um $\sim\text{O}$ é uma fosforamidita da fórmula (A) a seguir:

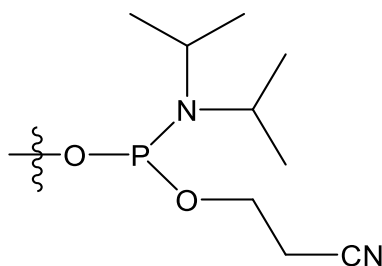


em que:

R^1 e R^2 são cada um individualmente um C_{1-6} alquila; e

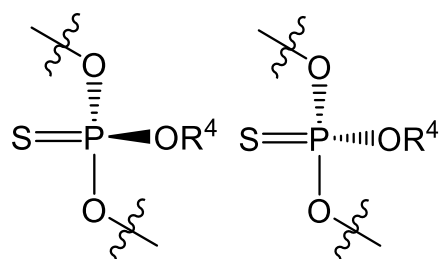
R^3 é um C_{1-6} alquila ou um ciano C_{1-6} alquila.

99. Dinucleotídeo, de acordo com a Reivindicação 98, **caracterizado** por que a fosforamidita da fórmula (A) é uma fosforamidita da fórmula (A1) a seguir:



(A1).

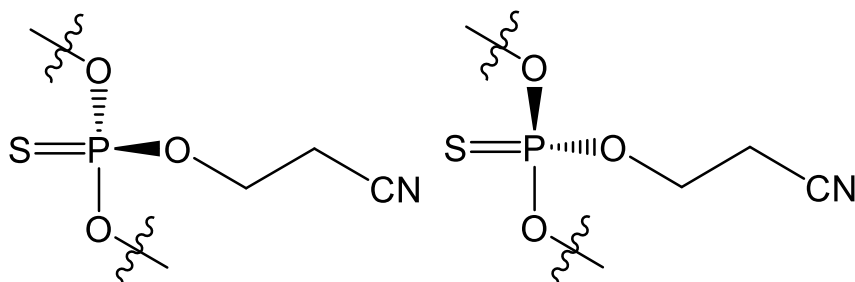
100. Dinucleotídeo, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 95 a 99, **caracterizado** por que a ligação fosforotioato definida estereoquimicamente é um fosforotioato da Fórmula (B1) ou (B2) a seguir:



(B1) (B2)

em que R⁴ é um C₁₋₆ alquila ou um cianoC₁₋₆ alquila.

101. Dinucleotídeo, de acordo com a Reivindicação 100, **caracterizado** por que o fosforotioato da fórmula (B1) é um fosforotioato da fórmula (B3) ou o fosforotioato da fórmula (B2) é um fosforotioato da fórmula (B4), como a seguir:



(B3) (B4).

102. Método de Produção de Oligonucleotídeo Modificado, conforme definido em qualquer uma das Reivindicações de 1 a 66, **caracterizado** por que compreende o acoplamento do dinucleotídeo, conforme definido em qualquer uma das Reivindicações de 95 a 101.

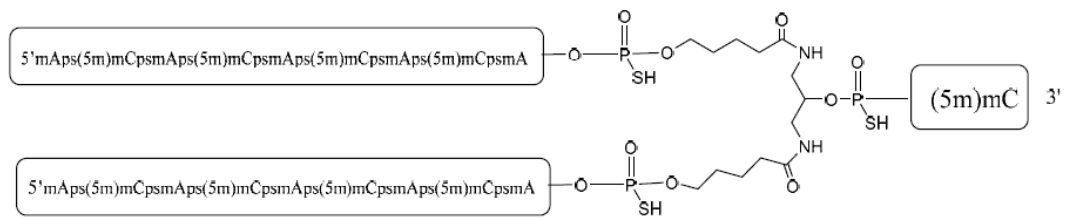
FIGURA 1

FIGURA 2

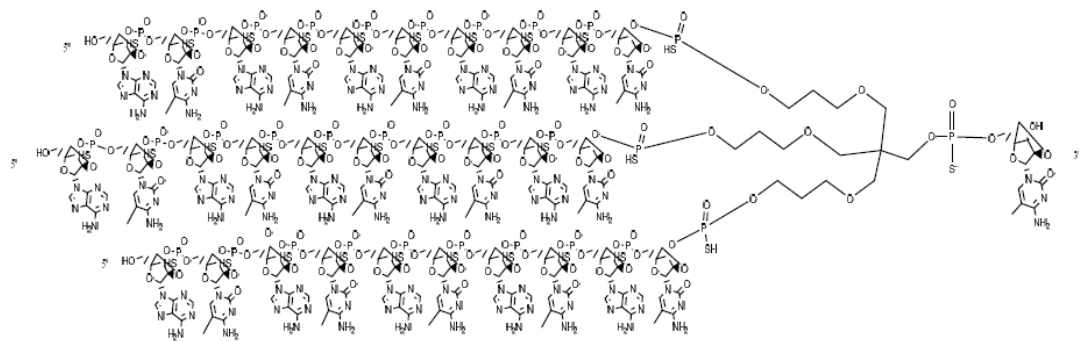


FIGURA 3A

5'-Colesterol ligado através do Ligante TEG

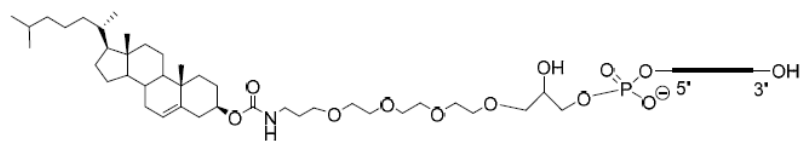


FIGURA 3B

3'-Colesterol ligado através do Ligante TEG

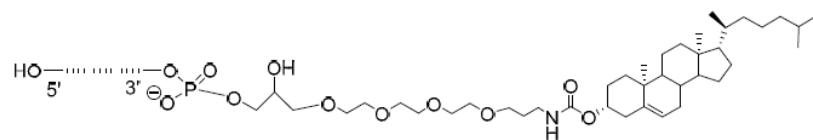


FIGURA 3C

5'-Vitamina E ligada através do ligante TEG

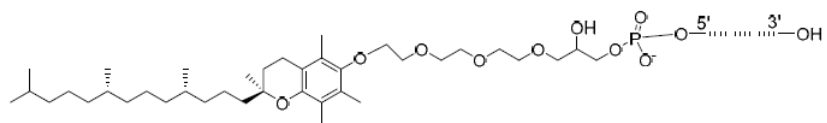


FIGURA 3D

3'-Vitamina E ligada através do ligante TEG

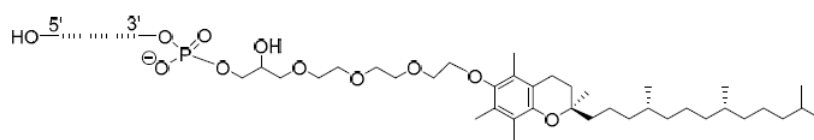


FIGURA 4A

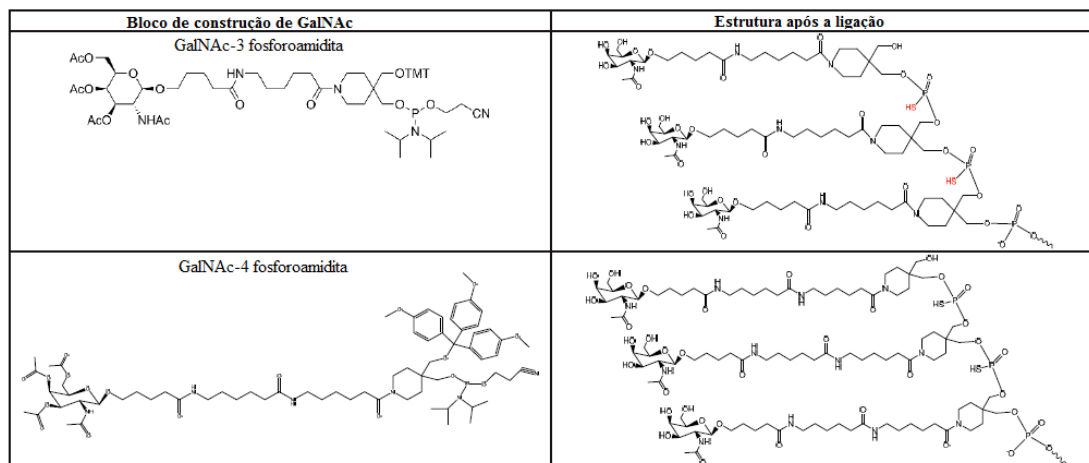


FIGURA 4A (continuação)

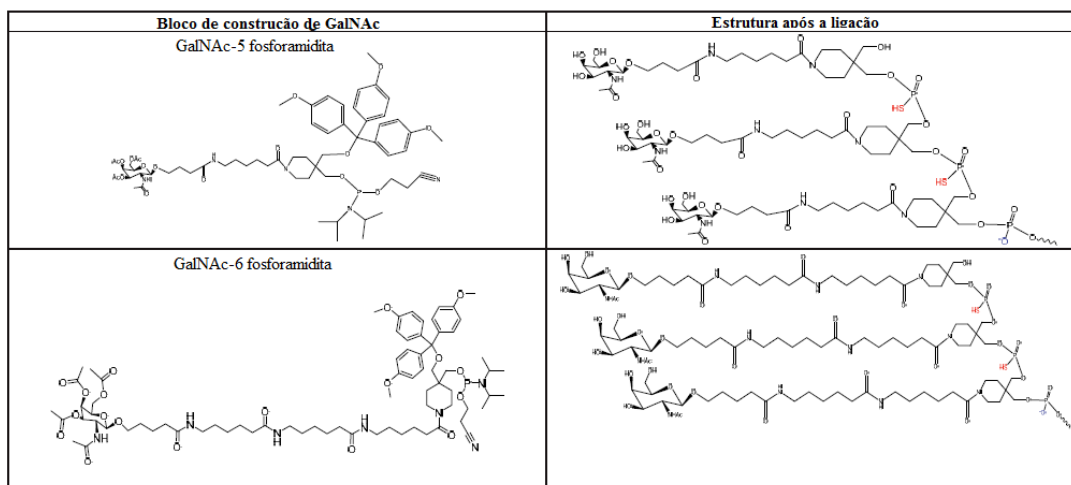
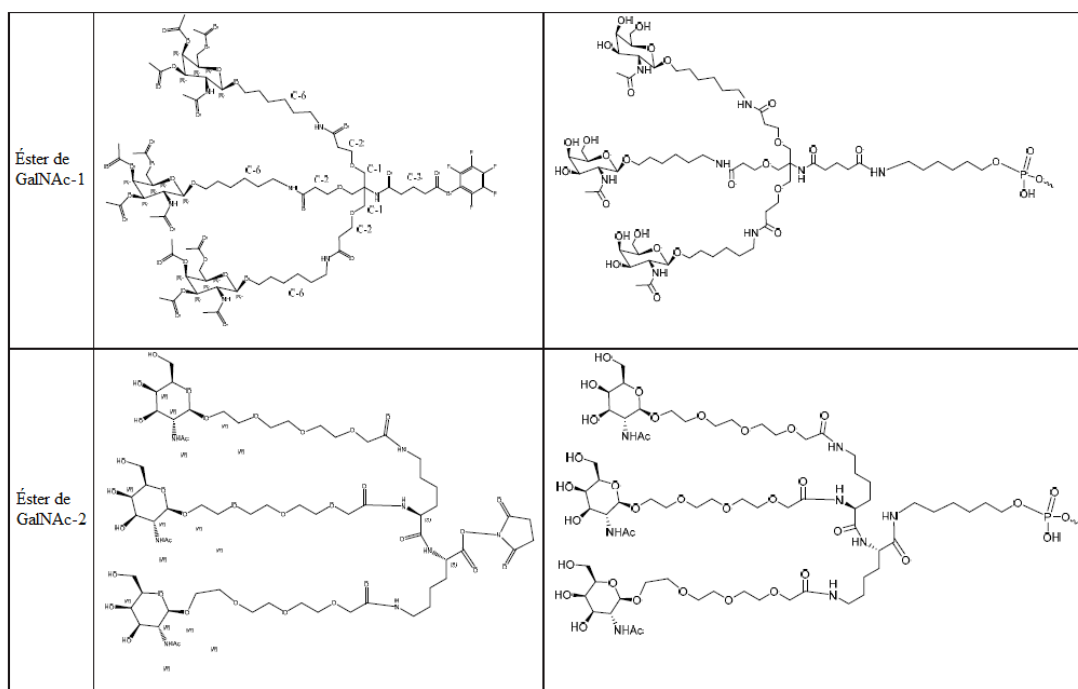


FIGURA 4B



bloco de construção de 5'-IP

No.	Estrutura do Composto (5' para 3')	EC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)	Comentários
282	5'-mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)C	Control	A	PS 40mer Tudo 2'-OMe
283	5'InApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)C	AAAA	A	PS 40mer Tudo LNA PS
284	5'mApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)C	AAAA	A	PS 40mer 2'-OMe/LNA Alternados
285	5'VPmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)C	AAAA		PS 40mer 2'-OMe/LNA Alternados endcap de 5'-VP

FIGURA 6A (continuação)

No.	Estrutura do Composto (5' para 3')	EC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)	Comentários
286	5'-mApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsln(5m)C 3'	AAA		PS 40mer 2'-OMe; 13 LNA (cada 3ª base)
287	5'-VPmApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsln(5m)C 3'	AAAA	A	PS 40mer 2'-OMe; 13 LNA (cada 3ª base) endcap de 5'-VP
288	5'-mApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)C 3'	AAAA	A	PS 40mer 2'-OMe; 10 LNA (cada 4ª base)
289	5'-VP-mApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)C 3'	AAAA	A	PS 40mer 2'-OMe; 10 LNA (cada 4ª base) endcap de 5'-VP

FIGURA 6A (continuação)

No.	Estrutura do Composto (5' para 3')	EC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)	Comentários
290	5'-mApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)C 3'	AA	A	PS 40mer isômero 20 R blocos de dímero
291	5'-VPmApsm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)C 3'	AAAA	A	PS 40mer isômero 19 R blocos de dímero; 1 m(5m)C endcap de 5'-VP
292	5'-mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)C 3'	AAA	A	PS 40mer 2'-OMe; 5 LNA
293	5'-VPmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)C 3'	AAAA	A	PS 40mer 2'-OMe; 5 LNA endcap de 5'-VP

Petição 870210046953, de 24/05/2021, pág. 194/223

Petição 870210046953, de 24/05/2021, pág. 194/223

Petição 870210046953, de 24/05/2021, pág. 194/223

Petição 870210046953, de 24/05/2021, pág. 194/223

Petição 870210046953, de 24/05/2021, pág. 194/223

Petição 870210046953, de 24/05/2021, pág. 194/223

FIGURA 6B (continuação)

No.	Estrutura do Composto (5' para 3')	EC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)
370	5' mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps m(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)C 3'	D	A
345	5' unApsun(5m)CpsunApsun(5m)CpsunApsun(5m)CpsunApsun(5m)CpsunApsun(5m)C psunApsun(5m)CpsunApsun(5m)CpsunApsun(5m)CpsunAps un(5m)CpsunApsun(5m)CpsunApsun(5m)CpsunApsun(5m)CpsunAps un(5m)CpsunApsun(5m)CpsunApsun(5m)CpsunApsun(5m)CpsunAps un(5m)CpsunApsun(5m)CpsunApsun(5m)CpsunApsun(5m)C 3'	B	A
346	5' mApsun(5m)CpsmApsun(5m)CpsmApsun(5m)CpsmApsun(5m)CpsmAps un(5m)CpsmApsun(5m)CpsmApsun(5m)CpsmApsun(5m)CpsmApsun(5m)CpsmAps un(5m)CpsmApsun(5m)CpsmApsun(5m)CpsmApsun(5m)CpsmAps un(5m)CpsmApsun(5m)CpsmApsun(5m)CpsmApsun(5m)CpsmApsun(5m)CpsmAps un(5m)C 3'	A	A
351	5' InApspr(5m)CpsInApspr(5m)CpsInApspr(5m)CpsInApspr(5m)CpsInApspr (5m)CpsInApspr(5m)CpsInApspr(5m)CpsInApspr(5m)CpsInApspr(5m)Cps InApspr(5m)CpsInApspr(5m)CpsInApspr(5m)CpsInApspr(5m)CpsInApspr (5m)CpsInApspr(5m)CpsInApspr(5m)CpsInApspr(5m)CpsInApspr(5m)Cps InApspr(5m)CpsInApspr(5m)C-Cholesterol 3'	D	B
352	5' InApspr(5m)CpsInApspr(5m)CpsInApspr(5m)CpsInApspr(5m)CpsInApspr (5m)CpsInApspr(5m)CpsInApspr(5m)CpsInApspr(5m)CpsInApspr(5m)Cps InApspr(5m)CpsInApspr(5m)CpsInApspr(5m)CpsInApspr(5m)CpsInApspr (5m)CpsInApspr(5m)CpsInApspr(5m)CpsInApspr(5m)CpsInApspr(5m)Cps InApspr(5m)CpsInApspr(5m)C-Palmitoyl 3'	D	B
373	5' InApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpslnApsln(5m)C 3'	B	B

FIGURA 6B (continuação)

No.	Estrutura do Composto (5' para 3')	EC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)
308	5' InApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApolln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpolnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApolln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpolnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApolln(5m)CpslnAps ln(5m)CpslnApsln(5m)C 3'	C	A
239	5' mAprsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps DBLR-ps-c4-CONH-c2-psm(5m)C 3' mAprsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmA 5'	D	A
235	5' lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps-DBLR-ps-c4-CONH-c2-psln(5m)C 3' lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnA 5'	D	B
236	5' lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps-DBLR-ps-c4-CONH-c2-psm(5m)C 3' lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps 5'	D	B
237	5' lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps lnApsln(5m)Cps-DBLR-ps-c4-CONH-c2-psm(5m)C 3' 5' lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps lnApsln(5m)C 5'	A	B
301	5' lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsrApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsrCps lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsrApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsrCps lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsrApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsrCps lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsrApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)C 3'	A	B

FIGURA 6B (continuação)

No.	Estrutura do Composto (5' para 3')	EC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)
303	5' lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsrApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsrCps lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsrApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsrCps lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsrApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)C 3'	B	B
305	5' lnApsln(5m)CpolnApsln(5m)CpolnApsln(5m)CpolnApsln(5m)CpolnAps ln(5m)CpolnApsln(5m)CpolnApsln(5m)CpolnApsln(5m)CpolnApsln(5m)C polnApsln(5m)CpolnApsln(5m)CpolnApsln(5m)CpolnApsln(5m)CpolnAps ln(5m)CpolnApsln(5m)CpolnApsln(5m)CpolnApsln(5m)CpolnApsln(5m)C polnApsln(5m)CpolnApsln(5m)C 3'	C	A
309	5' lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApohn(5m)CpolnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpolnApohn(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApohn(5m)CpolnApsln(5m)C pslnApsln(5m)CpolnApohn(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApohn(5m)CpolnAps ln(5m)CpslnApsln(5m)C 3'	D	B
297	5' mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsrApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsrCps mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsrApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsrCps mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsrApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsrCps mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsrApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps m(5m)C 3'	C	A
298	5' mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsrApsrCpsmApsm(5m)CpsmApsr(5m)CpsrApsm(5m) CpsmApsm(5m)CpsrApsrCpsmApsm(5m)CpsmApsrCpsrAps m(5m)CpsmApsm(5m)CpsrApsrCpsmApsm(5m)CpsmApsrCporApsm(5m)CpsmAps m(5m)CpsrApsrCpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)C 3'	D	A
300	5' mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsrApsrCpsmApsm(5m)CpsmApsrCpsrAps m(5m)CpsmApsm(5m)CpsrApsrCpsmApsm(5m)CpsmApsrCpsrApsm(5m)CpsmAps m(5m)CpsrApsrCpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)C 3'	D	A

FIGURA 6B (continuação)

No.	Estrutura do Composto (5' para 3')	EC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)
312	5' mApSm(5m)CpsmApSm(5m)CpsmApom(5m)CpsmApSm(5m)CpsmApS m(5m)CpomApSm(5m)CpsmApSm(5m)CpsmApom(5m)CpsmApSm(5m)CpsmApSm(5m)CpomApSm(5m)CpsmApSm(5m)CpsmApom(5m)CpsmApS m(5m)CpsmApSm(5m)C 3'	D	A
313	5' mApSm(5m)CpsmApSm(5m)CpsmApom(5m)CpomApSm(5m)CpsmApS m(5m)CpomApom(5m)CpsmApSm(5m)CpsmApom(5m)CpomApSm(5m)C psmApSm(5m)CpomApom(5m)CpsmApSm(5m)CpsmApom(5m)CpomApS m(5m)CpsmApSm(5m)C 3'	D	A
299	5' mApSm(5m)CpsmApSm(5m)CpsrApSm(5m)CpsmApSm(5m)CpsmApSrCps mApSm(5m)CpsmApSm(5m)CpsrApSm(5m)CpsmApSm(5m)CpsmApSrCps mApSm(5m)CpsmApSm(5m)CpsrApSm(5m)CpsmApSm(5m)CpsmApS m(5m)C 3'	D	A
304	5' lnApSlm(5m)CpslnApSlm(5m)CpsrApSrCpslnApSlm(5m)CpslnApSrCpsrApS ln(5m)CpslnApSlm(5m)CpsrApSrCpslnApSlm(5m)CpslnApSrCpsrApSlm(5m)CpslnApSl n(5m)CpsrApSrCpslnApSlm(5m)CpslnApSlm(5m)C 3'	D	A
302	5' lnApSlm(5m)CpslnApSlm(5m)CpsrApSrCpslnApSlm(5m)CpslnApSr(5m)CpsrApSlm(5m) CpslnApSlm(5m)CpsrApSrCpslnApSlm(5m)CpslnApSrCpsrApS ln(5m)CpslnApSlm(5m)CpsrApSrCpslnApSlm(5m)CpslnApSrCpsrApSlm(5m)CpslnApSl n(5m)CpsrApSrCpslnApSlm(5m)CpslnApSlm(5m)C 3'	D	A
307	5' lnApSlm(5m)CpslnApSlm(5m)CpslnApolm(5m)CpolnApSlm(5m)CpslnApS ln(5m)CpolnApolm(5m)CpslnApSlm(5m)CpslnApolm(5m)CpolnApSlm(5m)C pslnApSlm(5m)CpolnApolm(5m)CpslnApSlm(5m)CpslnApolm(5m)CpolnApS ln(5m)CpslnApSlm(5m)CpolnApolm(5m)CpslnApSlm(5m)CpslnApolm(5m)C polnApSlm(5m)CpslnApSlm(5m)C 3'	D	A

FIGURA 6B (continuação)

No.	Estrutura do Composto (5' para 3')	EC ₅₀ (μ M)	CC ₅₀ (μ M)
375	5' mApsSm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps m(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsSm(5m)C psmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsSm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)C psmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsSm(5m)C psmApsm(5m)CpsmApsm(5m)C 3'	B	A
201	5' mApsSm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps m(5m)CpsmApsSm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsSm(5m)CpsmAps m(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsSm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps m(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsSm(5m)C psmApsm(5m)CpsmApsm(5m)C 3'	C	A
202	5' mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsSm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps m(5m)CpsmApsSm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsSm(5m)CpsmAps m(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsSm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps m(5m)CpsmApsSm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsSm(5m)CpsmAps m(5m)CpsmApsm(5m)C 3'	C	A
203	5' mApsSm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsSm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps m(5m)CpsmApsSm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsSm(5m)CpsmAps m(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsSm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps m(5m)CpsmApsSm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsSm(5m)CpsmAps m(5m)CpsmApsm(5m)C 3'	B	A
204	5' mApsSm(5m)CpsmApsSm(5m)CpsmApsSm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)Cp smApsSm(5m)CpsmApsSm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsS m(5m)CpsmApsSm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsSm(5m)CpsmApsS m(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsSm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)C psmApsSm(5m)CpsmApsSm(5m)CpsmApsm(5m)C 3'	D	A

FIGURA 6B (continuação)

No.	Estrutura do Composto (5' para 3')	EC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)
205	5' mApsSm(5m)CpsmApsSm(5m)CpsmApsSm(5m)CpsmApsSm(5m)CpsmApsSm(5m) CpsmApsSm(5m)CpsmApsSm(5m)CpsmApsSm(5m)CpsmApsS m(5m)CpsmApsSm(5m)CpsmApsSm(5m)CpsmApsSm(5m)CpsmApsS m(5m)CpsmApsSm(5m)CpsmApsSm(5m)CpsmApsSm(5m)CpsmApsS m(5m)CpsmApsSm(5m)CpsmApsSm(5m)CpsmApsSm(5m)/C 3'	D	A
353	5' 3mAps3m(5m)Cps3mAps3m(5m)Cps3mAps3m(5m)Cps3mAps3m(5m)Cps 3mAps3m(5m)Cps3mAps3m(5m)Cps3mAps3m(5m)Cps3mAps3m(5m)Cps 3mAps3m(5m)Cps3mAps3m(5m)Cps3mAps3m(5m)Cps3mAps3m(5m)Cps 3mAps3m(5m)Cps3mAps3m(5m)Cps3mAps3m(5m)Cps3mAps3m(5m)Cps 3mAps3m(5m)Cps3mAps3m(5m)Cps3mAps3m(5m)Cps3mAps3m(5m)/C 3'	B	A
351	5' 3mAps3m(5m)Cps3mAps3m(5m)Cps3mAps3m(5m)Cps3mAps3m(5m)Cps 3mAps3m(5m)Cps3mAps3m(5m)Cps3mAps3m(5m)Cps3mAps3m(5m)Cps 3mAps3m(5m)Cps3mAps3m(5m)Cps3mAps3m(5m)Cps3mAps3m(5m)Cps 3mAps3m(5m)Cps3mAps3m(5m)Cps3mAps3m(5m)Cps3mAps3m(5m)Cps 3mAps3m(5m)Cps3mAps3m(5m)Cps3mAps3m(5m)Cps3mAps3m(5m)C-Cholesterol 3'	D	A
352	5' 3mAps3m(5m)Cps3mAps3m(5m)Cps3mAps3m(5m)Cps3mAps3m(5m)Cps 3mAps3m(5m)Cps3mAps3m(5m)Cps3mAps3m(5m)Cps3mAps3m(5m)Cps 3mAps3m(5m)Cps3mAps3m(5m)Cps3mAps3m(5m)Cps3mAps3m(5m)Cps 3mAps3m(5m)Cps3mAps3m(5m)Cps3mAps3m(5m)Cps3mAps3m(5m)Cps 3mAps3m(5m)Cps3mAps3m(5m)Cps3mAps3m(5m)Cps3mAps3m(5m)C-Tocopherol 3'	D	A
178	5' mApsRm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps m(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsRm(5m)C psmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsSm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsm(5m)C psmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsRm(5m)C psmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)C 3'	A	A

FIGURA 6B (continuação)

[illegible]

FIGURA 6B (continuação)

No.	Estrutura do Composto (5' para 3')	EC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)
177	5' mApsRm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps m(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsRm(5m)C psmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsSm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsm(5m)C psmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsRm(5m)C psmApsm(5m)C 3'	B	A
374	5' mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps m(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmA 3'	D	A
363	5' mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps m(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps m(5m)C 3'	D	A
364	5' mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps m(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps m(5m)CpsmApsm(5m)CpsmA-3'	D	A
365	5' mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps m(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps m(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)C 3'	D	A
366	5' mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps m(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps m(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmA 3'	D	A
13	5' mApsmoE(5m)CpsmApsmoE(5m)CpsmApsmoE(5m)CpsmApsmoE(5m)Cps mApsmoE(5m)CpsmApsmoE(5m)CpsmApsmoE(5m)CpsmApsmoE(5m)Cps mApsmoE(5m)CpsmApsmoE(5m)CpsmApsmoE(5m)CpsmApsmoE(5m)Cps mApsmoE(5m)CpsmApsmoE(5m)CpsmApsmoE(5m)CpsmApsmoE(5m)Cps mApsmoE(5m)CpsmApsmoE(5m)CpsmApsmoE(5m)CpsmApsmoE(5m)Cp 3'	D	A

FIGURA 6B (continuação)

No.	Estrutura do Composto (5' para 3')	EC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)
238	5' mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps-DBLR-ps-c4-CONH-c2-psm(5m)C 3'-5' mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)C 5'	D	A
240	5' mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps m(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)Cps-DBLR-ps-c4-CONH-c2-ps(5m)mC 3'-5' mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps m(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)C 5'	B	A
241	5' lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)Cps-TREB-ps-c3-O-C3-ps(5m)mC 3' lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps lnApsln(5m)Cps 5'	B	A
242	5' lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps-TREB-ps-c3-O-C3-psm(5m)C 3' lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps 5' lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps 5'	A	A
243	5' lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnA-TREB-ps-c3-O-C3-psm(5m)C 3'-5' lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAln(5m)CpslnApsln(5m)Cps lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnA 5'	A	A

FIGURA 6B (continuação)

[illegible]

FIGURA 6B (continuação)

[illegible]

FIGURA 6B (continuação)

No.	Estrutura do Composto (5' para 3')	EC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)
327	5' moeApsmoe(5m)CpsmoeApsmoe(5m)CpsmoeApsmoe(5m)CpsmoeAps moe(5m)CpsmoeApsmoe(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps moe(5m)CpsmoeApsmoe(5m)CpsmoeApsmoe(5m)CpsmoeApsmoe(5m)CpsmoeAps moe(5m)CpsmoeApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps moeApsmoe(5m)CpsmoeApsmoe(5m)CpsmoeApsmoe(5m)CpsmoeAps moe(5m)CpsmoeApsmoe(5m)C 3'	D	A
328	5' lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsmoe(5m)CpsmoeApsmoe(5m)Cps moeApsmoe(5m)CpsmoeApsmoe(5m)CpsmoeApsmoe(5m)CpsmoeAps ln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsmoeApsmoe(5m)CpsmoeAps moe(5m)CpsmoeApsmoe(5m)CpsmoeApsmoe(5m)CpsmoeApsmoe(5m)Cps lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsmoe(5m)CpsmoeApsmoe(5m)Cps moeApsmoe(5m)C 3'	D	A
158	5' lnApsun(5m)CpslnApsun(5m)CpslnApsun(5m)CpslnApsun(5m)CpslnAps un(5m)CpslnApsun(5m)CpslnApsun(5m)CpslnApsun(5m)CpslnApsun(5m)CpslnAps un(5m)CpslnApsun(5m)CpslnApsun(5m)CpslnApsun(5m)CpslnAps un(5m)CpslnApsun(5m)C 3'	B	A
150	5' unApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunAps ln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsl n(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunAps ln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsl n(5m)CpsunApsln(5m)C 3'	A	A
159	5' lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsunApsun(5m)CpsunApsun(5m)CpslnAps ln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsun(5m)CpsunApsun(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsl n(5m)CpsunApsun(5m)CpsunApsun(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpsunApsun(5m)CpsunApsun(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsunAps un(5m)CpsunApsun(5m)C 3'	C	A

FIGURA 6B (continuação)

[illegible]

FIGURA 6B (continuação)

[illegible]

FIGURA 6B (continuação)

No.	Estrutura do Composto (5' para 3')	EC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)
334	5' lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)/CpsAps(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps(5m)CpsApsln(5 m)CpslnApsln(5m)CpsAps(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps(5m)CpsApsln(5m)CpslnA psln(5m)CpsAps(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps(5m)CpsApsln(5m)CpslnApsln(5m)C psrAps(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)C 3'	B	A
335	5' lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps(5m)CpslnApsl n(5m)CpslnApsln(5m)CpsApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps (5m)CpolnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m) C 3'	C	A
336	5' lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsAps(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps(5m)CpsApsln(5 m)CpslnApsln(5m)CpsAps(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps(5m)CpsApsln(5m)CpslnA psln(5m)CpsAps(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)C 3'	C	A
337	5' lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpslnApsln(5m))CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsAps(5m)CpsA ps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)C 3'	A	B
338	5' lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps lnApsln(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5 m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)C 3'	B	B
117	5' lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)C 3'	B	A

FIGURA 6B (continuação)

[illegible]

FIGURA 6B (continuação)

No.	Estrutura do Composto (5' para 3')	EC ₅₀ (μ M)	CC ₅₀ (μ M)
192	5' InApsIn(5m)CpslnApsln(5m)CpsmApsRm(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpsmApsRln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsmApsR ln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsmApsRln(5m)CpslnApsln(5m)C pslnApsln(5m)CpsmApsRln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsmApsRln(5m)C pslnApsln(5m)CpslnApsm(5m)C 3'	B	A
210	5' mApsSm(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsmApsSm(5m)C pslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsmApsSm(5m)CpslnAps ln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsmApsSm(5m)C pslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)C 3'	B	A
211	5' mApsSm(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpsmApsSm(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsmApsSm(5m)CpslnAps ln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsmApsSm(5m)CpslnAps ln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsmApsSm(5m)C pslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)C 3'	B	A
212	5' InApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsmApsSm(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpsmApsSm(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsmApsSm(5m)CpslnAps ln(5m)CpslnApsln(5m)CpsmApsSm(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpsmApsSm(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsmApsSm(5m)CpslnAps ln(5m)CpslnApsln(5m)C 3'	B	A
218	5' mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsRln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps m(5m)CpsmApsRln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsR ln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsRln(5m)CpsmApsm(5m)C psmApsm(5m)CpsmApsRln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsRln(5m)C psmApsm(5m)CpsmApsm(5m)C 3'	C	A

FIGURA 6B (continuação)

No.	Estrutura do Composto (5' para 3')	EC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)
223	5' VP-mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsRln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps m(5m)CpsmApsRln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsR ln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsRln(5m)CpsmApsm(5m)C psmApsm(5m)CpsmApsRln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsRln(5m)/ C psmApsm(5m)CpsmApsm(5m)C 3'	C	A
221	5' mApsRln(5m)CpsmApsRln(5m)CpsmApsRln(5m)CpsmApsRln(5m)CpsmA psRln(5m)CpsmApsRln(5m)CpsmApsRln(5m)CpsmApsRln(5m)CpsmApsR ln(5m)CpsmApsRln(5m)CpsmApsRln(5m)CpsmApsRln(5m)CpsmApsR ln(5m)CpsmApsRln(5m)CpsmApsRlm(5m)CpsmApsRln(5m)CpsmApsR ln(5m)CpsmApsRln(5m)CpsmApsRln(5m)CpsmApsRln(5m)C 3'	A	A
127	5' VP-mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps m(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps m(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)C 3'	D	A
128	5' VP-mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps m(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps m(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)C 3'	C	A
129	5' VP-mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps m(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps m(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)C 3'	C	A
120	5' VP-mApIn(5m)CpsInApIn(5m)CpsInApIn(5m)CpsInApIn(5m)CpsInAps In(5m)CpsInApIn(5m)CpsInApIn(5m)CpsInApIn(5m)CpsInApIn(5m)Cps l nApIn(5m)CpsInApIn(5m)CpsInApIn(5m)CpsInApIn(5m)CpsInAps l n(5m)CpsInApIn(5m)CpsInApIn(5m)CpsInApIn(5m)C 3'	B	A

FIGURA 6B (continuação)

[illegible]

FIGURA 6B (continuação)

[illegible]

FIGURA 6B (continuação)

No.	Estrutura do Composto (5' para 3')	EC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)
294	5' VP-mApsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m) psmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)Cps mApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmA psRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)C psmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)C 3'	B	A
276, 291	5' VP- mApsm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m) CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsR m(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsR m(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsR m(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)C 3'	A	A
275, 295	5' VP-mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps m(5m)CpslnApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps m(5m)CpslnApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)C 3'	A	B
173, 293	5' VP-mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps m(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps m(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)C 3'	A	A
165, 287	5' VP-mApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpslnAps m(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpslnAps m(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)C 3'	B	A

FIGURA 6B (continuação)

No.	Estrutura do Composto (5' para 3')	EC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)
251	5' cpApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps(5m)CpsmAps m(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps m(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)C 3'	A	A
356	5' 4'-Me-mApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmAps ln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmAps ln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)C 3'	A	A
320	5' mApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmAps ln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmAps ln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)C 3'	A	A
357	5' mApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmAps m(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmAps m(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)C 3'	A	B
322	5' mApms(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmAps m(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps ln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)C 3'	B	A
317	5' EP-mApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmAps m(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps ln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)C 3'	A	B

FIGURA 6B (continuação)

No.	Estrutura do Composto (5' para 3')	EC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)
318	5' EP-mApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpslnAps m(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpslnAps m(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)C 3'	B	B
319	5' EP-mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps m(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps m(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)C 3'	A	B
315	5' EP- mApsm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m) CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsR m(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsR m(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsR m(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)C 3'	C	A
357	5' mApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmAps ln(5m)Cps3calApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)Cps3calAps ln(5m)Cps3calApsln(5m)CpsmApsln(5m)Cps3calApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsl n(5m)Cps3calApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)Cps3calA psln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)C 3'	A	A
347	5' GalNAc5mApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmAps ln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmAps ln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(Apsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)C 3'		

FIGURA 6B (continuação)

[illegible]

FIGURA 6B (continuação)

[illegible]

FIGURA 6B (continuação)

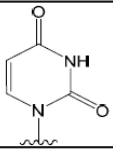
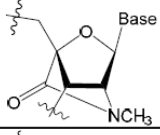
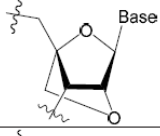
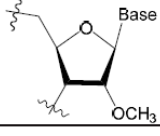
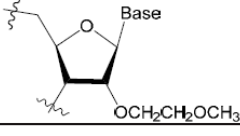
Abreviação	Nome	Estrutura
U	Uracil	
am	AmNA	
In	LNA	
m	2'-OMe	
moe	2'-MOE	

FIGURA 6B (continuação)

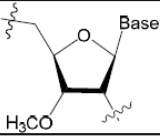
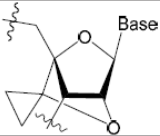
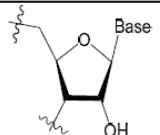
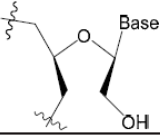
Abreviação	Nome	Estrutura
3m	3'-OMe	
cp	scp-BNA	
r	RNA	
un	acíclico	

FIGURA 6B (continuação)

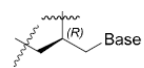
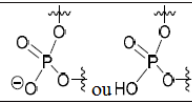
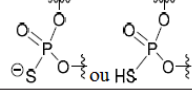
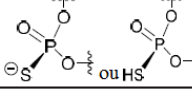
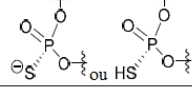
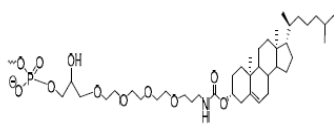
Abreviação	Nome	Estrutura
gn	GNA	
po	Fosfato	
ps	Fosforotioato	
psR	Fosforotioato com (R)-estereoquímica	
psS	Fosforotioato com (S)-estereoquímica	
3'-colesterol (CHOL)		

FIGURA 6B (continuação)

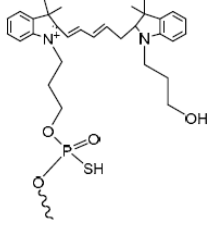
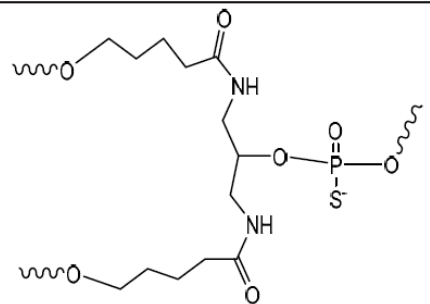
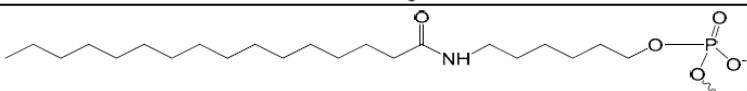
Abreviação	Nome	Estrutura
Cy5		
DBLR-ps-c4-CONH-c2		
Palmitoil		

FIGURA 6B (continuação)

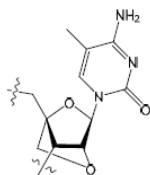
Abreviação	Nome	Estrutura
Tocopherol		
TREB-ps-c3-O-C3		
GalNAc5		
EP	Endcap de fosfonato de 5'-etila	

FIGURA 6B (continuação)

Abreviação	Nome	Estrutura
P		
VP		
4'-Me	4'-Me-2-OMe-A	
3cal	3'-C-alil-A	
4etl		

FIGURA 6B (continuação)

Por exemplo, utilizando as abreviações e as estruturas da Tabela A, um perito na técnica entende que a abreviação



"In(5m)C" representa o seguinte:

FIGURA 7

Preparação de bis(2,2-dimetilpropanoato) de (((E)-2-((2R,3R,4R,5R)-5-(6-benzamido-9H-purin-9-yl)-3-((2-cianoetóxi)(diisopropilamino)fosfino)óxi-4-metoxitetrahidrofuran-2-yl)vinil)fosforil)bis(óxi)bis(metileno) (5VP)

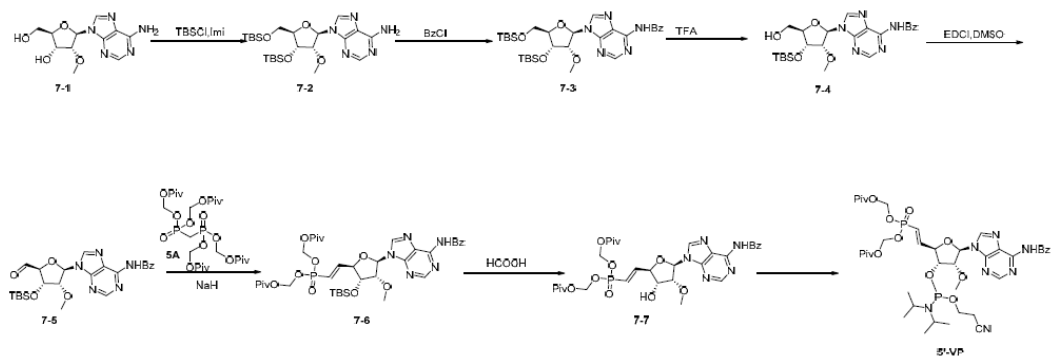


FIGURA 8

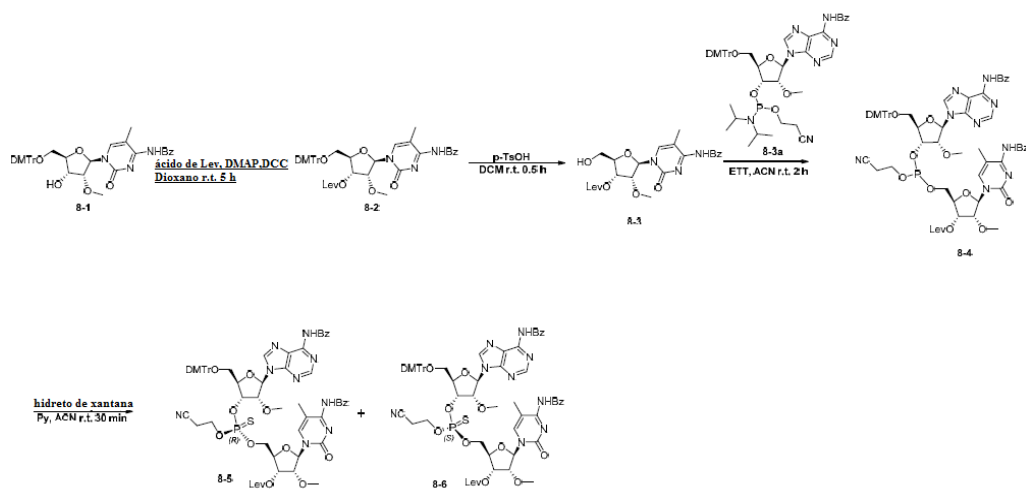


FIGURA 9A

Preparação de (2R,3R,4R,5R)-5-(4-benzamido-5-metil-2-oxopirimidin-1(2H)-il)-2-(((R)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(6-benzamido-9H-purin-9-yl)-2-((bis(4-metoxifenil)(fenil)metóxi)metil)-4-metoxitetrahydrofuran-3-yl)óxi)(2-cianoetóxi)fosforotioil)óxi)metil)-4-metoxitetrahydrofurano-3-yl(2-cianoetil) diisopropilfosforamidata (9R)

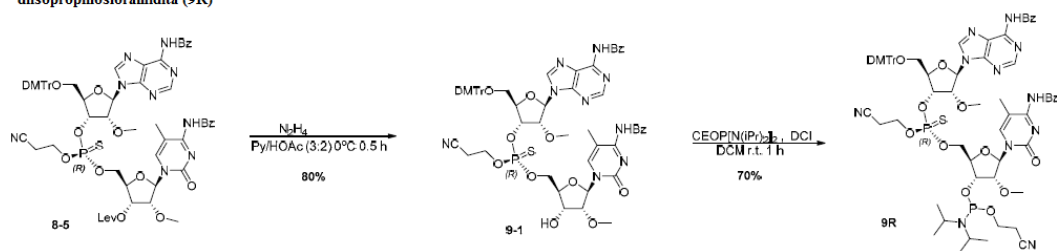


FIGURA 9B

Preparação de (2R,3R,4R,5R)-5-(4-benzamido-5-metil-2-oxopirimidin-1(2H)-il)-2-(((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(6-benzamido-9H-purin-9-yl)-2-((bis(4-metoxifenil)(fenil)metóxi)metil)-4-metoxitetrahydrofurano-3-yl)óxi)(2-cianoetóxi)fosforotioil)óxi)metil)-4-metoxitetrahydrofurano-3-yl(2-cianoetil) diisopropilfosforamidata (9S)

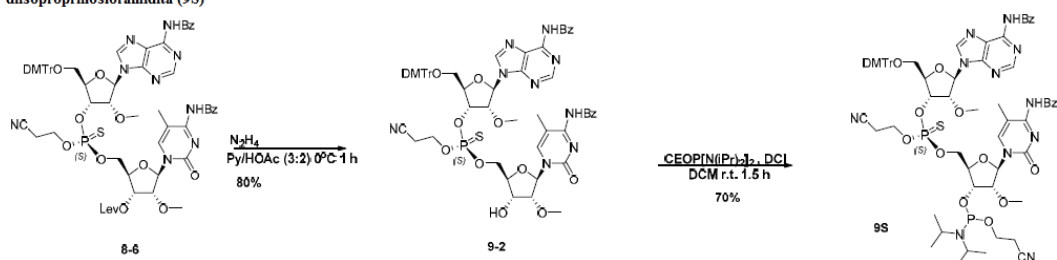


FIGURA 10

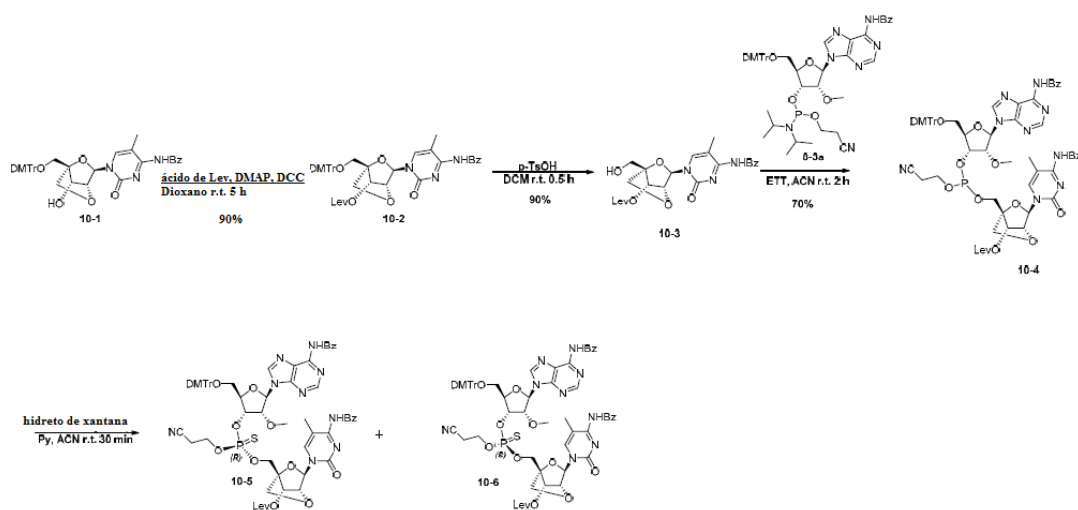


FIGURA 11A

Preparação de (1R,3R,4R,7S)-3-(4-benzamido-5-metil-2-oxopirimidin-1(2H)-il)-1-(((R)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(6-benzamido-9H-purin-9-yl)-2-((bis(4-metoxifenil)(fenil)metóxi)metil)-4-metoxitetrahydrofuran-3-yl)óxi)(2-cianoetóxi)fosforotioil)óxi)metil)-2,5-doxabicyclo[2.2.1]heptan-7-yl (2-cianoetil) diisopropilfosforoamidita (11R)

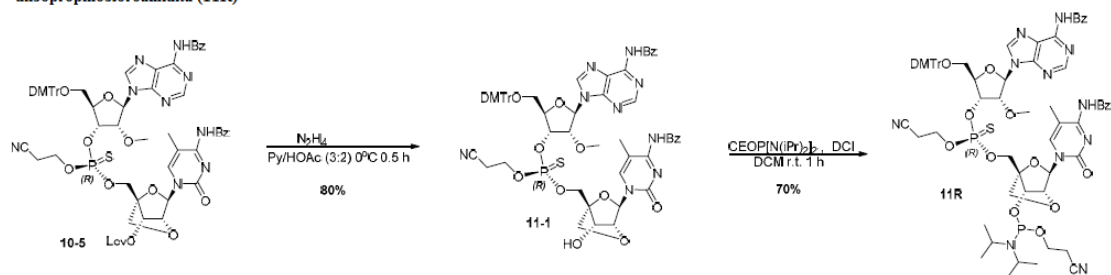
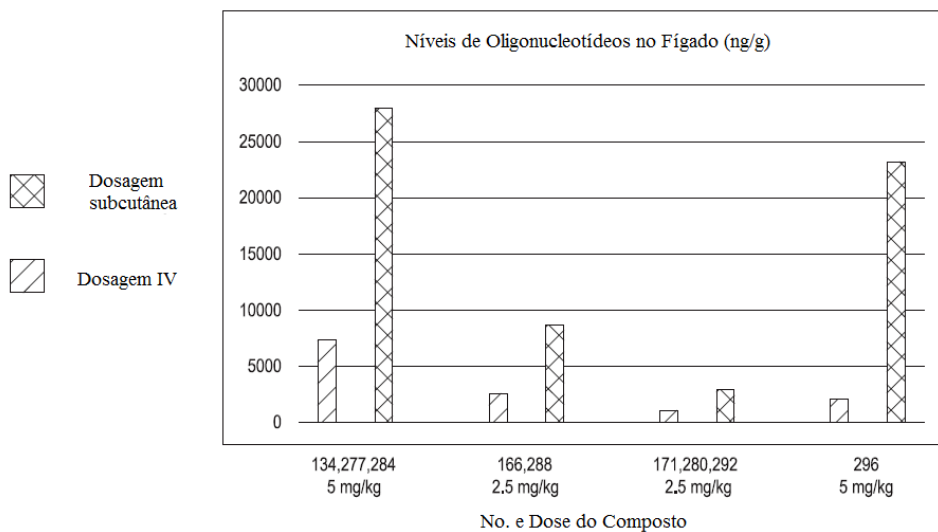
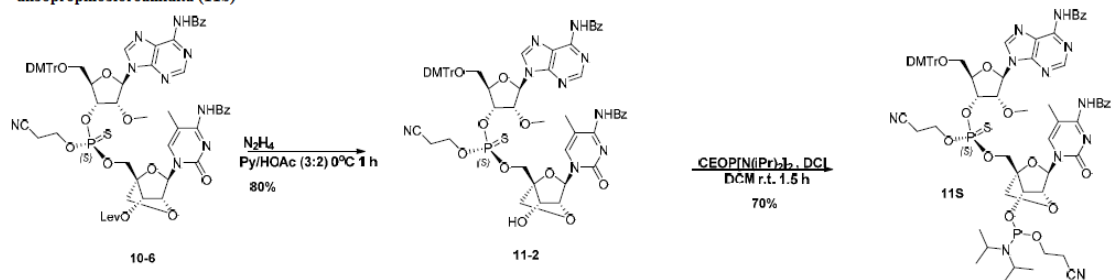


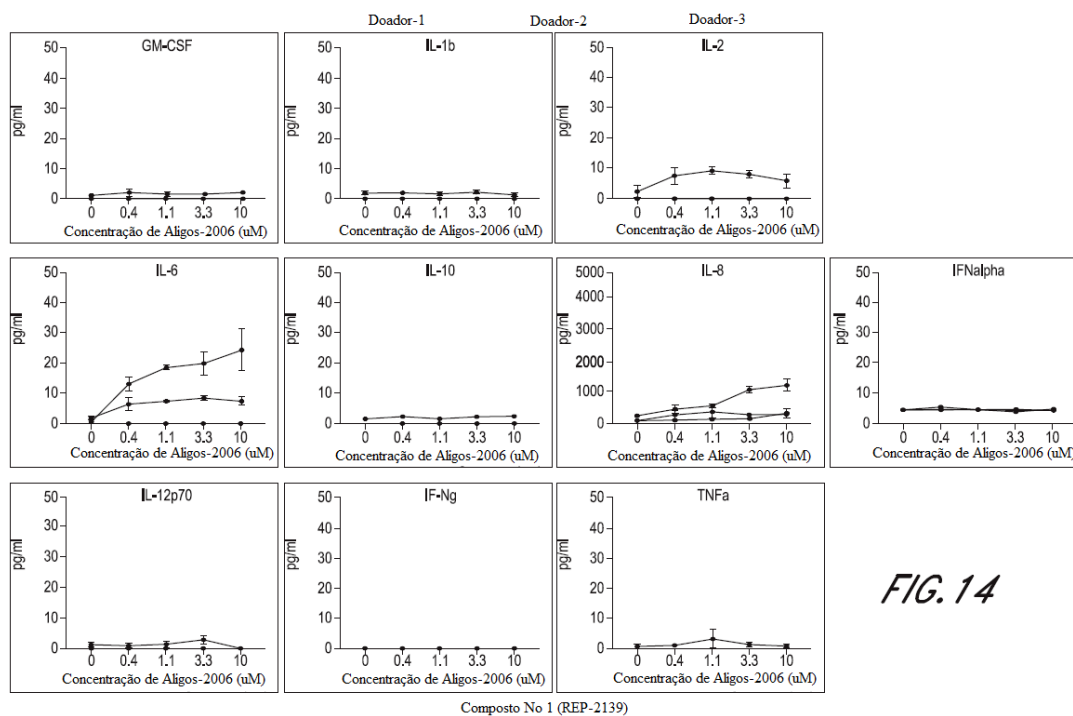
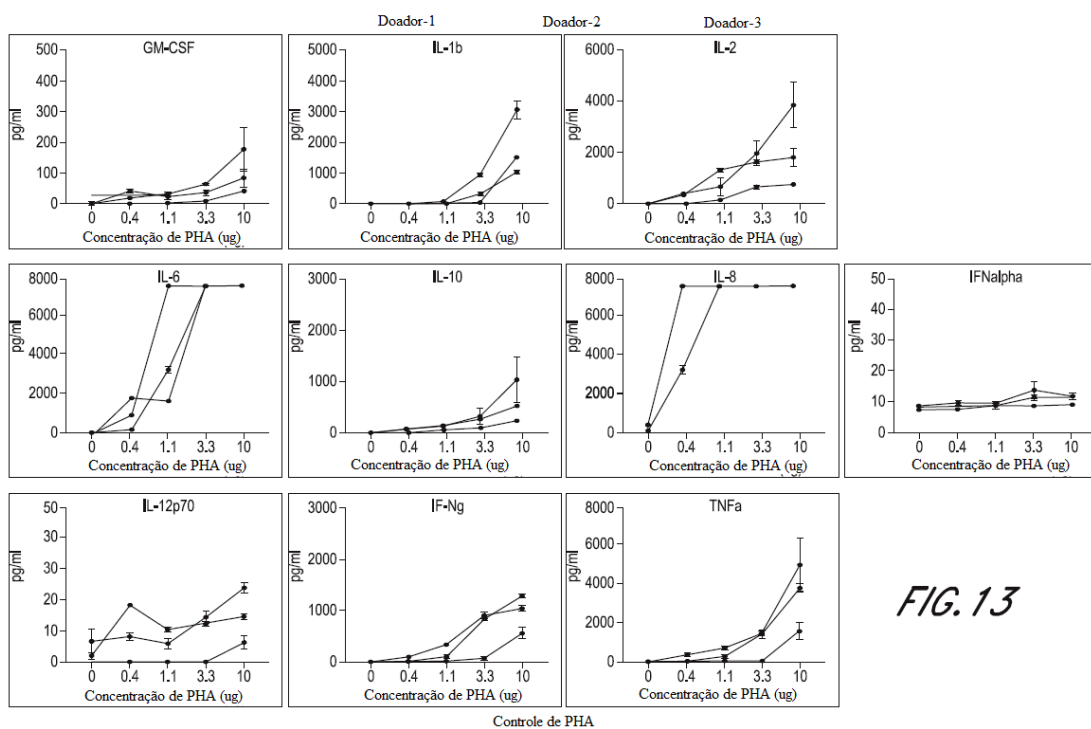
FIGURA 11B

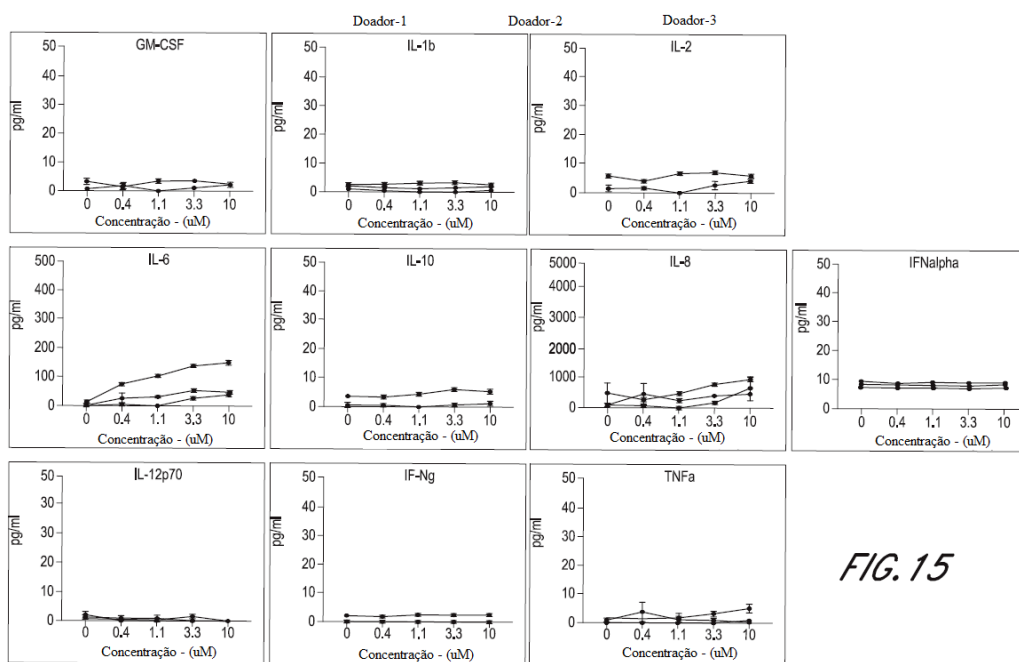
Preparação de (1R,3R,4R,7S)-3-(4-benzamido-5-metil-2-oxopirimidin-1(2H)-il)-1-(((R)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(6-benzamido-9H-purin-9-yl)-2-((bis(4-metoxifenil)(fenil)metóxi)metil)-4-metoxitetrahydrofuran-3-yl)óxi)(2-cianoetóxi)fosforotioil)óxi)metil)-2,5-doxabicyclo[2.2.1]heptan-7-yl (2-cianoetil) diisopropilfosforoamidita (11S)



No. do Composto (dose)	134,277,284 5 mg/kg		166,288 2.5 mg/kg		171,280,292 2.5 mg/kg		296 5 mg/kg	
Rota	IV	SC	IV	SC	IV	SC	IV	SC
Níveis no Fígado (ng/g)	7350,5	27,942,5	2603	8711	1024,5	2938,5	1995,5	23,191,5

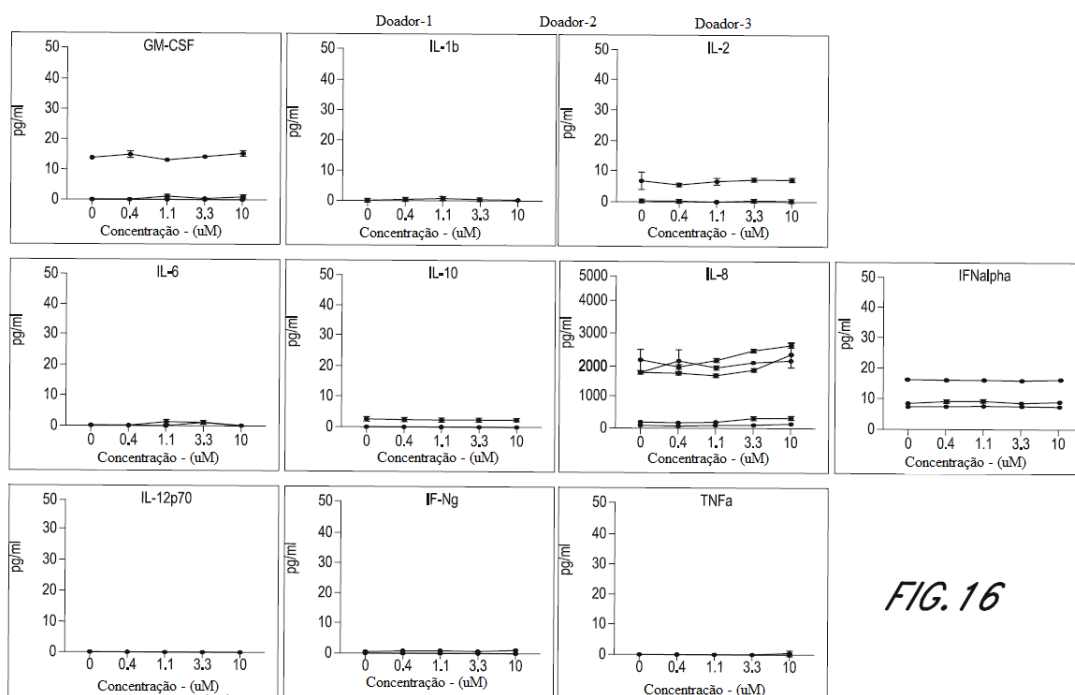
FIG. 12





Compostos Nos 1 171,280,292

FIG. 15



Compostos Nos 1 171,280,292

FIG. 16

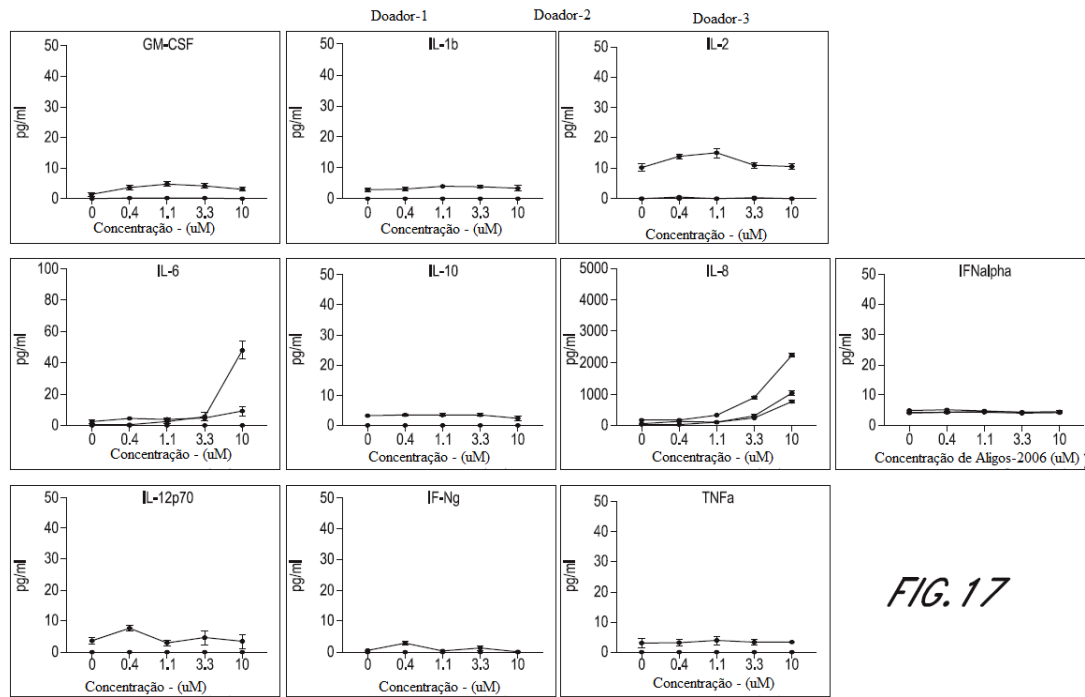


FIG. 17

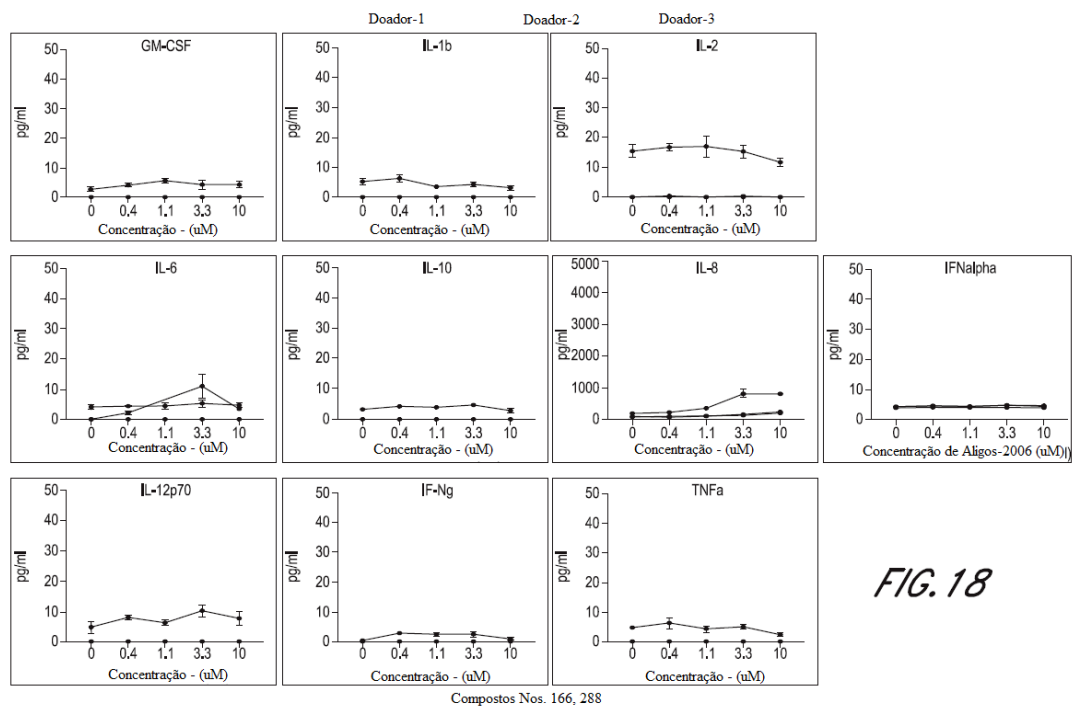


FIG. 18

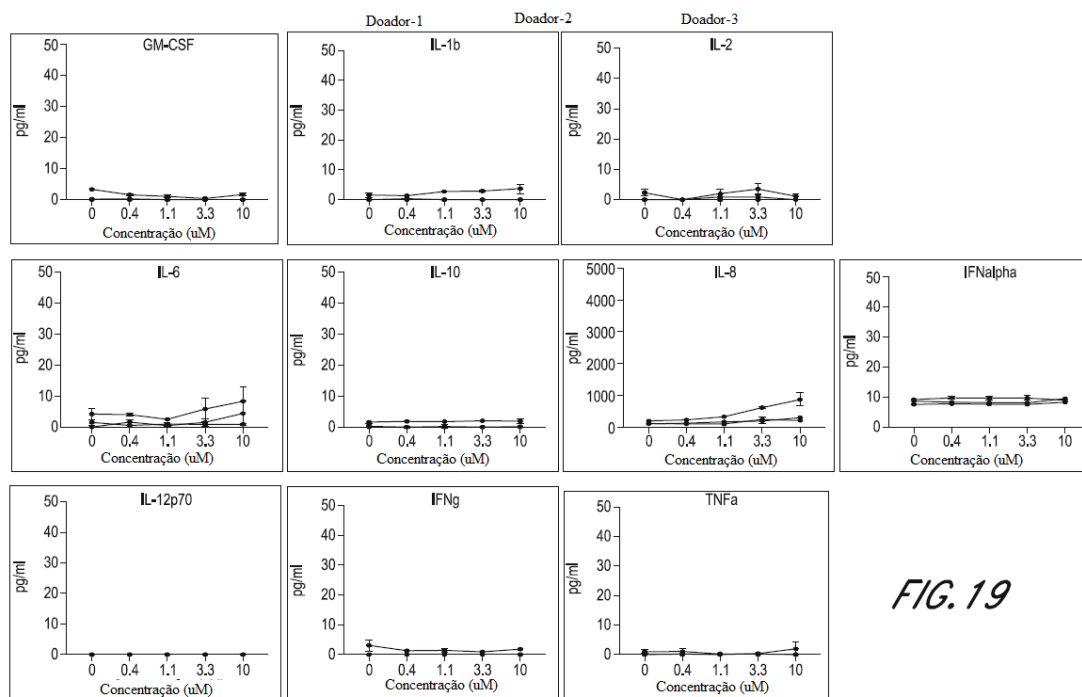


FIG. 19

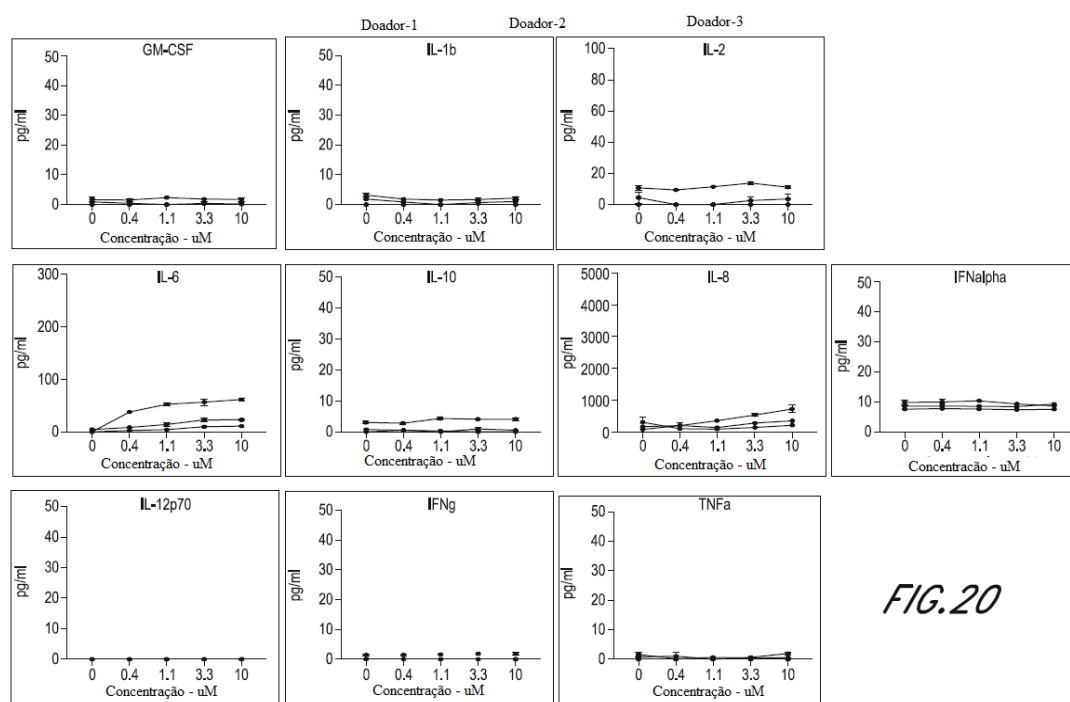


FIG. 20

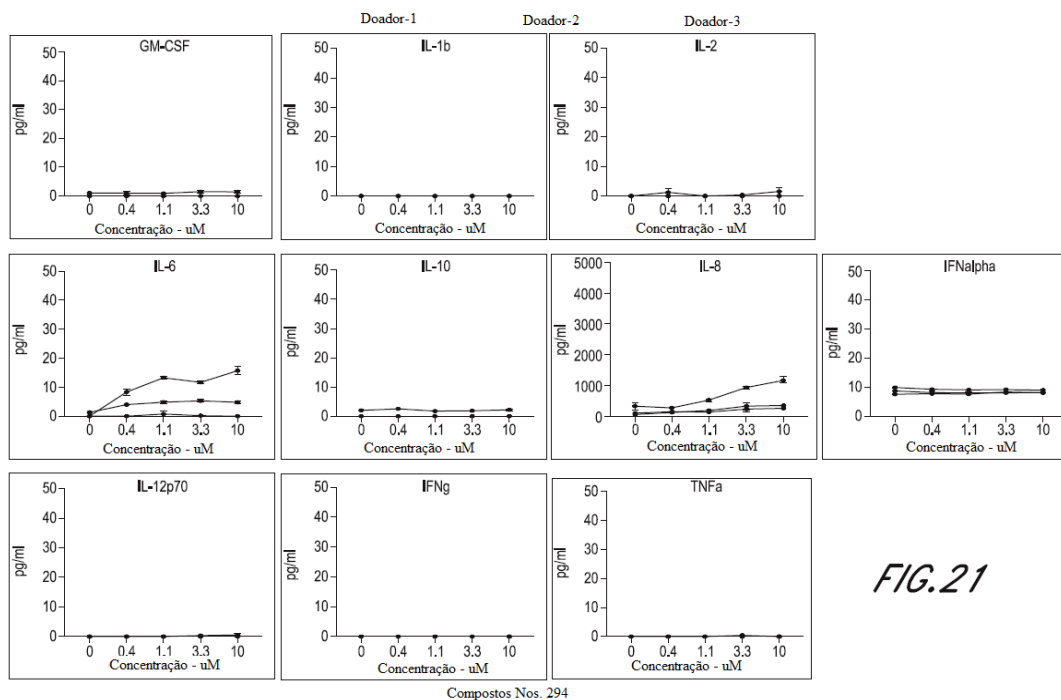


FIG.21

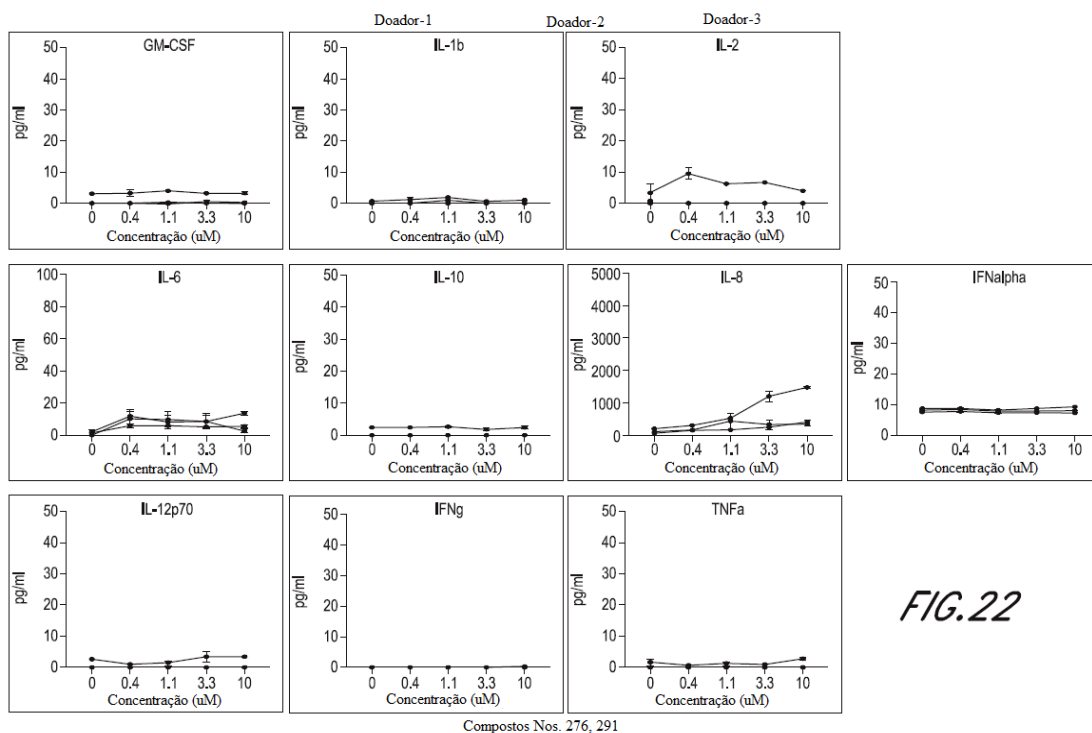


FIG.22

FIGURA 23

	comp. 1	2	3	4	5	6	7	8	9	
A										
B										
C										
D										
E										
F										
G										
H										comp. 2

**“POLÍMEROS DE OLIGONUCLEOTÍDEOS E MÉTODOS DE
INIBIÇÃO DE TRANSPORTE DE ANTÍGENO S”**

RESUMO

Várias modalidades fornecem polímeros STOPSTTM que são polímeros de oligonucleotídeos que inibem o transporte do antígeno S, processos de produção dos mesmos e métodos de utilização dos mesmos para tratar doenças e condições. Em algumas modalidades os oligonucleotídeos modificados STOPSTTM incluem uma sequência pelo menos parcialmente fosforotioada de unidades A e C alternadas que têm modificações que são descritas aqui. A atividade antiviral independente da sequência contra hepatite B das modalidades de oligonucleotídeos modificados STOPSTTM, que é determinada através do HBsAg Secretion Assay, é maior que aquela de um composto de referência.