



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

**(11) BR 112019003162-6 B1**



**(22) Data do Depósito:** 29/09/2017

**(45) Data de Concessão:** 15/03/2022

**(54) Título:** OLIGONUCLEOTÍDEO MODIFICADO, COMPOSTO COMPREENDENDO UM OLIGONUCLEOTÍDEO MODIFICADO, POPULAÇÃO QUIRALMENTE ENRIQUECIDA, COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS E DUPLEX OLIGOMÉRICO

**(51) Int.Cl.:** C12N 15/113.

**(30) Prioridade Unionista:** 25/01/2017 US 62/450,469; 29/09/2016 US 62/401,723.

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

**(72) Inventor(es):** HOLLY KORDASIEWICZ.

**(86) Pedido PCT:** PCT US2017054540 de 29/09/2017

**(87) Publicação PCT:** WO 2018/064593 de 05/04/2018

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 15/02/2019

**(57) Resumo:** São fornecidos compostos, métodos e composições farmacêuticas para reduzir a quantidade ou a atividade de mRNA da Tau em uma célula ou animal e, em certos casos, reduzir a quantidade de proteína Tau em uma célula ou animal. Tais compostos, métodos e composições farmacêuticas são úteis para melhorar pelo menos um sintoma de uma doença neurodegenerativa. Tais sintomas incluem perda de memória, perda da função motora e aumento do número e/ou volume de inclusões neurofibrilares. Tais doenças neurodegenerativas incluem Tauopatias, Mal de Alzheimer, Demência Fronto-Temporal (FTD), FTDP-17, Paralisia Supranuclear Progressiva (PSP), Encefalopatia Traumática Crônica (CTE), Degeneração Ganglionar Corticobasal (CBD), Epilepsia e Síndrome de Dravet.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para  
**"OLIGONUCLEOTÍDEO MODIFICADO, COMPOSTO  
COMPREENDENDO UM OLIGONUCLEOTÍDEO MODIFICADO,  
POPULAÇÃO QUIRALMENTE ENRIQUECIDA, COMPOSIÇÕES  
FARMACÊUTICAS E DUPLEX OLIGOMÉRICO".**

**LISTAGEM DE SEQUÊNCIA**

[0001] O presente pedido está sendo depositado juntamente com uma Listagem de Sequências em formato eletrônico. A Listagem de Sequências é fornecida como um arquivo denominado BIOL0285WOSEQ\_ST25, criado em 7 de setembro de 2017, com 176 KB de tamanho. As informações no formato eletrônico da listagem de sequência são incorporadas neste documento por referência em sua totalidade.

**CAMPO**

[0002] São fornecidos compostos, métodos e composições farmacêuticas para reduzir a quantidade ou a atividade de mRNA da Tau em uma célula ou animal e, em certos casos, reduzir a quantidade de proteína Tau em uma célula ou animal. Tais compostos, métodos e composições farmacêuticas são úteis para melhorar pelo menos um sintoma de uma doença neurodegenerativa. Tais sintomas incluem perda de memória, perda da função motora e aumento do número e/ou volume de inclusões neurofibrilares. Tais doenças neurodegenerativas incluem Tauopatias, Mal de Alzheimer, Demência Fronto-temporal (FTD), FTDP-17, Paralisia Supranuclear Progressiva (PSP), Encefalopatia Traumática Crônica (CTE), Degeneração Ganglionar Corticobasal (CBD), Epilepsia e Síndrome de Dravet.

**ANTECEDENTES**

[0003] A função primária da Tau é vincular e estabilizar microtúbulos, que são componentes estruturais importantes do citoesqueleto envolvido na mitose, citocinese e transporte vesicular. A

Tau é encontrada em vários tecidos, mas é abundante, especificamente, nos axônios dos neurônios. Nos seres humanos, há seis isoformas de Tau que são geradas por splicing alternativo dos éxons 2, 3 e 10. O splicing dos éxons 2 e 3 no terminal N da proteína conduz à inclusão de zero, um, dois ou 29 domínios ácidos de aminoácido e é denominado Tau 0N, 1N, ou 2N, respectivamente. A influência destes domínios na função da Tau não é totalmente clara, no entanto pode desempenhar um papel nas interações com a membrana plasmática. A inclusão do éxon 10 no terminal C leva à inclusão do domínio de ligação do microtúbulo codificado pelo éxon 10. Uma vez que existem 3 domínios de ligação do microtúbulo em outro lugar na Tau, esta isoforma da Tau (com éxon 10 incluído) é denominada 4R Tau, onde "R" se refere ao número de repetições dos domínios de ligação do microtúbulo. A Tau sem éxon 10 é denominada 3R Tau. Uma vez que os domínios de ligação do microtúbulo (4R em comparação com 3R) aumentam a ligação com os microtúbulos, 4R Tau aumenta presumivelmente e significativamente a ligação e a montagem do microtúbulo. A razão entre 3R/4R Tau é regulada, em relação ao tecido, com tecidos fetais que expressam exclusivamente 3R Tau e tecidos humanos adultos que expressam níveis aproximadamente iguais de 3R/4R Tau. Os desvios em relação à razão normal de 3R/4R Tau são característicos de Taupatias FTD degenerativas. Não se sabe como a alteração da razão de 3R/4R Tau em um estágio posterior no animal adulto irá afetar a patogênese do Tau.

[0004] A fosforilação direcionada à serina-treonina regula a capacidade de ligação do microtúbulo da Tau.

[0005] A hiperfosforilação promove a separação da Tau dos microtúbulos. Outras modificações pós-traducionais da Tau foram descritas; no entanto, a significância delas não está clara. A fosforilação da Tau é também regulada, em relação ao desenvolvimento, com a

maior fosforilação em tecidos fetais e fosforilação muito menor no adulto. Uma característica de distúrbios neurodegenerativos é o aumento anormal da fosforilação da Tau. A rede de microtúbulo está envolvida em muitos processos importantes dentro da célula, incluindo a integridade estrutural necessária para manter a morfologia das células e operação da maquinaria de transporte. Uma vez que a ligação da Tau ao microtúbulos estabiliza os microtúbulos, é provável que a Tau seja um mediador chave de alguns destes processos e a ruptura da Tau normal em doenças neurodegenerativas pode romper alguns destes processos celulares chave. Um dos primeiros indicadores em relação aos quais a Tau pode ser importante em síndromas neurodegenerativos foi o reconhecimento de que a Tau é um componente-chave das inclusões neurofibrilares na doença de Alzheimer. De fato, as inclusões neurofibrilares são agregados da proteína Tau hiperfosforilada. Juntamente com placas contendo beta-amiloide, as inclusões neurofibrilares são uma característica da doença de Alzheimer e se correlacionam significativamente à disfunção cognitiva. Noventa e cinco por cento (95%) de acumulações de Tau em DA encontrados em processos neuronais e é denominado distrofia neurítica. Os processos por meio dos quais esta proteína associada ao microtúbulo fica desengatada dos microtúbulos e forma acumulações de proteínas e como isto se relaciona à toxicidade neuronal não são bem compreendidos.

[0006] As inclusões neuronais da Tau são uma característica patológica não apenas da doença de Alzheimer, mas também de um subconjunto de Demência fronto-temporal (FTD), PSP e CBD. A ligação entre a Tau e a neurodegeneração foi solidificada pela descoberta de que as mutações no gene da Tau resultam em um subconjunto de FTD. Estes dados genéticos também destacaram a importância da razão 3R:4R da Tau. Muitas das mutações que causam a FTD resultam em



uma mudança no splicing da Tau, o que leva à inclusão preferencial do éxon 10 e, portanto, a um aumento da 4R Tau. Os níveis globais de Tau são normais. Continua desconhecido se a isoforma da Tau muda, se o aminoácido muda ou se ambos causam neurodegeneração. Dados recentes sugerem que a PSP também pode estar associada a um aumento da razão de 4R:3R Tau.

[0007] Para ajudar a compreender a influência das razões da Tau na neurodegeneração, um modelo de camundongo com base em uma das mutações de Tau do splicing (N279K) foi gerada com um minigene que inclui o promotor de Tau e as sequências intrônicas flanqueadoras do éxon 10. Assim como nos seres humanos, esses camundongos demonstram aumento nos níveis de 4R Tau em comparação com os transgênicos que expressam WT Tau e desenvolvem anomalias comportamentais e motoras, bem como acumulações de Tau agregada no cérebro e na medula espinhal.

[0008] A proteína Tau tem sido associada a várias doenças do cérebro, incluindo a mal de Alzheimer, FTD, PSP, CBD, demência pugilística, parkinsonismo ligado ao cromossoma, doença Lytico-Bodig, demência com predomínio do emaranhado neurofibrilar, ganglioglioma, gangliocitoma, meningioangiomatose, panencefalite esclerosante subaguda, encefalopatia por chumbo, esclerose tuberosa, doença de Hallervorden-Spatz, doença de Pick, doença por grãos argirofílicos, degeneração corticobasal ou degeneração lobar fronto-temporal e outras. Os distúrbios associados à proteína Tau como, por exemplo, DA, representam a causa mais comum de demência em idosos. A DA afeta cerca de 15 milhões de pessoas em todo o mundo e 40% da população acima de 85 anos de idade. A DA é caracterizada por duas características patológicas: Inclusões neurofibrilares da Tau (NFT) e placas  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ).

[0009] Existe atualmente uma falta de opções aceitáveis para o

tratamento de tais doenças neurodegenerativas. É, portanto, um objetivo neste documento fornecer métodos para o tratamento dessas doenças.

### **SUMÁRIO DA INVENÇÃO**

[00010] São aqui fornecidos compostos e métodos para reduzir a quantidade ou a atividade de mRNA da Tau e, em certas modalidades, reduzir a quantidade de proteína Tau em uma célula ou animal. Em certas modalidades, o animal tem uma doença neurodegenerativa. Em certas modalidades, o animal tem uma taupatia, Mal de Alzheimer, Demência Fronto-temporal (FTD), FTDP-17, Paralisia Supranuclear Progressiva (PSP), Encefalopatia Traumática Crônica (CTE), Degeneração Ganglionar Corticobasal (CBD), Epilepsia, ou Síndrome de Dravet. Em certas modalidades, compostos úteis para reduzir a expressão de mRNA da Tau são compostos oligoméricos. Em certas modalidades, o Composto nº 814907 é útil para reduzir a expressão de mRNA da Tau e/ou proteína Tau.

[00011] São fornecidos também métodos úteis para prevenir ou melhorar pelo menos um sintoma de uma doença neurodegenerativa. Em certas modalidades, tais sintomas são perda de memória, perda da função motora e aumento do número e/ou volume de inclusões neurofibrilares. Em certas modalidades, a prevenção ou melhoria resulta na manutenção ou melhoria da memória, manutenção ou melhoria da função motora e/ou manutenção ou redução do número e/ou volume de inclusões neurofibrilares. Em certas modalidades, tal prevenção ou melhoria dos sintomas é a diminuição da taxa de progressão ou retardo no início de tais sintomas.

### **DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO**

[00012] Deve ser compreendido que tanto a descrição geral acima quanto a descrição detalhada abaixo são apenas exemplares e explicativas e não são restritivas. Neste documento, o uso do singular

inclui o plural, salvo quando houver outra especificação. Conforme usado neste documento, o uso de "ou" denota "e/ou", salvo quando houver outra especificação. Ademais, o uso do termo "incluindo", bem como outras formas, como "que inclui" ou "incluído", não é limitativo. Além disso, termos como "elemento" ou "componente" abrangem elementos e componentes que compreendem uma unidade e elementos e componentes que compreendem mais de uma subunidade, salvo quando se estabelecer de outra forma.

[00013] Os títulos das seções usados neste documento são para fins organizacionais apenas e não devem ser interpretados como limitadores do objeto descrito. Todos os documentos ou partes de documentos citados neste pedido, incluindo, mas não se limitando a, patentes, pedidos de patente, artigos, livros, e tratados, são expressamente incorporados por meio deste para as partes do documento discutidas neste documento, bem como em sua totalidade.

### *Definições*

[00014] A menos que definições específicas sejam fornecidas, a nomenclatura utilizada associada e os procedimentos e técnicas de química analítica, química orgânica sintética e química farmacêutica e medicinal descritos neste documento são aqueles bem conhecidos e comumente usados na técnica. Se permitido, todas as patentes, pedidos, pedidos publicados e outras publicações e outros dados referidos ao longo da descrição são incorporados por referência a este instrumento em sua integralidade.

[00015] Salvo indicado em contrário, os termos a seguir têm os seguintes significados:

### **DEFINIÇÕES**

[00016] Neste documento, "2'-desoxinucleosídeo" se refere a um nucleosídeo que compreende uma fração de açúcar de 2'-(H) furanosila, tal como se encontra em ácidos desoxirribonucleicos (DNA) de

ocorrência natural. Em determinadas modalidades, um 2-desoxinucleosídeo pode compreender uma nucleobase modificada ou pode compreender uma nucleobase de RNA (uracil).

[00017] Neste documento, "nucleosídeo substituído em 2'" se refere a um nucleosídeo compreendendo uma fração de açúcar substituída em 2'. Neste documento, "substituído em 2'" em referência a uma fração de açúcar, se refere a uma fração de açúcar compreendendo um grupo substituinte em 2' diferente de H ou OH.

[00018] Neste documento, "administrar" se refere a fornecer um agente farmacêutico a um animal.

[00019] Neste documento, "animal" se refere a um animal humano ou não humano.

[00020] Neste documento, "atividade antisense" se refere a qualquer atividade detectável e/ou mudança mensurável atribuível à hibridização de um composto antisense para seu ácido nucleico alvo. Em certas modalidades, a atividade antisense é uma diminuição na quantidade ou expressão de um ácido nucleico ou proteína alvo codificada por esse ácido nucleico alvo em comparação com os níveis de ácido nucleico alvo ou níveis de proteína alvo na ausência do composto antisense.

[00021] Neste documento, "composto antisense" se refere a um composto oligomérico ou duplex oligomérico capaz de conseguir pelo menos uma atividade antisense.

[00022] Neste documento, "melhorar" em referência a um tratamento significa melhoria em pelo menos um sintoma em relação ao mesmo sintoma na ausência do tratamento. Em certas modalidades, melhoria é a redução da gravidade ou frequência de um sintoma ou retardo no início ou desaceleração da progressão na gravidade ou frequência de um sintoma. Em certas modalidades, o sintoma é perda de memória, perda da função motora e aumento do número e/ou volume de inclusões neurofibrilares. Em certas modalidades, a melhoria desses sintomas

resulta na manutenção ou melhoria da memória, manutenção ou melhoria da função motora e/ou manutenção ou redução do número e/ou volume de inclusões neurofibrilares.

[00023] Neste documento, "pelo menos um sintoma de uma doença neurodegenerativa" inclui perda de memória, perda de função motora ou aumento no número e/ou volume de inclusões neurofibrilares.

[00024] Neste documento, "nucleosídeo bicíclico" ou "BNA" se refere a um nucleosídeo que consiste em uma fração de açúcar bicíclico. Tal como usado neste documento, "açúcar bicíclico" ou "unidade de açúcar bicíclico" denota uma unidade de açúcar modificada compreendendo dois anéis, em que o segundo anel é formado através de uma ponte que conecta dois dos átomos no primeiro anel formando assim uma estrutura bicíclica. Em certas modalidades, o primeiro anel da fração de açúcar bicíclico é uma fração de furanosila. Em certas modalidades, a fração de açúcar bicíclico não compreende uma fração de furanosila.

[00025] Neste documento, "população quiralmente enriquecida" se refere a uma pluralidade de moléculas de fórmula molecular idêntica, em que o número ou porcentagem de moléculas dentro da população que contém uma configuração estereoquímica particular em um centro quiral particular maior do que o número ou porcentagem esperado de moléculas para conter a mesma configuração estereoquímica particular no mesmo centro quiral particular dentro da população se o centro quiral particular fosse estereo-randomizado. Populações de moléculas quiralmente enriquecidas com múltiplos centros quirais dentro de cada molécula podem conter um ou mais centros quirais estereo-randomizados. Em certas modalidades, as moléculas são oligonucleotídeos modificados. Em certas modalidades, as moléculas são compostos que compreendem oligonucleotídeos modificados.

[00026] Neste documento, "fração clivável" se refere a uma ligação ou grupo de átomos que é clivado em condições fisiológicas, por

exemplo, dentro de uma célula, de um animal ou de um humano.

[00027] Neste documento, "complementar", em referência a um oligonucleotídeo, se refere a pelo menos 70% das nucleobases do oligonucleotídeo ou de uma ou mais regiões dos mesmos e as nucleobases de outro ácido nucleico ou de uma ou mais regiões da mesma são capazes de ligação de hidrogênio entre si quando a sequência de nucleobase do oligonucleotídeo e do outro ácido nucleico está alinhada em sentidos opostos. Nucleobases complementares significam nucleobases que são capazes de formar ligações de hidrogênio entre si. Os pares de nucleobases complementares incluem adenina (A) e timina (T), adenina (A) e uracil (U), citosina (C) e guanina (G), 5-metil citosina (mC) e guanina (G). Os oligonucleotídeos complementares e/ou os ácidos nucleicos não precisam ter complementaridade da nucleobase em cada nucleosídeo. Em vez disso, algumas incompatibilidades são toleradas. Neste documento, "totalmente complementar" ou "100% complementar", em referência a oligonucleotídeos, significa que tais oligonucleotídeos são complementares a outro oligonucleotídeo ou ácido nucleico em cada nucleosídeo do oligonucleotídeo.

[00028] Neste documento, "grupo conjugado" se refere a um grupo de átomos que está ligado direta ou indiretamente a um oligonucleotídeo. Os grupos conjugados incluem uma unidade conjugada e um ligante conjugado que liga a fração conjugada ao oligonucleotídeo.

[00029] Neste documento, "ligante conjugado" se refere a um grupo de átomos que compreende pelo menos uma ligação que liga uma fração conjugada a um oligonucleotídeo.

[00030] Neste documento, "fração conjugada" se refere a um grupo de átomos que está ligado a um oligonucleotídeo através de um ligante conjugado.

[00031] Neste documento, "contíguo", no contexto de um oligonucleotídeo, refere-se a nucleosídeos, nucleobases, frações de açúcar ou ligações internucleosídicas que são imediatamente adjacentes entre si. Por exemplo, "nucleobases contíguas" significa nucleobases que são imediatamente adjacentes uma à outra em uma sequência.

[00032] Neste documento, "gapmer" se refere a um oligonucleotídeo modificado que compreende uma região interna com uma variedade de nucleosídeos que sustentam a clivagem de H RNase posicionada entre as regiões externas com um ou mais nucleosídeos, em que os nucleosídeos compreendendo a região interna são quimicamente distintos do nucleotídeo ou dos nucleosídeos que compreendem as regiões externas. A região interna pode ser chamada de "gap" e as regiões externas podem ser chamadas de "asas". Salvo se indicado em contrário, "gapmer" refere-se a um motivo de açúcar. Salvo indicação em contrário, as frações de açúcar dos nucleosídeos do gap de um gapmer são 2'-desoxifuranosila não modificada. Assim, o termo "MOE gapmer" indica um gapmer com um motivo de açúcar de nucleosídeos 2'-MOE nas asas e no gap de 2'-desoxinucleosídeos. Salvo indicação em contrário, um MOE gapmer pode compreender uma ou mais ligações internucleosídicas modificadas e/ou nucleobases modificadas e essas modificações não seguem necessariamente o padrão de gapmer das modificações de açúcar.

[00033] Neste documento, "hibridação" significa o emparelhamento ou o anelamento de oligonucleotídeos complementares e/ou ácidos nucleicos. Enquanto não houver limitação a um mecanismo específico, o mecanismo mais comum de hibridização envolve a ligação de hidrogênio, que pode ser ligação de hidrogênio Watson-Crick, Hoogsteen ou Hoogsteen reversa entre nucleobases complementares.

[00034] Neste documento, o termo "ligação internucleosídica" é a

ligação covalente entre nucleosídeos adjacentes em um oligonucleotídeo. Neste documento, "ligação internucleosídica modificada" se refere a qualquer ligação internucleosídica diferente da ligação internucleosídica fosfodiéster. "Ligação Fosforotioato" é uma ligação internucleosídica modificada na qual um dos átomos de oxigênio não ligantes de uma ligação internucleosídica fosfodiéster é substituído por um átomo de enxofre.

[00035] Neste documento, "nucleosídeo de ligação" se refere a um nucleosídeo que liga, direta ou indiretamente, um oligonucleotídeo a uma fração conjugada. Os nucleosídeos de ligação estão localizados dentro do ligante conjugado de um composto oligomérico. Os nucleosídeos de ligação não são considerados parte da porção de oligonucleotídeo de um composto oligomérico mesmo se eles estiverem contíguos ao oligonucleotídeo.

[00036] Neste documento, "fração de açúcar modificado não bicíclico" se refere a uma fração de açúcar modificado que compreende uma modificação, tal como um substituinte, que não forma uma ponte entre dois átomos de açúcar para formar um segundo anel.

[00037] Neste documento, "incompatibilidade" ou "não complementar" se refere a uma nucleobase de um primeiro oligonucleotídeo que é não complementar à nucleobase correspondente de um segundo oligonucleotídeo ou ácido nucleico alvo quando o primeiro e o segundo compostos oligoméricos estão alinhados.

[00038] Neste documento, "MOE" significa metoxietil. "2'-MOE" significa a grupo  $-OCH_2CH_2OCH_3$  na posição 2' de um anel de furanosila.

[00039] Neste documento, "motivo" se refere ao padrão de frações de açúcares não modificadas e/ou modificadas, nucleobases e/ou ligações internucleosídicas em um oligonucleotídeo.

[00040] Neste documento, "mRNA" se refere a um transcrito de RNA



que codifica uma proteína e inclui pré-mRNA e mRNA maduro, salvo se especificado em contrário.

[00041] Neste documento, "nucleobase" se refere a uma nucleobase não modificada ou uma nucleobase modificada. Neste documento, uma "nucleobase não modificada" é adenina (A), timina (T), citosina (C), uracil (U) e guanina (G). Neste documento, uma "nucleobase modificada" é um grupo de átomos diferentes de A, T, C, U ou G não modificados, capazes de emparelhar com pelo menos uma nucleobase não modificada. "5-metilcitosina" é uma nucleobase modificada. Uma base universal é uma nucleobase modificada que pode emparelhar com qualquer uma das cinco nucleobases não modificadas. Neste documento, "sequência de nucleobase" se refere a ordem de nucleobases contíguas em um ácido nucleico ou oligonucleotídeo independente de qualquer modificação de ligação de açúcar ou internucleosídica.

[00042] Neste documento, "nucleosídeo" se refere a um composto que compreende uma nucleobase e uma fração de açúcar. As frações de nucleobases e açúcares são, independentemente, não modificadas ou modificadas. Neste documento, "nucleosídeo modificado" se refere a um nucleosídeo que compreende uma nucleobase modificada e/ou uma fração de açúcar modificada. Os nucleosídeos modificados incluem nucleosídeos básicos, que não possuem uma nucleobase. "Nucleosídeos ligados" são nucleosídeos que estão conectados em uma sequência contínua (ou seja, nenhum nucleosídeo adicional está presente entre aqueles que estão ligados).

[00043] Neste documento, "composto oligomérico" se refere a um oligonucleotídeo e, opcionalmente, uma ou mais características adicionais, tais como um grupo conjugado ou grupo terminal. Um composto oligomérico pode ser emparelhado com um segundo composto oligomérico que é complementar ao primeiro composto

oligomérico ou pode ser desemparelhado. Um "composto oligomérico de fita simples" é um composto oligomérico não emparelhado. O termo "dúplex oligomérico" se refere a um dúplex formado por dois compostos oligoméricos com sequências de nucleobases complementares. Cada composto oligomérico de um dúplex oligomérico pode ser denominado "composto oligomérico duplexado".

[00044] Neste documento, "oligonucleotídeo" se refere uma fita de nucleosídeos ligados conectados pelas ligações internucleosídicas, em que cada nucleosídeo e ligação internucleosídica podem ser modificados ou não modificados. Salvo indicação em contrário, os oligonucleotídeos consistem em 8-50 nucleosídeos ligados. Tal como aqui utilizado, "oligonucleotídeo modificado" significa um oligonucleotídeo, em que pelo menos uma ligação nucleosídica ou internucleosídica é modificada. Tal como aqui utilizado, "oligonucleotídeo não modificado" significa um oligonucleotídeo que não compreende quaisquer modificações nucleosídicas ou modificações internucleosídicas.

[00045] Neste documento, "carreador ou diluente farmacêuticamente aceitável" se refere a qualquer substância apropriada para uso na administração de um animal. Alguns desses carreadores permitem que as composições farmacêuticas a serem formuladas como, por exemplo, comprimidos, pílulas, drágeas, cápsulas, líquidos, géis, xaropes, pastas fluidas, suspensão e pastilhas para a ingestão oral por um sujeito. Em certas modalidades, um carreador ou diluente farmacêuticamente aceitável é água estéril; solução salina estéril; ou solução tampão estéril.

[00046] Neste documento, "sais farmacêuticamente aceitáveis" significa sais fisiologicamente e farmacêuticamente aceitáveis de compostos, tais como compostos oligoméricos, ou seja, sais que mantêm a atividade biológica desejada do composto de origem e não transmitem efeitos toxicológicos indesejáveis aos mesmos.

[00047] Neste documento, "composição farmacêutica" significa uma mistura de substâncias adequadas para a administração a um sujeito. Por exemplo, uma composição farmacêutica pode compreender um composto antisenso e uma solução aquosa estéril. Em certas modalidades, uma composição farmacêutica mostra atividade no ensaio de absorção livre em certas linhagens celulares.

[00048] Neste documento, "fração de fósforo" denota um grupo de átomos que compreende um átomo de fósforo. Em determinadas modalidades, uma fração de fósforo compreende um mono, di ou trifosfato, ou fosforotioato.

[00049] Neste documento, "pró-droga" se refere a um agente terapêutico em uma forma externa ao corpo que é convertido em uma forma diferente dentro de um animal ou de suas células. Normalmente, a conversão de uma pró-droga dentro do corpo é facilitada pela ação de enzimas (por exemplo, enzima endógena ou viral) ou substâncias químicas presentes em células ou tecidos e/ou por condições fisiológicas.

[00050] Neste documento, "reduzir ou inibir a quantidade ou atividade" refere-se a uma redução ou bloqueio da expressão ou atividade transcricional em relação à expressão ou atividade transcricional em uma amostra não tratada ou de controle e não indica necessariamente uma eliminação total de expressão ou atividade transcricional.

[00051] Neste documento, "composto de RNAi" significa um composto antisenso que atua, pelo menos em parte, através de RISC ou Ago2 para modular um ácido nucleico e/ou proteína alvo codificado por um ácido nucleico alvo. Os compostos de RNAi incluem, mas não estão limitados a siRNA de cadeia dupla, ARN de cadeia simples (ssrNA) e microRNA, incluindo imitadores de microRNA. Em certas modalidades, um composto de RNAi modula a quantidade, atividade

e/ou splicing de um ácido nucleico alvo. O termo composto de RNAi exclui os compostos antisense que atuam através da RNase H.

[00052] Neste documento, "autocomplementar" em referência a um oligonucleotídeo se refere a um oligonucleotídeo que hibrida pelo menos parcialmente consigo mesmo.

[00053] Neste documento, "ensaio de células padrão" se refere ao ensaio descrito no Exemplo 1 e variações razoáveis dos mesmos.

[00054] Neste documento, "centro quiral estereorrandômico" no contexto de uma população de moléculas de fórmula molecular idêntica se refere um centro quiral com uma configuração estereoquímica randômica. Por exemplo, em uma população de moléculas que compreendem um centro quiral estereorrandômico, o número de moléculas com a configuração (*S*) do centro quiral estereorrandômico pode ser, mas não é necessariamente igual ao número de moléculas com a configuração (*R*) do centro quiral estereorrandômico. A configuração estereoquímica de um centro quiral é considerada randômica quando é o resultado de um método sintético que não é projetado para controlar a configuração estereoquímica. Em certas modalidades, um centro quiral estereorrandômico é uma ligação internucleosídica fosforotioato estereorrandômica.

[00055] Neste documento, "fração de açúcar" se refere uma fração de açúcar não modificado ou a uma fração de açúcar modificado. Neste documento, "fração de açúcar não modificada" se refere a uma fração 2'-OH(H) furanosila, encontrada no RNA ("fração de açúcar de RNA não modificado"), ou uma fração 2'-H(H), encontrada no DNA ("fração de açúcar de DNA não modificado"). As frações de açúcar não modificado têm um hidrogênio em cada uma das posições 1', 3' e 4', um oxigênio na posição 3' e dois hidrogênios na posição 5'. Neste documento, "fração de açúcar modificado" ou "açúcar modificado" se refere uma fração de açúcar de furanosila modificada ou um substituto de açúcar.

Tal como aqui utilizado, fracção de açúcar de furanosila modificada significa um açúcar de furanosila compreendendo um substituinte não hidrogénio em vez de pelo menos um hidrogénio de uma porção de açúcar não modificado. Em determinadas modalidades, uma fração de açúcar de furanosila modificada é uma fração de açúcar 2'- substituído. Tais porções de açúcar de furanosila modificadas incluem açúcares bicíclicos e açúcares não bicíclicos.

[00056] Neste documento, "substituto de açúcar" significa uma fração de açúcar modificada que possui uma porção diferente de uma furanosila que pode ligar uma nucleobase a outro grupo, tal como uma ligação internucleosídica, grupo conjugado ou grupo terminal num oligonucleotídeo. Os nucleosídeos modificados que compreendem substitutos do açúcar podem ser incorporados em uma ou mais posições dentro de um oligonucleotídeo e tais oligonucleotídeos são capazes de se hibridar com compostos oligoméricos complementares ou ácidos nucleicos.

[00057] Neste documento, "ácido nucleico alvo" e "RNA alvo" se referem a um ácido nucleico que um composto antisenso é concebido para afetar.

[00058] Neste documento, "região alvo" se refere a uma porção de um ácido nucleico alvo no qual um composto oligomérico é concebido para se hibridizar.

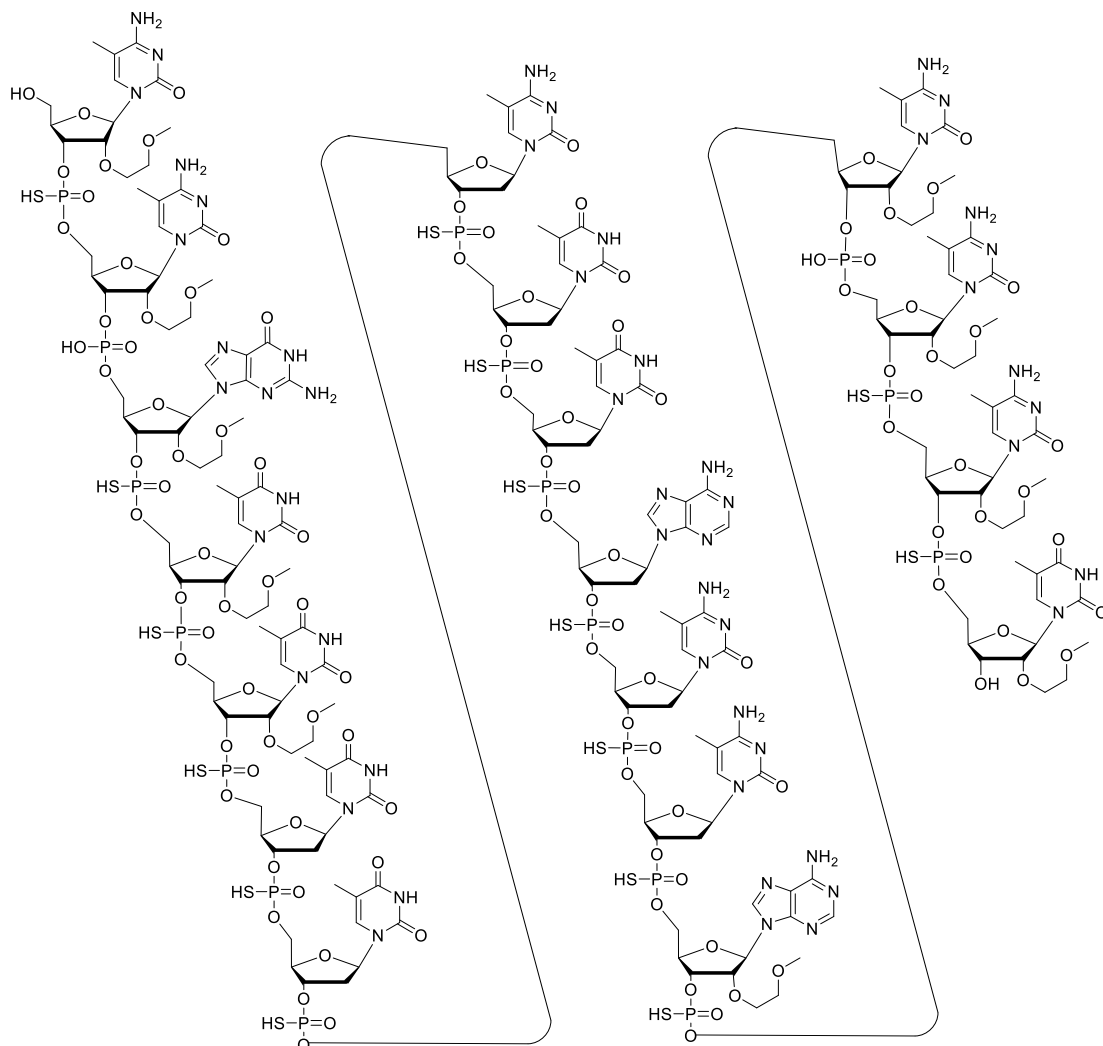
[00059] Neste documento, "grupo terminal" denota um grupo químico ou grupo de átomos que está ligado covalentemente a um terminal de um oligonucleotídeo.

[00060] Neste documento, "quantidade terapeuticamente eficaz" significa uma quantidade de um agente farmacêutico que fornece um benefício terapêutico a um animal. Por exemplo, uma quantidade terapeuticamente eficaz melhora um sintoma de uma doença.

[00061] A presente descrição apresenta as seguintes modalidades

não limitantes numeradas:

[00062] Modalidade 1: Um oligonucleotídeo modificado, de acordo com a seguinte fórmula:



[00063] (SEQ ID NO:8).

[00064] Em consistência com as definições e descrição contidas neste documento, os compostos da Modalidade 1 podem ser feitos pelo controle deliberado da estereoquímica de qualquer uma, todas ou de nenhuma ligações.

[00065] Modalidade 2: Um composto oligomérico compreendendo um oligonucleotídeo modificado, de acordo com a seguinte fórmula:  
mCes mCeo Ges Tes Tes Tds Tds mCds Tds Tds Ads mCds mCds Aes  
mCeo mCes mCes Te; em que,

- [00066] A = adenina,
- [00067] mC = 5'-metilcitosina,
- [00068] G = guanina,
- [00069] T = timina,
- [00070] e = nucleosídeo 2'-MOE,
- [00071] d = 2'-desoxinucleosídeo,
- [00072] s = ligação internucleosídica fosforotioato, e
- [00073] o = ligação internucleosídica fosfodiéster.
- [00074] Modalidade 3: O composto oligomérico da modalidade 2 compreendendo um grupo conjugado.
- [00075] Modalidade 4: Um duplex oligomérico compreendendo um composto oligomérico da modalidade 2 ou modalidade 3.
- [00076] Modalidade 5: Um composto antisense compreendendo ou consistindo em um oligonucleotídeo modificado, de acordo com a modalidade 1, um composto oligomérico, de acordo com a modalidade 2 ou modalidade 3, ou um duplex oligomérico, de acordo com a modalidade 4.
- [00077] Modalidade 6: Uma composição farmacêutica compreendendo um oligonucleotídeo modificado, de acordo com a modalidade 1, um composto oligomérico, de acordo com a modalidade 2 ou modalidade 3, ou um duplex oligomérico, de acordo com a modalidade 4 ou seu sal e um carreador ou diluente farmacêuticamente aceitável.
- [00078] Modalidade 7: A composição da modalidade 6, em que o sal é sódio.
- [00079] Modalidade 8: Um método compreendendo administração, a um animal, de uma composição farmacêutica, de acordo com a modalidade 6 ou modalidade 7.
- [00080] Modalidade 9: Um método de tratamento de uma doença associada à Tau compreendendo a administração, a um indivíduo com

uma doença associada à Tau ou com risco de desenvolvê-la, uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma composição farmacêutica, de acordo com a modalidade 6 ou modalidade 7; e, portanto, tratamento da doença associada à Tau.

[00081] Modalidade 10: O método da modalidade 9, em que a doença associada à Tau é uma doença neurodegenerativa.

[00082] Modalidade 11: O método da modalidade 10, em que a doença neurodegenerativa é uma Taupatia, Mal de Alzheimer, Demência Fronto-temporal (FTD), FTDP-17, Paralisia Supranuclear Progressiva (PSP), Encefalopatia Traumática Crônica (CTE), Degeneração Ganglionar Corticobasal (CBD), Epilepsia ou Síndrome de Dravet.

[00083] Modalidade 12: O método da modalidade 10 ou modalidade 11, em que pelo menos um sintoma da doença neurodegenerativa apresenta melhora.

[00084] Modalidade 13: O método da modalidade 12, em que o sintoma é qualquer um dentre perda de memória, perda de função motora e aumento do número e/ou volume de inclusões neurofibrilares.

[00085] Modalidade 14: Um oligonucleotídeo modificado, de acordo com a seguinte fórmula:



[00092] o segmento de asa 3' consiste em cinco nucleosídeos 2'-MOE;

[00093] em que o oligonucleotídeo modificado tem a sequência de nucleobases 5'-CCGTTTTCTTACCACCCT-3 '(SEQ ID NO:8), em que cada citosina é uma 5-metilcitosina; e em que as ligações internucleosídicas do oligonucleotídeo modificado são, de 5' a 3', sssssssssssssoss, em que cada s é uma ligação fosforotioato e cada o é uma ligação fosfodiéster.

[00094] Modalidade 17: Um oligonucleotídeo modificado, em que o oligonucleotídeo modificado é um gapmer consistindo em um segmento de asa 5', um segmento de gap central e um segmento de asa 3', em que:

[00095] o segmento de asa 5' consiste em cinco nucleosídeos 2'-MOE,

[00096] o segmento de gap central consiste em oito 2'-desoxinucleosídeos, e

[00097] o segmento de asa 3' consiste em cinco nucleosídeos 2'-MOE;

[00098] em que o oligonucleotídeo modificado tem a sequência de nucleobases 5'-CCGTTTTCTTACCACCCT-3 '(SEQ ID NO:8), em que cada citosina é uma 5-metilcitosina; e em que as ligações internucleosídicas do oligonucleotídeo modificado são, de 5' a 3', sssssssssssssoss, em que cada s é uma ligação fosforotioato e cada o é uma ligação fosfodiéster.

[00099] Modalidade 18: Uma população quiralmemente enriquecida de oligonucleotídeos modificados de qualquer uma das modalidades 14, 15 ou 17, em que a população é enriquecida em relação a oligonucleotídeos modificados compreendendo pelo menos uma ligação internucleosídica fosforotioato particular possuindo uma configuração estereoquímica particular.

[000100] Modalidade 19: A população quiralmemente enriquecida da modalidade 18, em que a população é enriquecida em relação aos

oligonucleotídeos modificados compreendendo pelo menos uma ligação internucleosídica fosforotioato particular tendo a configuração (Sp)

[000101] Modalidade 20: A população quiralmemente enriquecida da modalidade 18, em que a população é enriquecida em relação a oligonucleotídeos modificados compreendendo pelo menos uma ligação internucleosídica fosforotioato particular tendo a configuração (Rp).

[000102] Modalidade 21: A população quiralmemente enriquecida da modalidade 18, em que a população é enriquecida em relação aos oligonucleotídeos modificados com uma configuração estereoquímica específica selecionada independentemente em cada ligação internucleosídica fosforotioato.

[000103] Modalidade 22: A população quiralmemente enriquecida da modalidade 21, em que a população é enriquecida em relação aos oligonucleotídeos modificados com uma configuração (Sp) em cada ligação internucleosídica fosforotioato.

[000104] Modalidade 23: A população quiralmemente enriquecida da modalidade 21, em que a população é enriquecida em relação aos oligonucleotídeos modificados com a configuração (Rp) em cada ligação internucleosídica fosforotioato.

[000105] Modalidade 24: A população quiralmemente enriquecida da modalidade 21, em que a população é enriquecida em relação aos oligonucleotídeos modificados com uma configuração (Rp) em uma ligação internucleosídica fosforotioato particular e a configuração (Sp) em cada uma das ligações internucleosídicas fosforotioato remanescentes.

[000106] Modalidade 25: A população quiralmemente enriquecida da modalidade 18 ou da modalidade 21, em que a população é enriquecida em relação a oligonucleotídeos modificados com pelo menos 3 ligações internucleosídicas fosforotioato contíguas nas configurações Rp, Sp e Sp, no sentido 5' para 3'.

[000107] Modalidade 26: Uma população quiralmemente enriquecida de oligonucleotídeos modificados de qualquer uma das modalidades 1-17, em que todas as ligações internucleosídicas fosforotioato do oligonucleotídeo modificado são estereorrandômicas.

[000108] Modalidade 27: Uma composição farmacêutica compreendendo o oligonucleotídeo modificado de qualquer uma das modalidades 14, 15 ou 17 e um diluente ou carreador farmaceuticamente aceitável.

[000109] Modalidade 28: Uma composição farmacêutica compreendendo a população de oligonucleotídeos modificados de qualquer das modalidades 18-26 e um diluente ou carreador farmaceuticamente aceitável.

[000110] Modalidade 29: A composição farmacêutica da modalidade 27 ou da modalidade 28, em que o diluente farmaceuticamente aceitável é tampão fosfato-salino (PBS) ou CSF artificial (aCSF).

[000111] Modalidade 30: A composição farmacêutica da modalidade 27 ou modalidade 28, em que a composição farmacêutica consiste essencialmente no oligonucleotídeo modificado e tampão fosfato-salino (PBS) ou CSF artificial (aCSF).

### **Certos Oligonucleotídeos**

[000112] Em certas modalidades, são fornecidos neste documento oligonucleotídeos que consistem em nucleosídeos ligados. Os oligonucleotídeos podem ser oligonucleotídeos não modificados (RNA ou DNA) ou podem ser oligonucleotídeos modificados. Os oligonucleotídeos modificados compreendem pelo menos uma modificação em relação ao RNA ou DNA não modificado. Isto é, os oligonucleotídeos modificados compreendem pelo menos um nucleosídeo modificado (compreendendo uma fração de açúcar modificado e/ou uma nucleobase modificada) e/ou pelo menos uma ligação internucleosídica modificada.

### **Certos Nucleosídeos Modificados**

[000113] Os nucleosídeos modificados compreendem uma porção de açúcar modificada ou uma nucleobase modificada ou ambas uma porção de açúcar modificada e uma nucleobase modificada.

### **Determinadas Frações de Açúcar**

[000114] Em certas modalidades, as porções de açúcar modificadas são porções de açúcares modificadas não bicíclicas. Em determinadas modalidades, as frações de açúcar modificado são frações de açúcar bicíclico ou tricíclico. Em determinadas modalidades, frações de açúcar modificado são substitutos do açúcar. Esses substitutos de açúcar podem compreender uma ou mais substituições correspondentes às de outros tipos de porções de açúcar modificadas.

[000115] Em certas modalidades, as frações de açúcar modificado são frações de açúcar não modificado bicíclico compreendendo um anel furanosila com um ou mais grupos substituintes, em que nenhum deles liga dois átomos do anel furanosila para formar uma estrutura bicíclica. Tais substituintes não ligantes podem estar em qualquer posição da furanosila, incluindo, sem limitação, substituintes nas posições 2', 4' e/ou 5'. Em certas modalidades, um ou mais substituintes não ligantes de frações de açúcar modificado não bicíclico são ramificados. Exemplos de grupos substituintes em 2' adequados para frações de açúcar modificado não bicíclico incluem, sem limitação: 2'-F, 2'-OCH<sub>3</sub> ("OMe" ou "O-metila") e 2'-O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub> ("MOE"). Em certas modalidades, grupos substituintes em 2' são selecionados entre: halo, alila, amino, azido, SH, CN, OCN, CF<sub>3</sub>, OCF<sub>3</sub>, O-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alcóxi, O-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alcóxi substituído, O-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alquila, O-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alquila substituída, S-alquila, N(R<sub>m</sub>)-alquila, O-alquenila, S-alquenila, N(R<sub>m</sub>)-alquenila, O-alquinila, S-alquinila, N(R<sub>m</sub>)-alquinila, O-alquilenil-O-alquila, alquinila, alcarila, aralquila, O-alcarila, O-aralquila, O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>ON(R<sub>m</sub>)(R<sub>n</sub>) ou OCH<sub>2</sub>C(=O)-N(R<sub>m</sub>)(R<sub>n</sub>), onde R<sub>m</sub> e R<sub>n</sub> são,

independentemente, H, um grupo protetor amino ou C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alquila substituída ou não substituída, e grupos substituintes em 2' descritos Cook et al., US 6.531.584; Cook et al., US 5.859.221; e Cook et al., US 6.005.087. Em determinadas modalidades, estes grupos substituintes em 2' podem ser substituídos ainda por um ou mais grupos substituintes independentemente selecionados entre: hidroxila, amina, alcóxi, carbóxi, benzila, fenila, nitro (NO<sub>2</sub>), tiol, tioalcóxi tioalquila, halogênio, alquila, arila, alquenila e alquinila. Exemplos de grupos substituintes 4' adequados para porções de açúcares não bicíclicas modificadas incluem, mas não estão limitados a alcóxi (por exemplo, metóxi), alquila e aqueles descritos em Manoharan et al., WO 2015/106128. Exemplos de grupos substituintes em 5' adequados para frações de açúcar modificado não bicíclico incluem, sem limitação: 5'-metil (R ou S), 5'-vinil e 5'-metóxi. Em certas modalidades, as frações de açúcar modificado não bicíclico compreendem mais de um substituinte de açúcar não ligante, por exemplo, frações de açúcar de 2'-F-5'-metil e as frações de açúcar modificado e nucleosídeos modificados descritos em Migawa et al., WO 2008/101157 e Rajeev et al., US2013/0203836).

[000116] Em certas modalidades, um nucleosídeo modificado não bicíclico substituído em 2' compreende uma fração de açúcar compreendendo um grupo substituinte em 2' não ligante selecionado entre: F, NH<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>, OCF<sub>3</sub>, OCH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>, OCH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>ON(R<sub>m</sub>)(R<sub>n</sub>), O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> e acetamida N-substituída (OCH<sub>2</sub>C(=O)-N(R<sub>m</sub>)(R<sub>n</sub>)), onde R<sub>m</sub> e R<sub>n</sub> são, independentemente, H, um grupo protetor amino ou C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alquila substituída ou não substituída.

[000117] Em certas modalidades, um nucleosídeo substituído em 2' e nucleosídeo modificado não bicíclico compreendem uma fração de açúcar compreendendo um grupo substituinte em 2' não ligante selecionado entre: F, OCF<sub>3</sub>, OCH<sub>3</sub>, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>,

$\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{ON}(\text{CH}_3)_2$ ,  $\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ , e  $\text{OCH}_2\text{C}(=\text{O})-\text{N}(\text{H})\text{CH}_3$  ("NMA").

[000118] Em certas modalidades, um nucleosídeo modificado não bicíclico substituído em 2' compreende uma fração de açúcar compreendendo um grupo substituinte em 2' não ligante selecionado entre: F,  $\text{OCH}_3$ , e  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$ .

[000119] Certas frações de açúcar modificado compreendem um substituinte de liga dois átomos do anel furanosila para formar um segundo anel resultando em uma fração de açúcar bicíclico. Em algumas dessas modalidades, a fração de açúcar bicíclica compreende uma ponte entre os átomos do anel de furanose em 4' e 2'. Exemplos desses substituintes de açúcar ligantes de 4' a 2' incluem, entre outros: 4'- $\text{CH}_2$ -2', 4'-( $\text{CH}_2$ )<sub>2</sub>-2', 4'-( $\text{CH}_2$ )<sub>3</sub>-2', 4'- $\text{CH}_2$ -O-2' ("LNA"), 4'- $\text{CH}_2$ -S-2', 4'-( $\text{CH}_2$ )<sub>2</sub>-O-2' ("ENA"), 4'-CH( $\text{CH}_3$ )-O-2' (denominado "etil restrito" ou "cEt"), 4'- $\text{CH}_2$ -O- $\text{CH}_2$ -2', 4'- $\text{CH}_2$ -N(R)-2', 4'-CH( $\text{CH}_2\text{OCH}_3$ )-O-2' ("MOE restrito" ou "cMOE") e seus análogos (vide, por exemplo, Seth et al., US 7.399.845, Bhat et al., US 7.569.686, Swayze et al., US 7.741.457, e Swayze et al., US 8.022.193), 4'-C( $\text{CH}_3$ )( $\text{CH}_3$ )-O-2' e seus análogos (vide, por exemplo, Seth et al., US 8.278.283), 4'- $\text{CH}_2$ -N( $\text{OCH}_3$ )-2' e seus análogos (vide, por exemplo, Prakash et al., US 8.278.425), 4'- $\text{CH}_2$ -O-N( $\text{CH}_3$ )-2' (vide, por exemplo, Allerson et al., US 7.696.345 e Allerson et al., US 8.124.745), 4'- $\text{CH}_2$ -C(H)( $\text{CH}_3$ )-2' (vide, por exemplo, Zhou, et al., *J. Org. Chem.*, 2009, 74, 118-134), 4'- $\text{CH}_2$ -C(=CH<sub>2</sub>)-2' e seus análogos (vide, por exemplo, Seth et al., US 8.278.426), 4'-C(R<sub>a</sub>R<sub>b</sub>)-N(R)-O-2', 4'-C(R<sub>a</sub>R<sub>b</sub>)-O-N(R)-2', 4'- $\text{CH}_2$ -O-N(R)-2', e 4'- $\text{CH}_2$ -N(R)-O-2', em que R, R<sub>a</sub>, e R<sub>b</sub> são, independentemente, H, um grupo protetor, ou C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> alquila (vide, por exemplo, Imanishi et al., US 7.427.672).

[000120] Em certas modalidades, essas pontes 4' para 2' compreendem, independentemente, de 1 a 4 grupos ligados

selecionados, independentemente, entre:  $-[C(R_a)(R_b)]_n-$ ,  $-[C(R_a)(R_b)]_n-O$ ,  $-C(R_a)=C(R_b)-$ ,  $-C(R_a)=N-$ ,  $-C(=NR_a)-$ ,  $-C(=O)-$ ,  $-C(=S)-$ ,  $-O-$ ,  $-Si(R_a)_2-$ ,  $-S(=O)_x-$ , e  $-N(R_a)-$ ;

[000121] em que:

[000122]  $x$  é 0, 1, ou 2;

[000123]  $n$  é 1, 2, 3 ou 4;

[000124] cada  $R_a$  e  $R_b$  é, independentemente, H, um grupo protetor, hidroxila, alquila  $C_1-C_{12}$ , alquila substituída  $C_1-C_{12}$ , alquenila  $C_2-C_{12}$ , alquenila substituída  $C_2-C_{12}$ , alquinila  $C_2-C_{12}$ , alquinila substituída  $C_2-C_{12}$ , arila  $C_5-C_{20}$ , arila substituída  $C_5-C_{20}$ , radical heterocíclico, radical heterocíclico substituído, heteroarila, heteroarila substituída, radical alicíclico  $C_5-C_7$ , radical alicíclico substituído  $C_5-C_7$ , halogênio,  $OJ_1$ ,  $NJ_1J_2$ ,  $SJ_1$ ,  $N_3$ ,  $COOJ_1$ , acila ( $C(=O)-H$ ), acila substituída, CN, sulfonila ( $S(=O)_2-J_1$ ), ou sulfoxila ( $S(=O)-J_1$ ); e

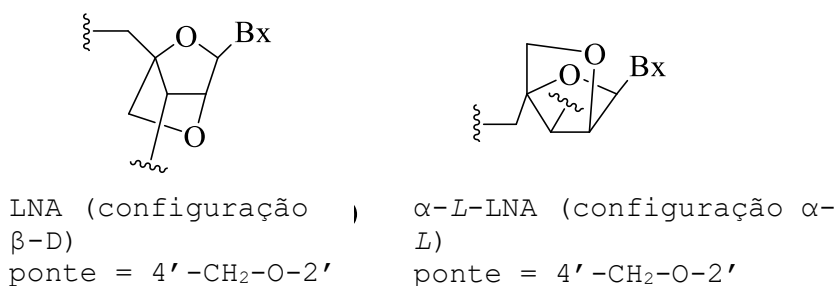
[000125] cada  $J_1$  e  $J_2$  é, independentemente, H,  $C_1-C_{12}$  alquila,  $C_1-C_{12}$  alquila substituída,  $C_2-C_{12}$  alquenila,  $C_2-C_{12}$  alquenila substituída,  $C_2-C_{12}$  alquinila,  $C_2-C_{12}$  alquinila substituída,  $C_5-C_{20}$  arila,  $C_5-C_{20}$  arila substituída, ( $C(=O)-H$ ) acila, acila substituída, um radical heterociclo, um radical heterociclo substituído,  $C_1-C_{12}$  aminoalquila,  $C_1-C_{12}$  aminoalquila substituída ou um grupo protetor.

[000126] As frações de açúcar bicíclico adicionais são conhecidas na técnica, vide, por exemplo: Freier *et al.*, *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(22), 4429-4443; Albaek *et al.*, *J. Org. Chem.*, 2006, 71, 7731-7740; Singh *et al.*, *Chem. Commun.*, 1998, 4, 455-456; Koshkin *et al.*, *Tetrahedron*, 1998, 54, 3607-3630; Kumar *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1998, 8, 2219-2222; Singh *et al.*, *J. Org. Chem.*, 1998, 63, 10035-10039; Srivastava *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 20017, 129, 8362-8379; Wengel *et al.*, US 7.053.207; Imanishi *et al.*, US 6.268.490; Imanishi *et al.* US 6.770.748; Imanishi *et al.*, USRE44.779; Wengel *et al.*, US 6.794.499; Wengel *et al.*, US 6.670.461; Wengel *et al.*, US



7.034.133; Wengel et al., US 8.080.644; Wengel et al., US 8.034.909; Wengel et al., US 8.153.365; Wengel et al., US 7.572.582; e Ramasamy et al., US 6.525.191;; Torsten et al., WO 2004/106356; Wengel et al., WO 1999/014226; Seth et al., WO 2007/134181; Seth et al., US 7.547.684; Seth et al., US 7.666.854; Seth et al., US 8.088.746; Seth et al., US 7.750.131; Seth et al., US 8.030.467; Seth et al., US 8.268.980; Seth et al., US 8.546.556; Seth et al., US 8.530.640; Migawa et al., US 9.012.421; Seth et al., US 8.501.805; e Publicações de Patentes US nº Allerson et al., US2008/0039618 e Migawa et al., US2015/0191727.

[000127] Em determinadas modalidades, as frações de açúcar bicíclicas e os nucleosídeos que incorporam essas frações de açúcar bicíclicas são definidas ainda pela configuração isomérica. Por exemplo, um nucleosídeo LNA (descrito aqui) pode estar na configuração  $\alpha$ -L ou na configuração  $\beta$ -D.



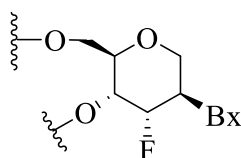
[000128] Nucleosídeos bicíclicos de  $\alpha$ -L-metileno-óxi (4'-CH<sub>2</sub>-O-2') ou  $\alpha$ -L-LNA foram incorporados aos oligonucleotídeos que mostraram atividade antisenso (Frieden et al., *Nucleic Acids Research*, 2003, 21, 6365-6372). Neste documento, as descrições gerais dos nucleosídeos bicíclicos incluem ambas as configurações isoméricas. Quando as posições de nucleosídeos bicíclicos específicos (por exemplo, LNA ou cEt) são identificados nas modalidades exemplificadas neste documento, estão na configuração  $\beta$ -D, a menos que especificado de outra forma.

[000129] Em determinadas modalidades, as frações de açúcar modificadas compreendem um ou mais substituintes de açúcar sem ponte e um ou mais substituinte de açúcar com ponte (por exemplo,

açúcares com ponte substituídos em 5' ou em 4'-2').

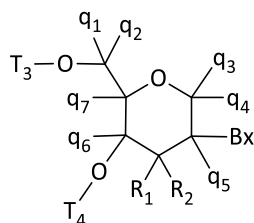
[000130] Em determinadas modalidades, frações de açúcar modificado são substitutos do açúcar. Em certas modalidades, o átomo de oxigênio da porção de açúcar é substituído, por exemplo, com um átomo de enxofre, carbono ou nitrogênio. Em algumas dessas modalidades, essas frações de açúcar modificadas também compreende substituintes com e/ou sem ponte conforme descrito aqui. Por exemplo, certos substitutos de açúcar compreendem um átomo de 4'-enxofre e uma substituição na posição 2' (vide, por exemplo, Bhat et al., US 7.875.733 e Bhat et al., US 7.939.677) e/ou a posição 5'.

[000131] Em determinadas modalidades, os substitutos de açúcar compreendem anéis com mais de 5 átomos. Por exemplo, em determinadas modalidades, um substituto do açúcar compreende um tetra-hidropirano ("THP") de seis membros. Tais tetra-hidropiranos podem ser ainda modificados ou substituídos. Os nucleosídeos que compreendem tais tetrahidropiranos modificados incluem, mas não estão limitados a, ácido nucleico de hexitol ("HNA"), ácido nucleico de anitol ("ANA"), ácido nucleico de manitol ("MNA") (vide, por exemplo, Leumann, *CJ. Bioorg. & Med. Chem.* 2002, 10, 841-854), fluoro HNA:



F-HNA

[000132] ("F-HNA", vide, por exemplo, Swayze et al., US 8.088.904; Swayze et al., US 8.440.803; Swayze et al., US 8.796.437; e Swayze et al., US 9.005.906; F-HNA também pode ser referido como um F-THP ou 3'-flúor-tetra-hidropirano) e nucleosídeos compreendendo compostos THP adicionais modificados com a fórmula:



[000133] em que, independentemente, para cada um dos referidos nucleosídeos de THP modificados:

[000134] Bx é uma fração de nucleobase;

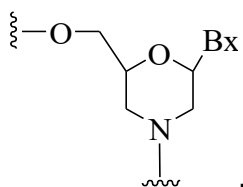
[000135] T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub> são cada um, independentemente, um grupo de ligação internucleosídica que liga o nucleosídeo de THP modificado ao restante de um oligonucleotídeo ou um dentre T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub> é um grupo de ligação internucleosídica que liga o nucleosídeo de THP modificado ao restante de um oligonucleotídeo e o outro de T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub> é H, um grupo protetor hidroxila, um grupo conjugado ligado ou um grupo terminal 5' ou 3';

[000136] q<sub>1</sub>, q<sub>2</sub>, q<sub>3</sub>, q<sub>4</sub>, q<sub>5</sub>, q<sub>6</sub> e q<sub>7</sub> são, independentemente, H, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alquila, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alquila substituída, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> alquenila, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> alquenila substituída, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> alquinila ou C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> alquinila substituída; e

[000137] cada um de R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> são selecionados, independentemente, dentre: hidrogênio, halogênio, alcóxi substituído ou não substituído, NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>, SJ<sub>1</sub>, N<sub>3</sub>, OC(=X)J<sub>1</sub>, OC(=X)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>, NJ<sub>3</sub>C(=X)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>, e CN, em que X é O, S ou NJ<sub>1</sub>, e J<sub>1</sub>, J<sub>2</sub>, e J<sub>3</sub> são, independentemente, H ou C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alquila.

[000138] Em certas modalidades, os nucleosídeos modificados THP são fornecidos em que q<sub>1</sub>, q<sub>2</sub>, q<sub>3</sub>, q<sub>4</sub>, q<sub>5</sub>, q<sub>6</sub> e q<sub>7</sub> são cada um H. Em certas modalidades, pelo menos um de q<sub>1</sub>, q<sub>2</sub>, q<sub>3</sub>, q<sub>4</sub>, q<sub>5</sub>, q<sub>6</sub> e q<sub>7</sub> é diferente de H. Em certas modalidades, pelo menos um de q<sub>1</sub>, q<sub>2</sub>, q<sub>3</sub>, q<sub>4</sub>, q<sub>5</sub>, q<sub>6</sub> e q<sub>7</sub> é metil. Em certas modalidades, são fornecidos nucleosídeos THP modificados em que R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> é F. Em certas modalidades, R<sub>1</sub> é F e R<sub>2</sub> é H, em certas modalidades, R<sub>1</sub> é metóxi e R<sub>2</sub> é H, e, em certas modalidades, R<sub>1</sub> é metoxietóxi e R<sub>2</sub> é H.

[000139] Em determinadas modalidades, os substitutos de açúcar compreendem anéis com mais de 5 átomos e mais de um heteroátomo. Por exemplo, os nucleosídeos compreendendo frações de açúcar morfolino e seu uso em oligonucleotídeos (vide, por exemplo, Braasch et al., *Biochemistry*, 2002, 41, 4503-4510 e Summerton et al., US 5.698.685; Summerton et al., US 5.166.315; Summerton et al., US 5.185.444 e Summerton et al., US 5.034.506). Como usado neste documento, o termo "morfolino" se refere a um substituto de açúcar com a seguinte estrutura:



[000140] Em determinadas modalidades, os morfolinos podem ser modificados, por exemplo, pelo acréscimo ou alteração de vários grupos substituintes da estrutura do morfolino acima. Esses substitutos do açúcar são mencionados neste documento como "morfolinos modificados".

[000141] Em certas modalidades, os substitutos de açúcar compreendem frações acíclicas. Exemplos de nucleosídeos e oligonucleotídeos que compreendem tais substitutos de açúcar acíclico incluem, mas não estão limitados a: ácido nucleico peptídico ("PNA"), ácido nucleico de butilo acíclico (vide, por exemplo, Kumar et al., *Org. Biomol. Chem.*, 2013, 11, 5853-5865), e nucleosídeos e oligonucleotídeos descritos em Manoharan et al., WO2011/133876.

[000142] Muitos outros sistemas de anel de substituição de açúcar e açúcar tricíclico e bicíclico são conhecidos na técnica que podem ser usados em nucleosídeos modificados).

### **Certas Nucleobases Modificadas**

[000143] Em certas modalidades, os oligonucleotídeos modificados compreendem um ou mais nucleosídeos compreendendo uma

nucleobase não modificada. Em certas modalidades, os oligonucleotídeos modificados compreendem um ou mais nucleosídeos compreendendo uma nucleobase modificada. Em certas modalidades, os oligonucleotídeos modificados compreendem um ou mais nucleosídeos que não compreendem uma nucleobase, referida como um nucleosídeo abásico.

[000144] Em certas modalidades, as nucleobases modificadas são selecionadas entre: Pirimidinas 5-substituídas, 6-azapirimidinas, pirimidinas substituídas por alquila ou alquinila, purinas substituídas por alquila, e purinas substituídas por N-2, N-6 e O-6. Em certas modalidades, as nucleobases modificadas são selecionadas entre: 2-aminopropiladenina, 5-hidroximetil citosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, metilguanina-N-6, 6-N-metiladenina, propiladenina-2, 2-tiouracila, tiotimina-2 e 2-tiocitosina, 5-propinilo ( $-C\equiv C-CH_3$ ) uracila, 5-propinilcitosina, azouracila-6, 6-azocitosina, 6-azotimina, 5-ribosiluracil (pseudouracila), 4-tiouracila, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, tioalquila-8, 8-hidroxila, 8-aza e outras purinas 8 - substituídas, 5-halo, particularmente 5-bromo, 5-trifluorometila, 5-halouracil e halocitosina-5, 7-metilguanina 7-metiladenina, 2-F-adenina, 2-aminoadenina, deazaguanina-7, 7-dezaadenina, deazaguanina-3, 3-dezaadenina, 6-N-benzoiladenina, N-2-isobutirilguanina, 4-N-benzoilcitosina, 4-N-benzoiluracila, 5-metil-4-N-benzoilcitosina, 4 de 5-metil-N-benzoiluracila, bases universais, bases hidrofóbicas, bases promíscuas, bases de tamanho expandido e bases fluoradas. Outras nucleobases modificadas incluem pirimidinas tricíclicas, tais como 1,3-diazafenoxazina-2-ona, 1,3-diazapenotiazina-2-ona e 9-(2-aminoetoxi)-1,3-diazafenoxazina-2-ona (G-clamp) . As nucleobases modificadas também podem incluir aquelas em que a base purina ou pirimidina é substituída por outros heterocíclicos, por exemplo, 7-deaza-adenina, 7-deazaguanosina, 2-aminopiridina e 2-piridona. Outras nucleobases incluem aquelas divulgadas em Merigan et al., U.

S. 3.687.808, aquelas divulgadas em *The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering*, Kroschwitz, J.I., Ed., John Wiley & Sons, 1990, 858-859; Englisch *et al.*, *Angewandte Chemie*, Edição International, 1991, 30, 613; Sanghvi, Y. S., Capítulo 15 , *Antisense Research and Applications*, Crooke, S. T. e Lebleu, B., Eds., CRC Press, 1993, 273-288; aquelas divulgadas nos Capítulos 6 e 15, *Antisense Drug Technology*, Crooke S. T., Ed., CRC Press, 2008, 163-166 e 442-443.

[000145] As publicações que ensinam a preparação de certas nucleobases modificadas notadas acima, bem como outras nucleobases modificadas incluem, sem limitação, Manoharan *et al.*, US2003/0158403; Manoharan *et al.*, US2003/0175906; Dinh *et al.*, US 4.845.205; Spielvogel *et al.*, US 5.130.302; Rogers *et al.*, US 5.134.066; Bischofberger *et al.*, US 5.175.273; Urdea *et al.*, US 5.367.066; Benner *et al.*, US 5.432.272; Matteucci *et al.*, US 5.434.257; Gmeiner *et al.*, US 5.457.187; Cook *et al.*, US 5.459.255; Froehler *et al.*, US 5.484.908; Matteucci *et al.*, US 5.502.177; Hawkins *et al.*, US 5.525.711; Haralambidis *et al.*, US 5.552.540; Cook *et al.*, US 5.587.469; Froehler *et al.*, US 5.594.121; Switzer *et al.*, US 5.596.091; Cook *et al.*, US 5.614.617; Froehler *et al.*, US 5.645.985; Cook *et al.*, US 5.681.941; Cook *et al.*, US 5.811.534; Cook *et al.*, US 5.750.692; Cook *et al.*, US 5.948.903; Cook *et al.*, US 5.587.470; Cook *et al.*, US 5.457.191; Matteucci *et al.*, US 5.763.588; Froehler *et al.*, US 5.830.653; Cook *et al.*, US 5.808.027; Cook *et al.*, 6.166.199; e Matteucci *et al.*, US 6.005.096.

### **Certas Ligações Internucleosídicas Modificadas**

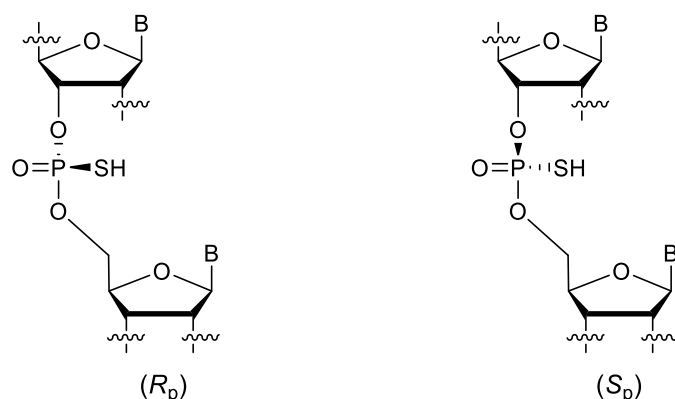
[000146] Em certas modalidades, os nucleosídeos de oligonucleotídeos modificados podem ser ligados entre si usando qualquer ligação internucleosídica. As duas classes principais dos grupos de ligação do internucleosídeo são definidas pela presença ou

ausência de um átomo de fósforo. Ligações internucleosídicas contendo fósforo representativas incluem, sem limitação, fosfatos, que contêm uma ligação fosfodiéster ("P=O") (também denominada ligações não modificadas ou de ocorrência natural), fosfotriésteres, metilfosfonatos, fosforamidatos e fosforotioatos ("P=S ") e fosforoditioatos ("HS-P=S "). Grupos de ligação internucleosídica contendo não-fósforo representativos incluem, sem limitação, metilenometilimino (-CH-N(CH<sub>3</sub>)-O-CH<sub>2</sub>-); tiodiéster, tionocarbamato (-O-C(=O)(NH)-S-); siloxano (-O-SiH<sub>2</sub>-O-); e N,N'-dimetil-hidrazina (-CH<sub>2</sub>-N-CH<sub>3</sub>)-N(CH<sub>3</sub>-). Ligações internucleosídicas modificadas, comparadas com ligações fosfato de ocorrência natural, podem ser usadas para alterar, tipicamente, a resistência à nuclease do oligonucleotídeo. Os métodos de preparação das ligações de internucleosídeo contendo fósforo e não-fósforo são bem conhecidas pelos versados na técnica.

[000147] As ligações internucleosídicas representativas com um centro quiral incluem, sem limitação, alquilfosfonatos e fosforotioatos. Os oligonucleotídeos modificados compreendendo ligações internucleosídicas com um centro quiral podem ser preparados como populações de oligonucleotídeos modificados compreendendo ligações internucleosídicas estereorrandômicas ou como populações de oligonucleotídeos modificados compreendendo ligações fosforotioato em configurações estereoquímicas particulares. Em certas modalidades, as populações de oligonucleotídeos modificados compreendem ligações internucleosídicas fosforotioato em que todas as ligações internucleosídicas fosforotioato são estereo-randomizadas. Tais oligonucleotídeos modificados podem ser gerados usando métodos sintéticos que resultam na seleção randômica da configuração estereoquímica de cada ligação fosforotioato. No entanto, como é bem compreendido pelos versados na técnica, cada fosforotioato individual de cada molécula oligonucleotídica individual tem uma

estereoconfiguração definida. Em certas modalidades, as populações de oligonucleotídeos modificados são enriquecidas em relação a oligonucleotídeos modificados compreendendo uma ou mais ligações internucleosídicas fosforotioato particulares em uma configuração estereoquímica particular, independentemente selecionada. Em certas modalidades, a configuração particular da ligação fosforotioato particular está presente em pelo menos 65% das moléculas na população. Em certas modalidades, a configuração particular da ligação fosforotioato particular está presente em pelo menos 70% das moléculas na população. Em certas modalidades, a configuração particular da ligação fosforotioato particular está presente em pelo menos 80% das moléculas na população. Em certas modalidades, a configuração particular da ligação fosforotioato particular está presente em pelo menos 90% das moléculas na população. Em certas modalidades, a configuração particular da ligação fosforotioato particular está presente em pelo menos 99% das moléculas na população. Tais populações quiralmemente enriquecidas de oligonucleotídeos modificados podem ser geradas utilizando métodos sintéticos conhecidos na técnica, por exemplo, modos descritos em Oka et al., *JACS* 125, 8307 (2003), Wan et al. *Nuc. Acid. Res.* 42, 13456 (2014), e WO 2017/015555. Em certas modalidades, uma população de oligonucleotídeos modificados é enriquecida em relação aos oligonucleotídeos modificados com pelo menos um fosforotioato indicado na configuração (Sp). Em certas modalidades, uma população de oligonucleotídeos modificados é enriquecida em relação a oligonucleotídeos modificados com pelo menos um fosforotioato na configuração (Rp). Em certas modalidades, os oligonucleotídeos modificados compreendendo fosforotioatos (Rp) e/ou (Sp) compreendem uma ou mais das seguintes fórmulas, respectivamente, em que "B" indica uma nucleobase:





[000148] Salvo indicação em contrário, as ligações internucleosídicas quirais de oligonucleotídeos modificados descritas neste documento podem ser estereo-randomizadas ou, em uma configuração estereoquímica particular.

[000149] As ligações internucleosídicas neutras incluem, entre outros, fosfotriésteres, metilfosfonatos, MMI (3'-CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)-O-5'), amida-3 (3'-CH<sub>2</sub>-C(=O)-N(H)-5'), amida-4 (3'-CH<sub>2</sub>-N(H)-C(=O)-5'), formacetal (3'-O-CH<sub>2</sub>-O-5'), metóxiopropila, e tioformacetal (3'-S-CH<sub>2</sub>-O-5'). Outras ligações internucleosídicas neutras incluem ligações não-iônicas, compreendendo siloxano (dialquilsiloxano), éster carboxilato, carboxamidas, sulfeto, éster sulfonato e amidas (ver, por exemplo: *Carbohydrate Modifications in Antisense Research*; Y. S. Sanghvi and P. D. Cook, Eds., ACS Symposium Series 580; Capítulos 3 e 4, 40-65). Outras ligações internucleosídicas neutras incluem ligações não-iônicas, compreendendo partes de componente N, O, S e CH<sub>2</sub> misturadas.

### **Certos Motivos**

[000150] Em determinadas modalidades, os oligonucleotídeos modificados compreendem um ou mais nucleosídeos modificados que compreendem uma fração de açúcar modificado. Em certas modalidades, os oligonucleotídeos modificados compreendem um ou mais nucleosídeos modificados que compreendem uma nucleobase modificada. Em determinadas modalidades, os oligonucleotídeos

modificados compreendem uma ou mais ligações modificadas. Em tais modalidades, as frações de açúcar, nucleobases e/ou ligações internucleosídicas modificadas, não modificadas e modificadas de forma diferente de um oligonucleotídeo modificado definem um padrão ou motivo. Em certas modalidades, os padrões de frações de açúcar, nucleobases e ligações internucleosídicas são independentes uns dos outros. Assim, um oligonucleotídeo modificado pode ser descrito pelo seu motivo de açúcar, motivo de nucleobase e/ou motivo de ligação internucleosídica (tal como utilizado neste documento, motivo de nucleobase descreve as modificações nas nucleobases independentes da sequência de nucleobases).

#### **Determinados Motivos de Açúcar**

[000151] Em determinadas modalidades, os oligonucleotídeos compreendem um ou mais tipos de açúcar modificados e/ou frações de açúcar modificadas dispostas ao longo de um oligonucleotídeo ou da sua região em um padrão definido ou motivo de açúcar. Em certos casos, tais motivos de açúcar incluem, mas não estão limitados a, nenhuma das modificações de açúcar discutidas neste documento.

[000152] Em certas modalidades, os oligonucleotídeos modificados compreendem ou consistem em uma região com um motivo gapmer, que é definido por duas regiões externas ou "asas" e uma região central ou interna ou "gap". As três regiões de um motivo gapmer (5'-asa, o gap, e 3'-winf) formam uma sequência contígua de nucleosídeos em que pelo menos algumas das frações de açúcar dos nucleosídeos de cada uma das asas diferem de pelo menos algumas das frações de açúcar dos nucleosídeos do gap. Especificamente, pelo menos as frações de açúcar dos nucleosídeos de cada asa que estão mais próximas do gap (o nucleosídeo mais próximo de 3' de 5'-asa e o nucleosídeo mais próximo de 5' de 3'-asa) diferem da fração de açúcar dos nucleosídeos do gap vizinho definindo, assim, o limite entre asas e gap (ou seja, a

junção de asa/gap). Em determinadas modalidades, as frações de açúcar dentro do gap são as mesmas. Em determinadas modalidades, o gap inclui um ou mais nucleosídeos com uma fração de açúcar que difere da fração de açúcar de um ou mais nucleosídeos do gap. Em determinadas modalidades, os motivos de açúcar das duas asas são os mesmos da outra (gapmer simétrico). Em determinadas modalidades, o motivo de açúcar de 5'-asa difere do motivo de açúcar de 3'-asa (gapmer assimétrico).

[000153] Em certas modalidades, as asas de um gapmer compreendem 1-5 nucleosídeos. Em certas modalidades, cada nucleosídeo de cada asa de um gapmer é um nucleosídeo modificado.

[000154] Em certas modalidades, o intervalo de um gapmer compreende 7-12 nucleosídeos. Em certa modalidade, cada nucleosídeo do gap de um gapmer é um 2'-desoxinucleosídeo não modificado.

[000155] Em certas modalidades, o gapmer é um desóxi gapmer. Em tais modalidades, os nucleosídeos no lado do gap de cada junção de asa/gap são 2'-desoxinucleosídeos não modificados e os nucleosídeos nos lados da asa de cada junção de asa/gap são nucleosídeos modificados. Em certas modalidades, cada nucleosídeo do gap é um 2'-desoxinucleosídeo não modificado. Em certas modalidades, cada nucleosídeo de cada asa de um gapmer é um nucleosídeo modificado.

[000156] Em certas modalidades, os oligonucleotídeos modificados compreendem ou consistem em uma região com um motivo de açúcar totalmente modificado. Em tais modalidades, cada nucleosídeo da região totalmente modificada do oligonucleotídeo modificado compreende uma fração de açúcar modificado. Em certas modalidades, cada nucleosídeo para todo o oligonucleotídeo modificado compreende uma fração de açúcar modificada. Em certas modalidades, os oligonucleotídeos modificados compreendem ou consistem em uma

região com um motivo de açúcar totalmente modificado, em que cada nucleosídeo dentro da região totalmente modificada compreende a mesma porção de açúcar modificada, aqui referida como um motivo de açúcar modificado uniformemente. Em certas modalidades, um oligonucleotídeo totalmente modificado é um oligonucleotídeo uniformemente modificado. Em certas modalidades, cada nucleosídeo de uma modificação uniforme compreende a mesma modificação 2'.

[000157] Neste documento, os comprimentos (número de nucleosídeos) das três regiões de um gapmer podem ser fornecidos usando a notação [nº de nucleosídeos em 5'-asa] - [nº de nucleosídeos no gap] - [nº de nucleosídeos em 3'-asa]. Assim, um gapmer 5-8-5 consiste em 5 nucleosídeos ligados em cada asa e 8 nucleosídeos ligados no gap. Quando tal nomenclatura é seguida por uma modificação específica, essa modificação é a modificação em asas e os nucleosídeos de gap compreendem açúcares de desoxinucleosídeos não modificados. Assim, um gapmer MOE 5-8-5 consiste em 5 nucleosídeos modificados MOE ligados em 5'-asa, 8 desoxinucleosídeos ligados em gap, e 5 nucleosídeos MOE ligados em 3'-asa. Em certas modalidades, os oligonucleotídeos modificados são gapmers MOE 5-8-5.

### **Certos Motivos de Nucleobase**

[000158] Em certas modalidades, os oligonucleotídeos compreendem nucleobases modificadas e/ou não modificadas dispostas ao longo do oligonucleotídeo ou região do mesmo em um padrão ou motivo definido. Em certas modalidades, cada nucleobase é modificada. Em certas modalidades, nenhuma das nucleobases é modificada. Em certas modalidades, cada purina ou cada pirimidina é modificada. Em certas modalidades, cada adenina é modificada. Em certas modalidades, cada guanina é modificada. Em certas modalidades, cada timina é modificada. Em certas modalidades, cada uracila é modificada. Em

certas modalidades, cada citosina é modificada. Em certas modalidades, algumas ou todas as nucleobases de citosina em um oligonucleotídeo modificado são 5-metilcitosinas. Em certas modalidades, todas as nucleobases da citosina são 5-metilcitosinas e todas as outras nucleobases do oligonucleotídeo modificado são nucleobases não modificadas.

[000159] Em certas modalidades, os oligonucleotídeos modificados compreendem um bloco de nucleobases modificadas. Nestas tais modalidades, o bloco está na extremidade 3' do oligonucleotídeo. Em certas modalidades, o bloco está dentro de 3 nucleosídeos da extremidade 3' do oligonucleotídeo. Em certas modalidades, o bloco está na extremidade 5' do oligonucleotídeo. Em certas modalidades, o bloco está dentro de 3 nucleosídeos da extremidade 5' do oligonucleotídeo.

[000160] Em certas modalidades, os oligonucleotídeos com um motivo gapmer compreendem um nucleosídeo que compreende uma nucleobase modificada. Em certas modalidades, um nucleosídeo que compreende uma nucleobase modificada está no espaço central de um oligonucleotídeo com um motivo gapmer. Em certas modalidades, a porção de açúcar do referido nucleosídeo é uma porção 2'-desoxiribosila. Em certas modalidades, a nucleobase modificada é selecionada dentre: uma 2-tiopirimidina e uma 5-propinopirimidina.

#### **Determinados Motivos de Ligação Internucleosídica**

[000161] Em certas modalidades, oligonucleotídeos compreendem ligações modificadas e/ou não modificadas arranjadas ao longo do oligonucleotídeo ou região do mesmo em um padrão ou motivo definidos. Em certas modalidades, cada grupo de ligação internucleosídica é uma ligação internucleosídica fosfodiéster (P=O). Em certas modalidades, cada grupo de ligação internucleosídica de um oligonucleotídeo modificado é uma ligação internucleosídica

fosforotioato ( $P=S$ ). Em certas modalidades, cada ligação internucleosídica de um oligonucleotídeo modificado é selecionado, independentemente, de uma ligação internucleosídica fosforotioato e ligação internucleosídica fosfodiéster. Em certas modalidades, cada ligação internucleosídica fosforotioato é selecionada, independentemente, a partir de um fosforotioato estereoromérico, um fosforotioato ( $Sp$ ) e um fosforotioato ( $Rp$ ). Em certas modalidades, o motivo de açúcar de um oligonucleotídeo modificado é um gapmer e as ligações de internucleosídeo no interior do gap são todas modificadas. Em certas modalidades, algumas ou todas as ligações de internucleosídeo nas asas são ligações de fosfato não modificadas. Em certas modalidades, as ligações de internucleosídeo terminais são modificadas. Em certas modalidades, o motivo de açúcar de um oligonucleotídeo modificado é um gapmer, e o motivo de ligação internucleosídica compreende pelo menos uma ligação internucleosídica fosfodiéster em pelo menos uma asa, em que pelo menos uma ligação fosfodiéster não é uma ligação internucleosídica terminal e as ligações internucleosídicas remanescentes são ligações internucleosídicas fosforotioato. Em certas modalidades, todas as ligações fosforotioato são estereorrandômicas. Em certas modalidades, todas as ligações fosforotioato em asas são fosforotioatos ( $Sp$ ) e o gap compreende pelo menos um motivo  $Sp$ ,  $Sp$ ,  $Rp$ . Em certas modalidades, as populações de oligonucleotídeos modificados são enriquecidas em relação aos oligonucleotídeos modificados compreendendo tais motivos de ligação internucleosídica.

### **Certos Comprimentos**

[000162] É possível aumentar ou diminuir o comprimento de um oligonucleotídeo sem eliminar a atividade. Por exemplo, em Woolf et al., (Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 89:7305-7309, 1992), uma série de oligonucleotídeos de 13 a 25 nucleobases de comprimento foi testada

quanto à sua capacidade de induzir a clivagem de um RNA alvo em um modelo de injeção de oócito. Os oligonucleotídeos de 25 nucleobases de comprimento com 8 ou 11 bases de incompatibilidade perto das extremidades dos oligonucleotídeos foram capazes de direcionar a clivagem específica do mRNA alvo, ainda que em uma menor extensão do que os oligonucleotídeos que não continham nenhuma incompatibilidade. De forma similar, a clivagem específica alvo foi obtida usando 13 oligonucleotídeos de nucleobase, incluindo aqueles com 1 ou 3 incompatibilidades.

[000163] Em certas modalidades, os oligonucleotídeos (incluindo oligonucleotídeos modificados) podem ter qualquer variedade de intervalos de comprimento. Em determinadas modalidades, os oligonucleotídeos consistem em nucleosídeos X a Y ligados, onde X representa o menor número de nucleosídeos no intervalo e Y representa o maior número de nucleosídeos no intervalo. Em certas modalidades, X e Y são selecionados, independentemente, entre 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 e 50; desde que  $X \leq Y$ . Por exemplo, em certas modalidades, os oligonucleotídeos consistem em 12 a 13, 12 a 14, 12 a 15, 12 a 16, 12 a 17, 12 a 18, 12 a 19, 12 a 20, 12 a 21, 12 a 22, 12 a 23, 12 a 24, 12 a 25, 12 a 26, 12 a 27, 12 a 28, 12 a 29, 12 a 30, 13 a 14, 13 a 15, 13 a 16, 13 a 17, 13 a 18, 13 a 19, 13 a 20, 13 a 21, 13 a 22, 13 a 23, 13 a 24, 13 a 25, 13 a 26, 13 a 27, 13 a 28, 13 a 29, 13 a 30, 14 a 15, 14 a 16, 14 a 17, 14 a 18, 14 a 19, 14 a 20, 14 a 21, 14 a 22, 14 a 23, 14 a 24, 14 a 25, 14 a 26, 14 a 27, 14 a 28, 14 a 29, 14 a 30, 15 a 16, 15 a 17, 15 a 18, 15 a 19, 15 a 20, 15 a 21, 15 a 22, 15 a 23, 15 a 24, 15 a 25, 15 a 26, 15 a 27, 15 a 28, 15 a 29, 15 a 30, 16 a 17, 16 a 18, 16 a 19, 16 a 20, 16 a 21, 16 a 22, 16 a 23, 16 a 24, 16 a 25, 16 a 26, 16 a 27, 16 a 28, 16 a 29, 16 a 30, 17 a 18, 17 a 19, 17 a 20, 17 a 21, 17 a

22, 17 a 23, 17 a 24, 17 a 25, 17 a 26, 17 a 27, 17 a 28, 17 a 29, 17 a 30, 18 a 19, 18 a 20, 18 a 21, 18 a 22, 18 a 23, 18 a 24, 18 a 25, 18 a 26, 18 a 27, 18 a 28, 18 a 29, 18 a 30, 19 a 20, 19 a 21, 19 a 22, 19 a 23, 19 a 24, 19 a 25, 19 a 26, 19 a 29, 19 a 28, 19 a 29, 19 a 30, 20 a 21, 20 a 22, 20 a 23, 20 a 24, 20 a 25, 20 a 26, 20 a 27, 20 a 28, 20 a 29, 20 a 30, 21 a 22, 21 a 23, 21 a 24, 21 a 25, 21 a 26, 21 a 27, 21 a 28, 21 a 29, 21 a 30, 22 a 23, 22 a 24, 22 a 25, 22 a 26, 22 a 27, 22 a 28, 22 a 29, 22 a 30, 23 a 24, 23 a 25, 23 a 26, 23 a 27, 23 a 28, 23 a 29, 23 a 30, 24 a 25, 24 a 26, 24 a 27, 24 a 28, 24 a 29, 24 a 30, 25 a 26, 25 a 27, 25 a 28, 25 a 29, 25 a 30, 26 a 27, 26 a 28, 26 a 29, 26 a 30, 27 a 28, 27 a 29, 27 a 30, 28 a 29, 28 a 30 ou 29 a 30 nucleosídeos ligados.

### **Certos Oligonucleotídeos Modificados**

[000164] Em certas modalidades, as modificações acima (açúcar, nucleobase, ligação internucleosídica) são incorporadas num oligonucleotídeo modificado. Em certas modalidades, os oligonucleotídeos modificados são caracterizados por seus motivos de modificação e comprimentos globais. Em certas modalidades, tais parâmetros são independentes um do outro. Assim, a menos que indicado em contrário, cada ligação de internucleosídeo do oligonucleotídeo comum motivo de açúcar de gapmer pode ser modificada ou não modificada e pode ou não seguir o padrão de modificação de gapmer das modificações de açúcar. Por exemplo, as ligações de internucleosídeo dentro das regiões de asa de um gapmer de açúcar podem ser as mesmas ou podem ser diferentes uma da outra e podem ser as mesmas ou diferentes das ligações de internucleosídeo da região de gap do motivo de açúcar. Da mesma forma, estes oligonucleotídeos de açúcar de gapmer podem incluir uma ou mais nucleobase modificada independente do padrão gapmer das modificações de açúcar. Salvo indicação em contrário, todas as



modificações são independentes da sequência de nucleobase.

### **Certas populações de oligonucleotídeos modificados**

[000165] As populações de oligonucleotídeos modificados nas quais todos os oligonucleotídeos da população têm a mesma fórmula molecular podem ser populações estereorrandômicas ou populações quirilmente enriquecidas. Todos os centros quirais de todos os oligonucleotídeos modificados são estereorrandômicos em uma população estereorrandômica. Em uma população quirilmente enriquecida, pelo menos um centro quiral particular não é estereorrandômico nos oligonucleotídeos modificados da população. Em certas modalidades, os oligonucleotídeos modificados de uma população quirilmente enriquecida são enriquecidos para frações de açúcar ribosil  $\beta$ -D, e todas as ligações internucleosídicas fosforotioato são estereorrandômicas. Em modalidades, os oligonucleotídeos modificados de uma população quirilmente enriquecida são enriquecidos tanto para as frações de açúcar  $\beta$ -D ribosil como para, pelo menos, uma ligação internucleosídica fosforotioato particular em uma configuração estereoquímica particular.

### **Sequência de Nucleobase**

[000166] Em certas modalidades, os oligonucleotídeos (oligonucleotídeos não modificados ou modificados) são ainda descritos pela sua sequência de nucleobases. Em certas modalidades, oligonucleotídeos têm uma sequência de nucleobase que é complementar a um segundo oligonucleotídeo ou a um ácido nucleico de referência identificado, tal como um ácido nucleico alvo. Em certas modalidades, uma região de um oligonucleotídeo tem uma sequência de nucleobases que é complementar a um segundo oligonucleotídeo ou um ácido nucleico de referência identificado, tal como um ácido nucleico alvo. Em certas modalidades, a sequência de nucleobase de uma região ou o comprimento total de um oligonucleotídeo é pelo menos 50%, pelo

menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% ou 100% complementar ao segundo oligonucleotídeo ou ácido nucleico, tal como um ácido nucleico alvo.

### **Certos Compostos Oligoméricos**

[000167] Em certas modalidades, a invenção proporciona compostos oligoméricos, que consistem num oligonucleotídeo (modificado ou não modificado) e opcionalmente um ou mais grupos conjugados e/ou grupos terminais. Os grupos conjugados consistem em uma ou mais porções conjugadas e um ligante conjugado que liga a porção conjugada ao oligonucleotídeo. Os grupos conjugados podem ser anexados a uma ou a ambas as extremidades de um oligonucleotídeo e/ou em qualquer posição interna. Em certas modalidades, os grupos conjugados estão ligados à posição 2' de um nucleosídeo de um oligonucleotídeo modificado. Em certas modalidades, os grupos conjugados que estão ligados a uma ou a ambas as extremidades de um oligonucleotídeo são grupos terminais. Em tais certas modalidades, grupos conjugados ou grupos terminais estão ligados na extremidade 3' e/ou 5' de oligonucleotídeos. Em tais certas modalidades, os grupos conjugados (ou grupos terminais) estão ligados na extremidade 3' dos oligonucleotídeos. Em certas modalidades, os grupos de conjugado estão ligados próximos da extremidade 3' de oligonucleotídeos. Em certas modalidades, os grupos conjugados (ou grupos terminais) estão ligados na extremidade 5' dos oligonucleotídeos. Em certas modalidades, os grupos conjugados estão ligados próximos da extremidade 5' dos oligonucleotídeos.

[000168] Exemplos de grupos terminais incluem, sem limitação, grupos conjugados, grupos de cobertura, frações de fosfato, grupos protetores, nucleosídeos modificados ou não modificados e dois ou mais nucleosídeos que são independentemente modificados ou não modificados.

### **Certos Grupos de Conjugados**

[000169] Em certas modalidades, os oligonucleotídeos são covalentemente ligados a um ou mais grupos conjugados. Em certas modalidades, os grupos conjugados modificam uma ou mais propriedades do oligonucleotídeo ligado incluindo, entre outros, farmacodinâmica, farmacocinética, estabilidade, ligação, absorção, distribuição de tecido, distribuição celular, absorção celular, carga e/ou depuração. Em certas modalidades, os grupos conjugados conferem uma nova propriedade no oligonucleotídeo ligado como, por exemplo, fluoróforos ou grupos repórteres que permitem a detecção do oligonucleotídeo. Certos grupos conjugados e frações conjugadas foram descritos anteriormente, por exemplo: fração de colesterol (Letsinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA*, 1989, 86, 6553-6556), ácido cólico (Manoharan et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1994, 4, 1053-1060), um tioéter, por exemplo, hexil-S-tritiltiol (Manoharan et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1992, 660, 306-309; Manoharan et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1993, 3, 2765-2770), um tiocolesterol (Oberhauser et al., *Nucl. Acids Res.*, 1992, 20, 533-538), uma cadeia alifática, por exemplo, resíduos de do-decan-diol ou undecil (Saison-Behmoaras et al., *EMBO J.*, 1991, 10, 1111-1118; Kabanov et al., *FEBS Lett.*, 1990, 259, 327-330; Svinarchuk et al., *Biochimie*, 1993, 75, 49-54), um fosfolípido, por exemplo, di-hexadecil-rac-glicerol ou 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato de trietilamônio (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36, 3651-3654; Shea et al., *Nucl. Acids Res.*, 1990, 18, 3777-3783), uma cadeia de poliamina ou polietilenoglicol (Manoharan et al., *Nucleosides & Nucleotides*, 1995, 14, 969-973), ou fração de ácido adamantano acético e palmitil (Mishra et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264, 229-237), uma fração de octadecilamina ou hexilamino-carbonil-oxicolesterol (Crooke et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, 277, 923-937), um grupo tocoferol (Nishina et al., *Molecular Therapy Nucleic*

*Acids*, 2015, 4, e220; e Nishina et al., *Molecular Therapy*, 2008, 16, 734-740), ou um cluster GalNAc (por exemplo, WO2014/179620).

### **Frações Conjugadas**

[000170] As frações conjugadas incluem, sem limitação, intercaladores, moléculas repórter, poliaminas, poliamidas, peptídeos, carboidratos, frações de vitamina, polietilenoglicóis, tioéteres, poliéteres, colesteróis, tiocolesteróis, frações de ácido cólico, folato, lipídios, fosfolipídios, biotina, fenazina, fenantridina, antraquinona, adamantano, acridina, fluoresceínas, rodaminas, cumarinas, fluoróforos e corantes.

[000171] Em determinadas modalidades, um fração conjugada compreende uma droga ativa, por exemplo, aspirina, varfarina, fenilbutazona, ibuprofeno, suprofeno, fenbufeno, cetoprofeno, (S)-(+)-pranoprofeno, carprofeno, dansilsarcosina, ácido 2,3,5-tri-iodobenzoico, fingolimod, ácido flufenâmico, ácido folínico, benzotiadiazida, clorotiazida, diazepina, indometicina, barbiturato, cefalosporina, droga sulfa, antidiabético, agente antibacteriano ou antibiótico.

### **Ligantes Conjugados**

[000172] As frações conjugadas estão ligadas a oligonucleotídeos por meio de ligantes conjugados. Em certos compostos oligoméricos, o ligante conjugado é uma ligação química única (isto é, a fração conjugada é ligada diretamente a um oligonucleotídeo por meio de uma ligação simples). Em certas modalidades, o ligante conjugado compreende uma estrutura da cadeia, tal como uma cadeia de hidrocarbila, ou um oligômero de unidades de repetição como etilenoglicol, nucleosídeos ou unidades de aminoácido.

[000173] Em certas modalidades, um ligante de conjugado compreende um ou mais grupos selecionados dentre alquila, amino, oxo, amida, dissulfeto, polietilenoglicol, éter, tioéter e hidroxilamino. Em tais certas modalidades, o ligante de conjugado compreende grupos

selecionados de alquila, amino, oxo, grupos amida e éter. Em certas modalidades, o ligante de conjugado compreende grupos selecionados de grupos alquil e amida. Em certas modalidades, o ligante de conjugado compreende grupos selecionados dentre grupos alquil e éter. Em certas modalidades, o ligante de conjugado compreende pelo menos uma porção de fósforo. Em modalidades, o ligante de conjugado compreende pelo menos um grupo de fosfato. Em certas modalidades, o ligante de conjugado inclui pelo menos um grupo de ligação neutro.

[000174] Em certas modalidades, os ligantes de conjugado, incluindo os ligantes de conjugado descritos acima, são porções de ligação bifuncionais, por exemplo, aqueles conhecidos na técnica por serem úteis para ligar grupos conjugados a compostos originais, tais como os oligonucleotídeos fornecidos neste documento. Em geral, uma porção de ligação bifuncional compreende pelo menos dois grupos funcionais. Um dos grupos funcionais é selecionado para se ligar a um local particular em um composto original e o outro é selecionado para se ligar a um grupo conjugado. Exemplos de grupos funcionais usados em uma porção de ligação bifuncional incluem, entre outros, eletrófilos que reagem com grupos nucleofílicos e nucleófilos que reagem com grupos eletrofílicos. Em certas modalidades, as porções de ligação bifuncionais compreendem um ou mais grupos selecionados dentre amino, hidroxila, ácido carboxílico, tiol, alquila, alquenila e alquinila.

[000175] Exemplos de ligantes de conjugado incluem, mas não estão limitados a, pirrolidina, ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanoico (ADO), succinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC) e ácido 6-amino-hexanoico (AHEX ou AHA). Outros ligantes conjugados incluem, sem limitação, C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alquila substituída ou não substituída, C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> alquenila substituída ou não substituída ou C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> alquinila substituída ou não substituída, em que uma lista não limitante de grupos substituintes preferenciais incluem hidroxila, amina, alcóxi, carbóxi,

benzila, fenila, nitro, tiol, tioalcóxi, halogênio, alquila, arila, alquenila e alquinila.

[000176] Em certas modalidades, os ligantes conjugados compreendem 1-10 nucleosídeos ligantes. Em certas modalidades, os ligantes conjugados compreendem 2-5 nucleosídeos ligantes. Em certas modalidades, os ligantes conjugados compreendem exatamente 3 nucleosídeos ligantes. Em certas modalidades, os ligantes conjugados compreendem o motivo TCA. Em certas modalidades, tais nucleosídeos ligantes são nucleosídeos modificados. Em certas modalidades, tais nucleosídeos ligantes compreendem uma porção de açúcar modificada. Em certas modalidades, os nucleosídeos ligantes não são modificados. Em certas modalidades, os nucleosídeos ligantes compreendem uma base heterocíclica opcionalmente protegida selecionada de uma purina, purina substituída, pirimidina ou pirimidina substituída. Em determinadas modalidades, uma fração clivável é um nucleosídeo selecionado dentre uracila, timina, citosina, 4-N-benzoilcitosina, 5-metilcitosina, 4-N-benzoil-5-metilcitosina, adenina, 6-N-benzoiladenina, guanina e 2-N-isobutirilguanina. Tipicamente, é desejável que os nucleosídeos de ligação sejam clivados do composto oligomérico depois de atingir um tecido alvo. Consequentemente, os nucleosídeos ligantes são tipicamente ligados um ao outro e ao restante do composto oligomérico através de ligações cliváveis. Em certas concretizações, tais ligações cliváveis são ligações de fosfodiéster.

[000177] Neste documento, os nucleosídeos ligantes não são considerados parte do oligonucleotídeo. Consequentemente, em modalidades em que um composto oligomérico compreende um oligonucleotídeo que consiste num número ou intervalo especificado de nucleosídeos ligados e/ou uma percentagem especificada de complementaridade a um ácido nucleico de referência e o composto oligomérico também compreende um grupo conjugado compreendendo

um ligante conjugado compreendendo nucleosídeos ligantes, esses nucleotídeos ligantes não são contados em relação ao comprimento do oligonucleotídeo e não são utilizados na determinação da percentagem de complementaridade do oligonucleotídeo para o ácido nucleico de referência. Por exemplo, um composto oligomérico pode compreender (1) um oligonucleotídeo modificado que consiste em 8-30 nucleosídeos e (2) um grupo conjugado compreendendo 1 a 10 nucleosídeos ligantes que são contíguos com os nucleosídeos do oligonucleotídeo modificado. O número total de nucleosídeos ligados contíguos é tal que composto oligomérico é superior a 30. Alternativamente, um composto oligomérico pode compreender um oligonucleotídeo modificado constituído por 8-30 nucleosídeos e nenhum grupo conjugado. O número total de nucleosídeos ligados contíguos em tal composto oligomérico não é superior a 30. Salvo indicação em contrário, os ligantes conjugados não compreendem mais de 10 nucleosídeos de ligação. Em certas modalidades, os ligantes conjugados não compreendem mais de 5 nucleosídeos ligantes. Em certas modalidades, os ligantes conjugados não compreendem mais de 3 nucleosídeos ligantes. Em certas modalidades, os ligantes conjugados não compreendem mais de 2 nucleosídeos ligantes. Em certas modalidades, os ligantes conjugados não compreendem mais de 1 nucleosídeo ligante.

[000178] Em certas modalidades, é desejável que um grupo conjugado seja clivado do oligonucleotídeo. Por exemplo, em certas circunstâncias, os compostos oligoméricos que compreendem uma fração conjugada particular são melhor absorvidos por um tipo de célula particular, mas uma vez que o composto oligomérico tiver sido absorvido, é desejável que o grupo conjugado seja clivado para liberar o oligonucleotídeo não conjugado ou de origem. Assim, certos ligantes conjugados podem compreender uma ou mais porções cliváveis. Em

determinadas modalidades, uma porção clivável é uma ligação clivável. Em certas modalidades, uma porção clivável é um grupo de átomos compreendendo pelo menos uma ligação clivável. Em determinadas modalidades, uma fração clivável compreende um grupo de átomos com uma, duas, três, quatro ou mais de quatro ligações cliváveis. Em determinadas modalidades, uma fração clivável está seletivamente clivada no interior de compartimentos celulares ou subcelulares, como um lisossomo. Em determinadas modalidades, uma fração clivável é clivada seletivamente por enzimas endógenas, como as nucleases.

[000179] Em determinadas modalidades, a ligação clivável é selecionada dentre: uma amida, um éster, um éter, um ou ambos ésteres de fosfodiéster, um éster de fosfato, um carbamato, ou um dissulfeto. Em certas modalidades, uma ligação clivável é um ou ambos os ésteres de um fosfodiéster. Em determinadas modalidades, uma fração clivável compreende um fosfato ou fosfodiéster. Em certas modalidades, a fração clivável é uma ligação de fosfato entre um oligonucleotídeo e uma fração de conjugado ou grupo conjugado.

[000180] Em certas modalidades, uma fração clivável compreende ou consiste em um ou mais nucleosídeos ligantes. Em certas modalidades tais, os um ou mais nucleosídeos ligantes estão ligados um ao outro e/ou ao restante do composto oligomérico através de ligações cliváveis. Em certas modalidades, tais ligações cliváveis são ligações de fosfodiéster não modificadas. Em certas modalidades, uma fração clivável é o nucleosídeo 2'-desoxi que está ligado ao nucleosídeo de 3' ou 5'-terminal de um oligonucleotídeo por uma ligação internucleosídica de fosfato e ligado de forma covalente ao restante do ligante conjugado ou porção de conjugado por uma ligação de fosfato ou fosforotioato. Em certas modalidades, a fração clivável é a 2'-desoxiadenosina.

### **Certos Grupos Terminais**

[000181] Em certas modalidades, os compostos oligoméricos



compreendem um ou mais grupos terminais. Em certas modalidades, os compostos oligoméricos compreendem um 5'-fosfato estabilizado. Os 5'-fosfatos estabilizados incluem, sem limitação, 5'-fosfanatos, incluindo, sem limitação, 5'-vinilfosfonatos. Em certas modalidades, os grupos terminais compreendem um ou mais nucleosídeos básicos e/ou nucleosídeos invertidos. Em certas modalidades, os grupos terminais compreendem um ou mais nucleosídeos ligados em 2'. Em certas modalidades, o nucleosídeo ligado em 2' é um nucleosídeo abásico.

### **III. Duplexes Oligoméricos**

[000182] Em certas modalidades, os compostos oligoméricos descritos neste documento compreendem um oligonucleotídeo, com uma sequência de nucleobases complementar a de um ácido nucleico alvo. Em certas modalidades, um composto oligomérico é emparelhado com um segundo composto oligomérico para formar um duplex oligomérico. Tais duplexes oligoméricos compreendem um primeiro composto oligomérico com uma região complementar a um ácido nucleico alvo e um segundo composto oligomérico com uma região complementar ao primeiro composto oligomérico. Em certas modalidades, o primeiro composto oligomérico de um duplex oligomérico compreende ou consiste em (1) um oligonucleotídeo modificado ou não modificado e, opcionalmente, um grupo conjugado e (2) um segundo oligonucleotídeo modificado ou não modificado e, opcionalmente, um grupo conjugado. Qualquer um ou ambos os compostos oligoméricos de um duplex oligomérico podem compreender um grupo conjugado. Os oligonucleotídeos de cada composto oligomérico de um duplex oligomérico podem incluir nucleosídeos overhanging não complementares.

### **Atividade antisenso**

[000183] Em certas modalidades, os compostos oligoméricos e duplexes oligoméricos são capazes de se hibridizar em um ácido

nucleico alvo, resultante em pelo menos uma atividade antisenso; tais compostos oligoméricos e duplexes oligoméricos são compostos antisenso. Em certas modalidades, os compostos antisenso têm atividade antisenso quando reduzem ou inibem a quantidade ou atividade de um ácido nucleico alvo em 25% ou mais no ensaio de células padrão. Em determinadas modalidades, os compostos antisenso afetam seletivamente um ou mais ácidos nucleicos alvo. Tais compostos antisenso compreendem uma sequência de nucleobases que se hibridiza com um ou mais ácidos nucleicos alvo, resultando em uma ou mais atividades antisenso desejadas e não se hibridiza com um ou mais ácidos nucleicos não alvo ou não se hibridiza com um ou mais ácidos nucleicos não alvo, de tal maneira que resulte em uma atividade antisenso significativa não desejada.

[000184] Em certas atividades antisenso, a hibridação de um composto antisenso com um ácido nucleico alvo resulta no recrutamento de uma proteína que cliva o ácido nucleico alvo. Por exemplo, certos compostos antisenso resultam em clivagem mediada por RNase H do ácido nucleico alvo. RNase H é uma endonuclease celular que cliva a fita de RNA de um duplex de DNA. O DNA em um duplex RNA: DNA não precisa ser DNA não modificado. Em certas modalidades, são descritos neste documento compostos antisenso que são suficientemente "similares ao DNA" para induzir atividade da RNase H. Além disso, em certas modalidades, é tolerado um ou mais nucleosídeos tipo não DNA no gap de um gapmer.

[000185] Em certas atividades antisenso, um composto antisenso ou uma porção de um composto antisenso é carregado em um complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), resultando, finalmente, em uma clivagem do ácido nucleico alvo. Por exemplo, certos compostos antisenso resultam na clivagem do ácido nucleico alvo por Argonaute. Os compostos antisenso que são carregados em RISC são compostos

de RNAi. Os compostos de RNAi podem ter fita dupla (siRNA) ou fita simples (ssRNA).

[000186] Em certas modalidades, a hibridização de um composto antisenso para uma dose de ácido nucleico alvo não resulta no recrutamento de uma proteína que cliva o ácido nucleico alvo. Em certas modalidades, a hibridização do composto antisenso para o ácido nucleico alvo resulta na alteração do splicing do ácido nucleico alvo. Em certas modalidades, a hibridização de um composto antisenso para um ácido nucleico alvo resulta na inibição de uma interação de ligação entre o ácido nucleico alvo e uma proteína ou outro ácido nucleico. Em certas modalidades, a hibridização de um composto antisenso para um ácido nucleico alvo resulta na alteração da tradução do ácido nucleico alvo.

[000187] As atividades antisenso podem ser observadas direta ou indiretamente. Em certas modalidades, a observação ou detecção de uma atividade antisenso envolve a observação ou detecção de uma alteração em uma quantidade de um ácido nucleico alvo ou proteína codificada por esse ácido nucleico alvo, uma mudança na proporção de variantes de splicing de um ácido nucleico ou proteína e/ou uma mudança fenotípica em uma célula ou animal.

### **Certos Ácidos Nucleicos Alvo**

[000188] Em determinadas modalidades, os compostos oligoméricos compreendem ou consistem em um oligonucleotídeo que compreende uma região que é complementar a um ácido nucleico alvo. Em determinadas modalidades, o ácido nucleico alvo é uma molécula de RNA endógena. Em determinadas modalidades, o ácido nucleico alvo codifica uma proteína. Em certas modalidades, o ácido nucleico alvo é selecionado a partir de: um mRNA maduro e um pré-mRNA, incluindo regiões intrônicas, exônicas e não traduzidas. Em certas modalidades, o RNA alvo é um mRNA maduro. Em determinadas modalidades, o ácido nucleico alvo é um pré-mRNA. Em certas modalidades, a região

alvo está inteiramente dentro de um íntron. Em certas modalidades, a região alvo abrange uma junção íntron/éxon. Em certas modalidades, a região alvo está pelo menos 50% dentro de um íntron.

### **Complementaridade/Incompatibilidades com o Ácido Nucleico Alvo**

[000189] É possível introduzir bases incompatíveis sem eliminar a atividade. Por exemplo, Gautschi et al. (J. Natl. Cancer Inst.93:463-471, March 2001) demonstrou a capacidade do oligonucleotídeo ter 100% de complementaridade com o mRNA de bcl-2 e ter 3 incompatibilidades com o mRNA de bcl-xL para reduzir a expressão de ambos bcl-2 e bcl-xL in vitro e in vivo. Além disso, este oligonucleotídeo demonstrou atividade antitumoral potente in vivo. Maher and Dolnick (Nuc. Acid. Res.16:3341-3358.1988) testou uma série de oligonucleotídeos de 14 nucleobases em tandem e oligonucleotídeos de 28 e 42 nucleobases compostos da sequência de dois ou três dos oligonucleotídeos em tandem, respectivamente, quanto à sua capacidade de suspender a tradução de DHFR humana em um ensaio com reticulócitos de coelho. Cada um dos três oligonucleotídeos de 14 nucleobases sozinho foi capaz de inibir a tradução, embora a um nível mais baixo do que os oligonucleotídeos de 28 ou 42 nucleobases.

[000190] Em certas modalidades, os compostos oligoméricos compreendem oligonucleotídeos que são complementares ao ácido nucleico alvo ao longo de todo o comprimento do oligonucleotídeo. Em determinadas modalidades, os oligonucleotídeos são 99%, 95%, 90%, 85% ou 80% complementares ao ácido nucleico alvo. Em certas modalidades, os oligonucleotídeos são pelo menos 80% complementares ao ácido nucleico alvo em todo o comprimento do oligonucleotídeo e compreendem uma região que é 100% ou totalmente complementar a um ácido nucleico alvo. Em certas modalidades, a região de complementaridade total tem de 6 a 20, 10 a 18 ou 18 a 20

nucleobases de comprimento.

[000191] Em certas modalidades, os oligonucleotídeos compreendem uma ou mais nucleobases incompatíveis em relação ao ácido nucleico alvo. Em certas modalidades, a atividade antisense em relação ao alvo é reduzida por falta de compatibilidade, mas a atividade em relação a um não alvo é reduzida em uma quantidade maior. Assim, em certas modalidades, a seletividade do composto oligomérico compreendendo um oligonucleotídeo é aprimorada. Em certas modalidades, a incompatibilidade está especificamente posicionada dentro de um oligonucleotídeo com um motivo gapmer. Em certas modalidades, a incompatibilidade está na posição 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8 a partir da extremidade 5' da região de gap. Em certas modalidades, a incompatibilidade está na posição 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 a partir da extremidade 3' da região de gap. Em certas modalidades, a incompatibilidade está na posição 1, 2, 3 ou 4 a partir da extremidade 5' da região de asa. Em certas modalidades, a incompatibilidade está na posição 4, 3, 2 ou 1 a partir da extremidade 3' da região de asa.

### **Tau**

[000192] Em determinadas modalidades, os compostos oligoméricos compreendem ou consistem em um oligonucleotídeo que compreende uma região que é complementar a um ácido nucleico alvo, em que o ácido nucleico alvo é Tau. Em certas modalidades, o ácido nucleico de Tau tem a sequência apresentada na SEQ ID NO:1 (Acesso GENBANK NT\_010783.14 truncado a partir dos nucleotídeos 2624000 a 2761000).

[000193] Em certas modalidades, o contato de uma célula com um composto oligomérico complementar à SEQ ID NO:1 reduz a quantidade de mRNA de Tau e, em certas modalidades, reduz a quantidade de proteína Tau. Em certas modalidades, o contato de uma célula em um animal com um composto oligomérico complementar à SEQ ID NO:1 melhora um ou mais sintomas de uma doença

neurodegenerativa. Em certas modalidades, o sintoma é perda de memória, perda da função motora e aumento do número e/ou volume de inclusões neurofibrilares. Em certas modalidades, o contato de uma célula em um animal com um oligonucleotídeo complementar à SEQ ID NO:1 resulta na manutenção ou melhoria da memória, manutenção ou melhoria da função motora e/ou manutenção ou redução do número e/ou volume de inclusões neurofibrilares.

### **Certos Ácidos Nucleicos Alvo em Certos Tecidos**

[000194] Em determinadas modalidades, os compostos oligoméricos compreendem ou consistem em um oligonucleotídeo que compreende uma região que é complementar a um ácido nucleico alvo, em que o ácido nucleico alvo é expresso no sistema nervoso central (SNC).

### **Certas Composições Farmacêuticas**

[000195] Em certas modalidades, são descritas, neste documento, composições farmacêuticas que compreendem um ou mais compostos oligoméricos ou seu sal. Em determinadas modalidades, a composição farmacêutica compreende um diluente ou carreador farmacêuticamente aceitável. Em determinadas modalidades, uma composição farmacêutica compreende uma solução salina estéril e um ou mais compostos oligoméricos. Em certas modalidades, uma composição farmacêutica consiste em uma solução salina estéril e em um ou mais compostos oligoméricos. Em determinadas modalidades, a solução salina é uma solução salina de qualidade farmacêutica. Em determinadas modalidades, uma composição farmacêutica compreende um ou mais compostos oligoméricos e água estéril. Em determinadas modalidades, uma composição farmacêutica consiste em um composto oligomérico e água estéril. Em determinadas modalidades, a água estéril é uma água de qualidade farmacêutica. Em determinadas modalidades, uma composição farmacêutica compreende um ou mais compostos oligoméricos e um tampão fosfato-salino (PBS). Em

determinadas modalidades, uma composição farmacêutica consiste em um ou mais compostos oligoméricos e PBS estéril. Em determinadas modalidades, o PBS estéril é um PBS de qualidade farmacêutica.

[000196] Em certas modalidades, as composições farmacêuticas compreendem um ou mais compostos oligoméricos e um ou mais excipientes. Em determinadas modalidades, os excipientes são selecionados entre água, soluções salinas, álcool, polietilenoglicóis, gelatina, lactose, amilase, estearato de magnésio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, hidroximetilcelulose e polivinilpirrolidona.

[000197] Em determinadas modalidades, os compostos oligoméricos podem ser misturados com substâncias ativas e/ou inertes farmaceuticamente aceitáveis para a preparação de composições e formulações farmacêuticas. As composições e métodos para a formulação de composições farmacêuticas irão depender de vários critérios, incluindo, entre outros, via de administração, extensão da doença, ou dose a ser administrada.

[000198] Em certas modalidades, as composições farmacêuticas compreendendo um composto oligomérico abrangem quaisquer sais farmaceuticamente aceitáveis do composto oligomérico, ésteres do composto oligomérico, ou sais desses ésteres. Em certas modalidades, as composições farmacêuticas compreendendo compostos oligoméricos que compreendem um ou mais oligonucleotídeos, após administração a um animal, incluindo um humano, são capazes de fornecer (direta ou indiretamente) o metabólito biologicamente ativo ou seu resíduo. Assim, por exemplo, a descrição é concebida também para sais farmaceuticamente aceitáveis dos compostos oligoméricos, pró-drogas, sais farmaceuticamente aceitáveis dessas pró-drogas e outros bioequivalentes. Os sais farmaceuticamente aceitáveis adequados incluem, sem limitação, sais de sódio e de potássio. Em certas modalidades, as pró-drogas compreendem um ou mais grupos

conjugados ligados a um oligonucleotídeo, em que o grupo conjugado é clivado por nucleases endógenas dentro do corpo.

[000199] As frações lipídicas foram usadas em terapias de ácido nucleico em vários métodos. Em alguns desses métodos, o ácido nucleico, tal como um composto oligomérico, é introduzido em lipossomas pré-formados ou lipoplexos feitos de misturas de lipídios catiônicos e lípidos neutros. Em determinados métodos, os complexos de DNA com lipídios mono ou policatiônicos são formados sem a presença de um lipídio neutro. Em determinadas modalidades, uma fração lipídica é selecionada para aumentar a distribuição de um agente farmacêutico para uma célula ou tecido específico. Em determinadas modalidades, uma fração lipídica é selecionada para aumentar a distribuição de um agente farmacêutico para um tecido adiposo. Em determinadas modalidades, uma fração lipídica é selecionada para aumentar a distribuição de um agente farmacêutico para um tecido muscular.

[000200] Em certas modalidades, as composições farmacêuticas compreendem um sistema de distribuição. Exemplos de sistemas de entrega incluem, entre outros, lipossomas e emulsões. Certos sistemas de administração são úteis para preparar certas composições farmacêuticas, incluindo aquelas que compreendem compostos hidrofóbicos. Em determinadas modalidades, determinados solventes orgânicos, como dimetilsulfóxido são usados.

[000201] Em determinadas modalidades, composições farmacêuticas compreendem uma ou mais moléculas de entrega específicas de tecido destinadas a entregar um ou mais agentes farmacêuticos da presente invenção aos tecidos ou aos tipos de células específicas. Por exemplo, em determinadas modalidades, as composições farmacêuticas incluem lipossomas revestidos com um anticorpo específico para o tecido.

[000202] Em certas modalidades, as composições farmacêuticas



compreendem um sistema de cossolvente. Alguns desses sistemas de cossolvente compreendem, por exemplo, álcool benzílico, um surfactante não polar, um polímero orgânico miscível em água e uma fase aquosa. Em certas modalidades, os referidos sistemas de cossolventes são utilizados para compostos hidrofóbicos. Um exemplo não limitante desse sistema cossolvente é o sistema cossolvente VPD, o qual é uma solução absoluta de etanol compreendendo 3% p/v de álcool benzílico, 8% p/v de surfactante não polar Polissorbato 80™ e 65 % p/v de polietilenoglicol 300. As proporções desses sistemas de cossolventes podem variar consideravelmente sem alterar significativamente as suas características de solubilidade e toxicidade. Além disso, a identidade dos componentes cossolventes pode variar: por exemplo, outros surfactantes podem ser utilizados ao invés do Polissorbato 80™; o tamanho da fração de polietilenoglicol pode variar; outros polímeros biocompatíveis podem substituir o polietilenoglicol, por exemplo, polivinil pirrolidona; e outros açúcares ou polissacáridos podem substituir a dextrose.

[000203] Em certas modalidades, composições farmacêuticas são preparadas para administração oral. Em certas modalidades, as composições farmacêuticas são preparadas para administração bucal. Em determinadas modalidades, uma composição farmacêutica é preparada para administração por injeção (por exemplo, intravenosa, subcutânea, intramuscular, intratecal, intracerebroventrilar, etc.). Em certas modalidades, uma composição farmacêutica compreende um carreador e é formulada em solução aquosa, tal como água ou tampões fisiologicamente compatíveis, tais como solução de Hanks, solução de Ringer ou tampão salino fisiológico. Em certas modalidades, outros ingredientes estão incluídos (por exemplo, ingredientes que ajudam na solubilidade ou servem como conservantes). Em certas modalidades, as suspensões injetáveis são preparadas utilizando veículos líquidos

apropriados, agentes de suspensão e semelhantes. Certas composições farmacêuticas para injeção são apresentadas na forma de dosagem unitária, por exemplo, em ampolas ou em recipientes de multidosagem. Determinadas composições farmacêuticas para injeção podem estar na forma de suspensões, soluções ou emulsões, em veículos oleosos ou aquosos, e podem conter agentes de formulação tais como agentes de suspensão, estabilização e/ou agentes dispersantes. Determinados solventes adequados para utilização em composições farmacêuticas para injeção incluem, mas não estão limitados a, solventes lipofílicos e óleos gordurosos, tais como óleo de sésamo, ésteres de ácidos graxos sintéticos, tais como oleato de etila ou triglicerídeos e lipossomas. As suspensões de injeção aquosas podem conter.

### **Certos Compostos**

[000204] Em certas modalidades, o Composto nº 814907 é caracterizado como um gapmer de MOE 5-8-5, com uma sequência de (de 5' para 3') CCGTTTTCTTACCACCCT (incorporado a este documento como SEQ ID NO:8), em que cada um dos nucleosídeos 1-5 e 14-18 são nucleosídeos 2'-MOE e cada um dos nucleosídeos 6-13 são 2'-desoxinucleosídeos, em que as ligações internucleosídicas entre o nucleosídeo 2 e o nucleosídeo 3 e do nucleosídeo 15 ao nucleosídeo 16 são ligações internucleosídicas fosfodiéster e as ligações internucleosídicas remanescentes são ligações internucleosídicas fosforotioato e em que cada citosina é uma 5-metilcitosina.

[000205] Em certas modalidades, o Composto nº 814907 é caracterizado pela seguinte notação química: mCes mCeo Ges Tes Tes Tds Tds mCds Tds Tds Ads mCds mCds Aes mCeo mCes mCes Te; em que,

[000206] A = adenina,

[000207] mC = 5'-metilcitosina,

[000208] G = guanina,

[000209] T = timina,

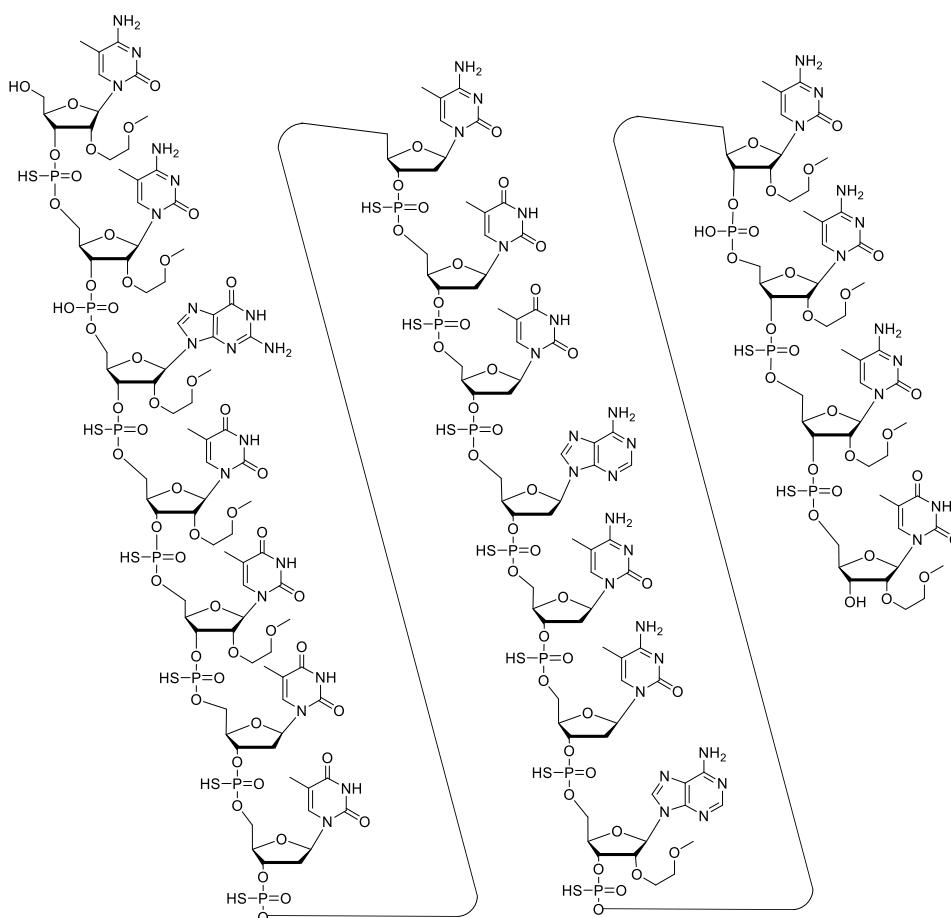
[000210] e = nucleosídeo 2'-MOE,

[000211] d = 2'-desoxinucleosídeo,

[000212] s = ligação internucleosídica fosforotioato, e

[000213] o = ligação internucleosídica fosfodiéster.

[000214] Em certas modalidades, o Composto nº 814907 é caracterizado pela seguinte estrutura química:



[000215] (SEQ ID NO:8).

### **Estrutura 1. Composto nº 814907**

#### **Certas Referências**

[000216] Em certas modalidades, o Composto nº 623782 (caracterizado abaixo no Exemplo 1), descrito pela primeira vez em WO 2015/010135, é uma referência. O Composto nº 623782 teve um dos melhores desempenhos dentre os compostos descritos em WO

2015/010135 em termos de potência, eficácia e tolerabilidade. O Composto nº 623782 é fornecido como uma referência para demonstrar a eficácia e tolerabilidade superiores do Composto nº 814907 (caracterizado abaixo no Exemplo 1) em comparação com o Composto nº 623782 em estudos comparativos descritos abaixo no Exemplo 1 e no Exemplo 2.

[000217] Como demonstrado no Exemplo 1, o Composto nº 814907 obteve um ED<sub>50</sub> de 25 µg em camundongos transgênicos em Tau tratados com 30 µg, 100 µg, 500 µg, enquanto que o Composto nº 623782 obteve um ED<sub>50</sub> de 94 µg em camundongos transgênicos em Tau tratados com 10 µg, 30 µg, 100 µg, 300 µg, 700 µg. Logo, o Composto nº 814907 é mais eficaz do que o Composto nº 623782.

[000218] Como demonstrado no Exemplo 2, a administração do Composto nº 814907 a camundongos de tipo selvagem resultou em perda de células de Purkinje, enquanto que a administração do Composto nº 623782 resultou na perda de células de Purkinje em seções de cerebelo coradas com calbindina em 3 de 11 animais. Portanto, o Composto nº 814907 é mais tolerável do que o Composto nº 623782.

#### Descrição não limitante e incorporação por referência

[000219] A literatura e as publicações de patentes listadas neste documento são incorporadas por referência em sua totalidade.

[000220] Embora certos compostos, composições e métodos descritos neste documento tenham sido descritos com especificidade, de acordo com certas modalidades, os exemplos a seguir servem apenas para ilustrar os compostos descritos e não se destinam a limitá-los. Cada uma das referências, números de acesso e similares relatados no presente pedido estão incorporados neste documento por referência em sua totalidade.

[000221] Embora a listagem de sequências que acompanha este

depósito identifique cada sequência como "RNA" ou "DNA", conforme necessário, na realidade, essas sequências podem ser modificadas com qualquer combinação de modificações químicas. Os versados na técnica apreciarão prontamente que tal designação como "RNA" ou "DNA" para descrever oligonucleotídeos modificados é, em certos casos, arbitrária. Por exemplo, um oligonucleotídeo que compreende um nucleosídeo compreendendo uma fração de açúcar 2'-OH e uma base timina poderia ser descrito como um DNA que possui um açúcar modificado (2'-OH em lugar de um 2'-H do DNA) ou como um RNA que possui uma base modificada (timina (uracil metilado) em lugar de um uracil do RNA). Por conseguinte, as sequências de ácido nucleico fornecidas neste documento, incluindo, entre outras, aquelas na listagem de sequência, se destinam a englobar ácidos nucleicos com qualquer combinação de RNA e/ou DNA natural ou modificado, incluindo, mas não limitados a, esses ácidos nucleicos modificados com nucleobases modificadas. A título de exemplo e sem limitação, um composto oligomérico com uma sequência de nucleobases "ATCGATCG" engloba quaisquer compostos oligoméricos com essa sequência de nucleobases, modificada ou não modificada, incluindo, entre outros, esses compostos que compreendem bases do RNA, como aquelas com uma sequência "AUCGAUCG" e aquelas que possuem algumas bases de DNA e algumas bases de RNA, como "AUCGATCG" e compostos oligoméricos com outras nucleobases modificadas, como "AT<sup>me</sup>CGAUCG", em que <sup>me</sup>C indica uma base de citosina que compreende um grupo metil na posição 5.

[000222] Certos compostos descritos neste documento (por exemplo, oligonucleotídeos modificados) têm um ou mais centros assimétricos e dão origem, assim, a enantiômeros, diastereômeros e outras configurações estereoisoméricas que podem ser definidas, em termos de estereoquímica absoluta, como (*R*) ou (*S*), como  $\alpha$  ou  $\beta$  tal como para

anômeros de açúcar, ou como (D) ou (L), tal como para aminoácidos, etc. Os compostos fornecidos neste documento que foram mencionados ou descritos como tendo certas configurações estereoisoméricas incluem apenas os compostos indicados. Os compostos fornecidos neste documento que são mencionados ou descritos com estereoquímica indefinida incluem todos esses isômeros possíveis, inclusive suas formas estereorrandômicas e opticamente puras, salvo se especificado em contrário. Do mesmo modo, as formas tautoméricas dos compostos deste documento também estão incluídas, salvo indicação em contrário. Salvo indicação em contrário, os compostos oligoméricos e os oligonucleotídeos modificados descritos neste documento destinam-se a incluir as formas salinas correspondentes.

[000223] Os compostos descritos neste documento incluem variações nas quais um ou mais átomos são substituídos por um isótopo não radioativo ou isótopo radioativo do elemento indicado. Por exemplo, os compostos deste documento que compreendem átomos de hidrogênio abrangem todas as possíveis substituições de deutério para cada um dos átomos de hidrogênio  $^1\text{H}$ . As substituições isotópicas englobadas pelos compostos deste documento incluem, sem limitação:  $^2\text{H}$  ou  $^3\text{H}$  no lugar de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  ou  $^{14}\text{C}$  no lugar de  $^{12}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  no lugar de  $^{14}\text{N}$ ,  $^{17}\text{O}$  ou  $^{18}\text{O}$  no lugar de  $^{16}\text{O}$ , e  $^{33}\text{S}$ ,  $^{34}\text{S}$ ,  $^{35}\text{S}$ , ou  $^{36}\text{S}$  no lugar de  $^{32}\text{S}$ . Em certas modalidades, as substituições isotópicas não radioativas podem conferir novas propriedades no composto oligomérico que são benéficas para utilização como uma ferramenta terapêutica ou de investigação. Em certas modalidades, as substituições isotópicas radioativas podem tornar o composto adequado para fins de pesquisa ou diagnóstico, tais como imagiologia.

## **EXEMPLOS**

[000224] Os exemplos a seguir ilustram determinadas modalidades da presente descrição e não são limitantes. Além disso, se modalidades

específicas forem providas, os inventores contemplaram um pedido genérico dessas modalidades específicas. Por exemplo, a descrição de um oligonucleotídeo que tem um motivo específico fornece suporte razoável para oligonucleotídeos adicionais que têm o mesmo motivo ou motivo semelhante. E, por exemplo, se uma modificação específica de alta afinidade surgir em uma posição específica, outras modificações de alta afinidade na mesma posição são consideradas adequadas, a não ser que indicado o contrário.

### **Exemplo 1: Efeitos dos oligonucleotídeos modificados no mRNA de Tau humana em camundongos transgênicos**

[000225] Os oligonucleotídeos modificados mostrados na tabela abaixo são 100% complementares ao pré-mRNA da Tau humano (nº de acesso GENBANK NT\_010783.14, truncado a partir dos nucleotídeos 2624000 a 2761000, designados neste documento por SEQ ID NO:1). As eficácias dos oligonucleotídeos modificados foram testadas em camundongos transgênicos da Tau humana (Duff et al., *Neurobiology of Disease* 7: 87-98, 2000). Cada camundongo recebeu uma dose de um oligonucleotídeo modificado listado na tabela abaixo, ou apenas veículo de PBS, por injeção em bólus ICV. Cada grupo de tratamento consistiu em 2-4 camundongos. Vários dias após a administração do oligonucleotídeo, camundongos foram sacrificados e os tecidos foram coletados. O RNA foi extraído do córtex e analisado por RT-qPCR para determinar os níveis de mRNA da Tau humana. Utilizou-se o conjunto de sonda do primer RTS3104, com as seguintes sequências: primer forward 5'-AAGATTGGGTCCCTGGACAAT-3', designada neste documento como SEQ ID NO:5; primer reverse 5'-AGCTTGTGGGTTTCAATCTTTTATT-3', designada neste documento como SEQ ID NO:6; sonda 5'-CACCCACGTCCCTGGCGGA-3', designada neste documento como SEQ ID NO:7. Os resultados são apresentados na tabela abaixo como a inibição percentual média da

expressão de mRNA da Tau humana para cada grupo de tratamento em comparação com o grupo tratado com veículo. A metade da dose eficaz máxima (ED<sub>50</sub>) para cada oligonucleotídeo modificado foi calculada usando análise de regressão não linear.

**Tabela 1**

**Inibição percentual dos níveis de mRNA da Tau humana em camundongos hTau**

Composto N°	Sequência	Dose (µg)	mRNA da Tau Humana (% de inibição)	ED <sub>50</sub> (µg)	SEQ ID NO.
623782	$mC_{es}mC_{eo}G_{es}T_{es}T_{ds}T_{ds}mC_d$ $sT_{ds}T_{ds}A_{ds}mC_{ds}mC_{ds}A_{eo}mC_{eo}m$ $C_{es}mC_{es}T_e$	10	10	94	8
		30	17		
		100	54		
		300	79		
		700	90		
814907	$mC_{es}mC_{eo}G_{es}T_{es}T_{es}T_{ds}T_{ds}mC_d$ $sT_{ds}T_{ds}A_{ds}$ $mC_{ds}mC_{ds}A_{es}mC_{eo}mC_{es}mC_{es}T_e$	30	48	25	8
		100	79		
		500	88		

[000226] Subscritos: "e" representa um nucleosídeo 2'-MOE; "d" representa um 2'-desoxinucleosídeo; "o" representa uma ligação internucleosídica fosfodiéster; e "s" representa uma ligação internucleosídica fosforotioato. "m" sobrescrito precedendo um "C" indica que a citosina é uma 5-metilcitosina.

**Exemplo 2: Tolerabilidade de oligonucleotídeos modificados que direcionam à Tau humana**

[000227] A tolerabilidade dos oligonucleotídeos modificados descritos no Exemplo 1 foi testada em camundongos do tipo selvagem. Cada camundongo recebeu uma injeção de 700 µg do Composto n° 623782 ou Composto n° 814907 em uma dose de 700 µg, ou apenas veículo de PBS. Oito semanas após a administração do oligonucleotídeo modificado, os camundongos foram sacrificados e os tecidos foram coletados. A histopatologia foi realizada em seções de cerebelo usando



H&E, IBA1, GFAP e colorações de calbindina, e não foi observada nenhuma anormalidade em relação aos camundongos tratados com veículo para os camundongos tratados com o Composto nº 814907. Em um experimento comparável, a perda de células Purkinje foi observada em seções de cerebelo coradas com calbidina em 3 de 11 animais tratados com Composto nº 623782.

**Exemplo 3: Efeito do Composto nº 814907 em macacos cynomolgus após injeção intratecal de dose repetida por 13 semanas**

[000228] Os Macacos Cynomolgus foram tratados com o Composto nº 814907 para determinar a tolerabilidade local e sistêmica e a farmacocinética em três níveis da dose, após injeções de bólus lombar intratecais repetidas por 13 semanas. O Composto nº 814907 partilha homologia de sequência completa com o mRNA da Tau de macaco e demonstrou atividade farmacológica nesta espécie.

*Tratamento*

[000229] Macacos Cynomolgus com idades entre 2 e 4 anos foram tratados com controle de veículo (n=12) ou com Composto nº 814907 intratecalmente (entre L3-L4). Os animais receberam doses nos Dias 1, 14, 28, 56 e 84. Os grupos de tratamento receberam 4 mg (n=6), 12 mg (n=6) ou 35 mg (n=14) do Composto nº 814907. Os animais foram sacrificados no dia 98 ou 155 (4 animais do grupo de controle de veículo e 4 animais do grupo de tratamento de 35 mg).

*Tolerabilidade*

[000230] A avaliação da tolerabilidade se baseou em observações clínicas, pesos corporais, consumo de alimentos, exames físicos e neurológicos, observações neurocomportamentais (teste de Irwin modificado (Irwin, 1968)), eletrocardiograma (ECG) e avaliação da pressão arterial, oftalmologia, coagulação, hematologia, química clínica (sangue e líquido cefalorraquidiano [CSF]), contagem de células

(apenas CSF), avaliação de gases sanguíneos, análise de urina e avaliações anatomopatológicas. As necropsias completas foram realizadas com um registro de qualquer anormalidade macroscópica. Os órgãos foram pesados e foram realizados exames microscópicos. O sangue foi coletado para análise complementar. Além disso, sangue, CSF e tecidos (na necropsia) foram coletados para avaliações toxicocinéticas.

[000231] A administração intratecal de 4 mg, 12 mg ou 35 mg do Composto nº 814907 por 13 semanas (duas vezes por semana no primeiro mês, depois mensalmente) mostrou boa tolerabilidade local e sistêmica em macacos cynomolgus machos e fêmeas em todos os regimes de dosagem testados.

#### *Atividade*

[000232] O tecido do cérebro e da medula espinhal foi analisado quanto à inibição de mRNA da Tau em macaco cynomolgus. Os cortes do cérebro e as amostras de medula espinhal foram coletados e congelados rapidamente em nitrogênio líquido e armazenados congelados (-60 a -90°C). No momento da amostragem, punções de biópsia de 2 mm foram usadas para coletar amostras para análise de RNA das cortes do cérebro congelados. Foram feitas punções de várias regiões da medula espinhal e do cérebro.

[000233] O RNA total de amostras do cérebro e da medula espinhal de macacos cynomolgus tratados com controle ou Composto nº 814907 foi purificado usando um kit de purificação de mini-RNA da Life Technologies e foi submetido à análise de PCR em tempo real. Conjunto de sondas de primer de macaco rhMATPT LTS01278 (sequência forward AGGACAGAGTGCGAGTCGAAGATC, designada neste documento como SEQ ID NO:9; sequência reverse AGGTCAGCTTGTGGGTTTCAA, designada neste documento como SEQ ID NO:10; sequência de sonda CACCCATGTCCCTGGCGGAGG,

designada neste documento como SEQ ID NO:11) foi usado para medir os níveis de RNA. O RNA da Tau foi então normalizado para Ciclofilina A do gene housekeeping. Todas as reações de qPCR foram realizadas em triplicado. Os dados são relatados em relação aos níveis de mRNA em animais tratados com CSF artificial.

[000234] Como mostrado na Tabela abaixo, houve uma diminuição significativa e sensível à dose nos níveis de RNA da Tau na medula espinal e em múltiplas regiões do SNC após o tratamento com o Composto nº 814907, em comparação com os macacos tratados com controle.

## **Tabela 2**

### **Inibição percentual dos níveis de mRNA da Tau de cynomolgus em macacos cynomolgus**

Tratamento	Regiões do cérebro						
	Medula espinal torácica	Coluna vertebral lombar	Medula espinal cortical	Córtex frontal	Córtex Temporal	Hipo cam po	Ponte
aCSF	0	0	0	0	0	0	0
4 mg 814907	51	63	31	41	29	18	29
12 mg 814907	60	60	47	60	56	52	43
35 mg 814907	58	71	60	77	70	74	66

### **Exemplo 4: Ensaio Clínico de Fase I-IIa Humano com Composto nº 814907**

[000235] Múltiplas doses ascendentes do Composto nº 814907 são avaliadas num estudo randomizado, duplo cego, controlado por placebo, para avaliar a segurança, tolerabilidade, farmacocinética e farmacodinâmica em pacientes com Mal de Alzheimer (MA) leve entre 50 e 74 anos. Os pacientes elegíveis terão evidência de biomarcador do MA do CSF de patologia amiloide e tau, além de atender aos critérios clínicos para MA. Quatro grupos de doses ascendentes de pacientes

com MA leve serão inscritos sequencialmente e randomizados 3:1 para receber o Composto nº 814907 ou placebo. Cada paciente receberá 4 doses do Composto nº 814907 ou placebo com um intervalo de 28 dias entre as doses. Os pacientes receberão 4 doses de bólus intratecais (IT) do Composto nº 814907 em intervalos de 4 semanas durante o período de tratamento de 3 meses (nos Dias 1, 29, 57, 85). Cada dose do Composto nº 814907 ou placebo será administrada como uma injeção única de bólus IT de 20 mL. A administração será feita por meio de punção lombar usando uma agulha de pequeno calibre inserida no espaço L3/L4.

#### *Avaliações de segurança e tolerabilidade*

[000236] A segurança do paciente será monitorada de perto durante o estudo. As avaliações de segurança e tolerabilidade incluem: exame físico e avaliação neurológica padrão (incluindo fundi), sinais vitais (HR, BP, alterações ortostáticas, peso), ECG, EAs e medicações concomitantes, Escala de Avaliação do Risco de Suicídio de Columbia (C-SSRS), laboratórios de segurança do CSF (contagem de células, proteína, glicose), testes de laboratório de plasma (química clínica, hematologia), urinálise e avaliações de neuroimagem serão realizados usando um scanner de ressonância magnética 3T. As medidas clínicas e volumétricas de neuroimagem serão usadas para monitorar a deterioração inesperada.

#### *Avaliações Farmacocinéticas*

[000237] Uma amostra de CSF será coletada antes da dose em cada dia de administração (Dias 1, 29, 57, 85) e durante o período pós-tratamento para análises de PK.

#### *Avaliações exploratórias*

[000238] Bioquímica, neuroimagem, funcionamento/capacidade de realizar atividades diárias, cognitivas e neuropsiquiátricas serão avaliados.

[000239] Parâmetros bioquímicos incluem biomarcadores potenciais de CSF e sangue/plasma, incluindo o envolvimento do alvo, marcadores de lesão neuronal e sináptica, marcadores de ativação imune inata, componentes complementares e biomarcadores relacionados a lipídios.

[000240] Parâmetros de neuroimagem incluem ressonância magnética estrutural (hipocampal, todo o cérebro e volumes ventriculares), Marcação de Spin Arterial (ASL), imagem de tensor de difusão (DTI) e FDG-PET (Coortes C e D apenas).

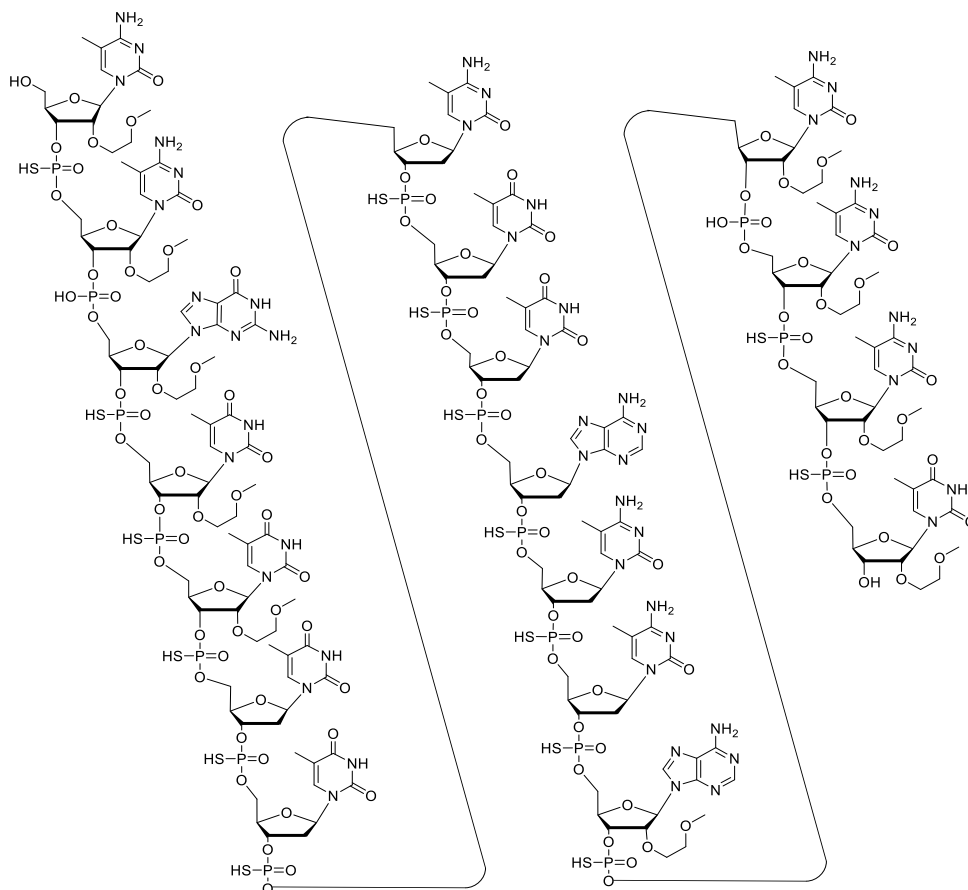
[000241] O funcionamento/capacidade de realizar atividades de parâmetros do dia-a-dia inclui avaliação por Questionário de Atividades Funcionais (FAQ).

[000242] Parâmetros cognitivos incluem avaliação por Bateria Repetível para a Avaliação do Status Neuropsicológico (RBANS) e Mini-exame do estado mental (MMSE)

[000243] Parâmetros neuropsiquiátricos incluem avaliação pelo Inventário de Neuropsiquiatria - Questionário (NPI-Q).

## REIVINDICAÇÕES

1. Oligonucleotídeo modificado, caracterizado pelo fato de que o oligonucleotídeo modificado tem a sequência de nucleobase apresentada na SEQ ID NO: 8 e que o oligonucleotídeo modificado apresenta a seguinte fórmula:



ou um sal do mesmo.

2. Oligonucleotídeo modificado ou um sal do mesmo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o sal é um sal de sódio.

3. Composto compreendendo um oligonucleotídeo modificado, caracterizado pelo fato de que o oligonucleotídeo modificado é um gapmer consistindo em um segmento de asa 5', um segmento de gap central e um segmento de asa 3', em que:

o segmento de asa 5' consiste em cinco nucleosídeos 2'-  
MOE,

o segmento de gap central consiste em oito 2'-desoxinucleosídeos, e

o segmento de asa 3' consiste em cinco nucleosídeos 2'-MOE;

em que o oligonucleotídeo modificado tem a sequência de nucleobases 5'-CCGTTTTCTTACCACCCT-3' (SEQ ID NO:8), em que cada citosina é uma 5-metilcitosina; e em que as ligações internucleosídicas do oligonucleotídeo modificado são, de 5' a 3', sssssssssssssoss, em que cada s é uma ligação fosforotioato e cada o é uma ligação fosfodiéster.

4. Oligonucleotídeo modificado, caracterizado pelo fato de que o oligonucleotídeo modificado é um gapmer consistindo em um segmento de asa 5', um segmento de gap central e um segmento de asa 3', em que:

o segmento de asa 5' consiste em cinco nucleosídeos 2'-MOE,

o segmento de gap central consiste em oito 2'-desoxinucleosídeos, e

o segmento de asa 3' consiste em cinco nucleosídeos 2'-MOE;

em que o oligonucleotídeo modificado tem a sequência de nucleobases 5'-CCGTTTTCTTACCACCCT-3' (SEQ ID NO:8), em que cada citosina é uma 5-metilcitosina; e em que as ligações internucleosídicas do oligonucleotídeo modificado são, de 5' a 3', sssssssssssssoss, em que cada s é uma ligação fosforotioato e cada o é uma ligação fosfodiéster.

5. População de oligonucleotídeos modificados, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que todas as ligações internucleosídicas fosforotioato do oligonucleotídeo modificado são estereorrandômicas.

6. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende o oligonucleotídeo modificado ou seu sal, como definido na reivindicação 1 ou 2 e um diluente ou carreador farmaceuticamente aceitável.

7. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende o composto como definido na reivindicação 3 e um diluente ou carreador farmaceuticamente aceitável.

8. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende o oligonucleotídeo modificado como definido na reivindicação 4 e um diluente ou carreador farmaceuticamente aceitável.

9. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 6 a 8, caracterizada pelo fato de que compreende um diluente farmaceuticamente aceitável e em que o diluente farmaceuticamente aceitável é tampão fosfato-salino (PBS) ou CSF artificial (aCSF).

10. Composto, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o oligonucleotídeo modificado está ligado a um grupo conjugado.

11. Duplex oligomérico, caracterizado pelo fato de que compreende o oligonucleotídeo modificado ou sal do mesmo como definido na reivindicação 1.

12. Duplex oligomérico, caracterizado pelo fato de que compreende o composto como definido na reivindicação 3.

13. Duplex oligomérico, caracterizado pelo fato de que compreende o oligonucleotídeo modificado como definido na reivindicação 4.