



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

(21) BR 112020017949-3 A2



(22) Data do Depósito: 01/03/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 22/12/2020

(54) Título: INIBIÇÃO DE REPLICAÇÃO DE POLIOMAVÍRUS

(51) Int. Cl.: C12N 15/113; A61K 48/00; A61K 31/7088.

(30) Prioridade Unionista: 02/03/2018 EP 18159797.2.

(71) Depositante(es): ACADEMISCH ZIEKENHUIS LEIDEN H.O.D.N. LUMC.

(72) Inventor(es): ERIC PETER VAN DER VEER; ANTON JAN VAN ZONNEVELD; JURRIËN PRINS.

(86) Pedido PCT: PCT NL2019050131 de 01/03/2019

(87) Publicação PCT: WO 2019/168402 de 06/09/2019

(85) Data da Fase Nacional: 02/09/2020

(57) Resumo: A invenção se refere a moléculas antissentido e métodos para modular o splicing do pré-mRNA do antígeno T de poliomavírus. Em um aspecto, a invenção se refere a um oligonucleotídeo antissentido com 12 a 30, de preferência 17, 18, 19 ou 20 a 30 nucleobases de comprimento que compreende uma sequência que é o complemento reverso de um trecho contíguo de pelo menos 12 nucleobases de um pré-mRNA de antígeno T do poliomavírus e cujo oligonucleotídeo antissentido pode modular o splicing do referido pré-mRNA do antígeno T em uma célula.

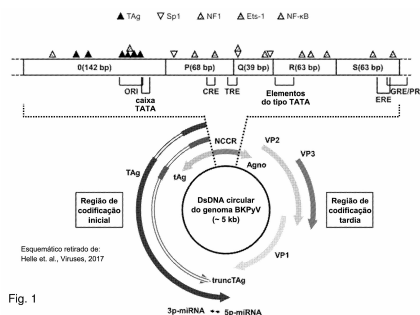


Fig. 1

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para: **"INIBIÇÃO DE REPLICAÇÃO DE POLIOMAVÍRUS"**

[001] A invenção se refere a moléculas que se ligam especificamente a RNA de poliomavírus. Em algumas modalidades, as moléculas compreendem oligonucleotídeos antissentido que reconhecem o pré-mRNA com uma região de codificação de um antígeno T de um poliomavírus. Exemplos de poliomavírus são os poliomavírus humanos, tais como vírus JC (JCV), vírus BK (BKV) ou vírus de células Merkel (MCV).

[002] Poliomavírus são pequenos vírus de DNA de fita dupla sem envelope cujos hospedeiros naturais são normalmente mamíferos e pássaros. As infecções em adultos são geralmente assintomáticas, mas podem se tornar patológicas quando o sistema imunológico está comprometido. Exemplos não limitativos de poliomavírus humanos são vírus BK, vírus JC e vírus de células Merkel.

[003] JCV e BKV são ambos patógenos oportunistas que infectam a população humana durante a primeira infância (Leploeg, M.D. et. al., *Clinical Infectious Diseases*, 2001). A soroprevalência em adultos é alta. Acredita-se que ambos os vírus permaneçam latentes nas células renais do hospedeiro (Wunderink, H.F. et. al., *American Journal of Transplantation*, 2017). A reativação pode ocorrer, por exemplo, em indivíduos imunossuprimidos (Wunderink, HF et.

al., American Journal of Transplantation, 2017; Parajuli, S. et. al., Clinical Transplantation, 2018; Gard, L. et. al., PLoS One, 2017).

[004] Os poliomavírus compartilham uma estrutura genômica comum. Eles têm genes que são expressos no início e no final do ciclo de infecção. Tanto os genes precoces quanto os tardios produzem RNAs a partir dos quais, por meio de splicing diferencial, várias proteínas podem ser traduzidas. Conforme mostrado na Figura 1, os RNAs tardios normalmente codificam as três proteínas do capsídeo, enquanto os genes iniciais codificam os antígenos T pequenos e grandes e, muitas vezes, uma ou mais outras regiões codificadoras com splicing alternativo (Helle, F. *et. al., Viruses, 2017*).

[005] WO2015/042466 descreve uma abordagem baseada em oligonucleotídeo antissentido para inibir a replicação e multiplicação do vírus JC. Os oligonucleotídeos antissentido aqui divulgados podem ser oligodesoxirribonucleotídeos (ODNs) ou oligonucleotídeos quiméricos que têm um interior ODN flanqueado por um ou mais nucleotídeos com uma estrutura resistente à nuclease. O último torna um híbrido RNA: oligonucleotídeo sensível à ação de RNaseH. O interior dos desoxirribonucleotídeos tem pelo menos 4 desoxirribonucleotídeos e é flanqueado por regiões resistentes à nuclease que têm nucleotídeos

modificados com 2'-açúcar. Os oligonucleotídeos antissentido são direcionados para sequências específicas que estão presentes no mRNA do vírus JC.

[006] Em algumas modalidades, a presente invenção fornece oligonucleotídeos antissentido que podem modular o splicing de um pré-mRNA do antígeno T de poliomavírus. Os oligonucleotídeos antissentido podem ter uma sequência que é complementar a um local doador de splice e/ou um local aceitador de splice no referido pré-mRNA. Os oligonucleotídeos antissentido podem ter uma sequência que é complementar a uma ou mais nucleobases de íntron adjacentes ao exon (ver Figura 2). Em algumas modalidades, o oligonucleotídeo antissentido torna um duplex do oligonucleotídeo antissentido com seu alvo pré-mRNA do antígeno T de poliomavírus resistente à ação de RNaseH.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[007] A invenção fornece um oligonucleotídeo antissentido de 12 a 30, de preferência 17, 18, 19 ou 20 a 30 nucleobases de comprimento que compreende uma sequência que é o complemento reverso de um trecho contíguo de pelo menos 12 nucleobases de um pré-mRNA do antígeno T de poliomavírus e cujo oligonucleotídeo antissentido pode modular o splicing do referido pré-mRNA do antígeno T grande em uma célula (ver Figura 1).

[008] Os oligonucleotídeos antissentido moduladores de splice da presente invenção normalmente requerem um trecho contíguo de pelo menos 17, de preferência pelo menos 18, mais preferencialmente pelo menos 19 e mais preferencialmente pelo menos 20 nucleobases complementares ao pré-mRNA do antígeno T grande de poliomavírus.

[009] A invenção também fornece um oligonucleotídeo antissentido de 12 a 30, de preferência 17, 18, 19 ou 20 a 30 nucleobases de comprimento que compreende uma sequência que é o complemento reverso de um trecho contíguo de pelo menos 12 nucleobases de um pré-mRNA de antígeno T grande de poliomavírus, cujo trecho compreende uma sequência doadora de splice, uma sequência aceitadora de splice ou uma combinação das mesmas no referido pré-mRNA. A sequência doadora ou sequência aceitadora de splice é de preferência uma sequência aceitadora de splice de antígeno T grande de poliomavírus ou uma sequência doadora de splice de antígeno T grande de poliomavírus.

[0010] É fornecido ainda um oligonucleotídeo antissentido de 12 a 30, de preferência 17, 18, 19 ou 20 a 30 nucleobases de comprimento, que é pelo menos 80% complementar aos nucleotídeos 4537-4596 ou 4881-4940 retirados de NC_001538 e pelo menos compreendendo

complementaridade com a sequência doadora de splice ou sequência aceitadora de splice nas respectivas regiões.

[0011] Também é fornecido um oligonucleotídeo antissentido de 12 a 30, de preferência 17, 18, 19 ou 20 a 30 nucleobases de comprimento que é de preferência pelo menos 80% complementar aos nucleotídeos na região 4397-4456 ou na região 4741-4800 retirada de NC_001699 e pelo menos compreendendo complementaridade com a sequência doadora de splice ou sequência aceitadora de splice nas respectivas regiões.

[0012] Também é fornecido um oligonucleotídeo antissentido de 12 a 30, de preferência 17, 18, 19 ou 20 a 30 nucleobases de comprimento que é de preferência pelo menos 80% complementar aos nucleotídeos na região 4299-4358 ou na região 4686-4745 retirada de NC_009238 e pelo menos compreendendo complementaridade com a sequência doadora de splice ou sequência aceitadora de splice nas respectivas regiões.

[0013] Também é fornecido um oligonucleotídeo antissentido de 12 a 30, de preferência 17, 18, 19 ou 20 a 30 nucleobases de comprimento que é de preferência pelo menos 80% complementar aos nucleotídeos na região 4477-4536 ou na região 4876-4935 retirada de NC_009539 e pelo menos compreendendo complementaridade com a sequência doadora de

splice ou sequência aceitadora de splice nas respectivas regiões.

[0014] Também é fornecido um oligonucleotídeo antissentido de 12 a 30, de preferência 17, 18, 19 ou 20 a 30 nucleobases de comprimento que é de preferência pelo menos 80% complementar aos nucleotídeos na região 4693-4752 ou na região 5124-5183 retirado de NC_010277 e pelo menos compreendendo complementaridade com a sequência doadora de splice ou sequência aceitadora de splice nas respectivas regiões.

[0015] Também é fornecido um oligonucleotídeo antissentido de 12 a 30, de preferência 17, 18, 19 ou 20 a 30 nucleobases de comprimento que é de preferência pelo menos 80% complementar aos nucleotídeos na região 4264-4323 ou na região 4654-4713 retirada de NC_014406 e pelo menos compreendendo complementaridade com a sequência doadora de splice ou sequência aceitadora de splice nas respectivas regiões.

[0016] Também é fornecido um oligonucleotídeo antissentido de 12 a 30, de preferência 17, 18, 19 ou 20 a 30 nucleobases de comprimento que é de preferência pelo menos 80% complementar aos nucleotídeos na região 4272-4331 ou na região 4677-4736 retirada de NC_014407 e pelo menos compreendendo complementaridade com a sequência doadora de

splice ou sequência aceitadora de splice nas respectivas regiões.

[0017] Também é fornecido um oligonucleotídeo antissentido de 12 a 30, de preferência 17, 18, 19 ou 20 a 30 nucleobases de comprimento que é de preferência pelo menos 80% complementar aos nucleotídeos na região 4352-4411 ou na região 4765-4824 retirada de NC_014361 e pelo menos compreendendo complementaridade com a sequência doadora de splice ou sequência aceitadora de splice nas respectivas regiões.

[0018] Também é fornecido um oligonucleotídeo antissentido de 12 a 30, de preferência 17, 18, 19 ou 20 a 30 nucleobases de comprimento que é de preferência pelo menos 80% complementar aos nucleotídeos na região 4408-4467 ou na região 4760-4819 retirada de NC_015150 e pelo menos compreendendo complementaridade com a sequência doadora de splice ou sequência aceitadora de splice nas respectivas regiões.

[0019] Também é fornecido um oligonucleotídeo antissentido de 12 a 30, de preferência 17, 18, 19 ou 20 a 30 nucleobases de comprimento que é de preferência pelo menos 80% complementar aos nucleotídeos na região 4303-4362 ou na região 4658-4717 retirada de NC_018102 e pelo menos compreendendo complementaridade com a sequência doadora de

splice ou sequência aceitadora de splice nas respectivas regiões.

[0020] Também é fornecido um oligonucleotídeo antissentido de 12 a 30, de preferência 17, 18, 19 ou 20 a 30 nucleobases de comprimento que é de preferência pelo menos 80% complementar aos nucleotídeos na região 4159-4218 ou na região 4504-4563 retirada de NC_020106 e pelo menos compreendendo complementaridade com a sequência doadora de splice ou sequência aceitadora de splice nas respectivas regiões.

[0021] Também é fornecido um oligonucleotídeo antissentido de 12 a 30, de preferência 17, 18, 19 ou 20 a 30 nucleobases de comprimento que é de preferência pelo menos 80% complementar aos nucleotídeos na região 4392-4451 ou na região 4791-4850 retirada de NC_020890 e pelo menos compreendendo complementaridade com a sequência doadora de splice ou sequência aceitadora de splice nas respectivas regiões.

[0022] Também é fornecido um oligonucleotídeo antissentido de 12 a 30, de preferência 17, 18, 19 ou 20 a 30 nucleobases de comprimento que é de preferência pelo menos 80% complementar aos nucleotídeos na região 4471-4530 ou na região 4859-4918 retirada de NC_024118 e pelo menos compreendendo complementaridade com a sequência doadora de

splice ou sequência aceitadora de splice nas respectivas regiões.

[0023] Um oligonucleotídeo antissentido como aqui descrito compreende de preferência pelo menos 12 nucleobases contíguas de SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 7; SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 16; SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 18; SEQ ID NO: 20; SEQ ID NO: 21; SEQ ID NO: 22; SEQ ID NO: 23; SEQ ID NO: 24; SEQ ID NO: 25; SEQ ID NO: 26 ou SEQ ID NO: 27, em que os pelo menos doze nucleotídeos compreendem de preferência o complemento reverso do sítio doador de splice, sítio aceitador de splice ou combinação dos mesmos do pré-mRNA alvo, ou seja, o doador/aceitador de splice do pré-mRNA do antígeno T grande do respectivo poliomavírus. Em uma modalidade preferida, o oligonucleotídeo antissentido como aqui descrito compreende pelo menos 17, de preferência pelo menos 18, de preferência pelo menos 19 e mais preferencialmente pelo menos 20 nucleobases contíguas de SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 7; SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 16; SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 18; SEQ ID NO: 20; SEQ ID NO: 21; SEQ ID

NO: 22; SEQ ID NO: 23; SEQ ID NO: 24; SEQ ID NO: 25; SEQ ID NO: 26 ou SEQ ID NO: 27; de preferência SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 7; SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 20; SEQ ID NO: 21; SEQ ID NO: 22; SEQ ID NO: 23; SEQ ID NO: 24 ou SEQ ID NO: 25; de preferência SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 20; SEQ ID NO: 21; SEQ ID NO: 22; SEQ ID NO: 23; SEQ ID NO: 24 ou SEQ ID NO: 25, em que os nucleotídeos de preferência compreendem o complemento reverso do sítio doador de splice, sítio aceitador de splice ou combinação dos mesmos do pré-mRNA alvo, isto é, o doador/aceitador de splice do pré-mRNA do antígeno T grande do respectivo poliomavírus. Um oligonucleotídeo antissentido pode ter uma incompatibilidade com a sequência indicada, a incompatibilidade não está no início ou no final do trecho contíguo como um AON com um trecho contíguo de 17 nucleotídeos, por exemplo, com uma incompatibilidade na posição um ou 17 realmente têm uma extensão contígua de 16 nucleotídeos.

[0024] Também é fornecido um método para inibir a replicação de poliomavírus em uma célula, o método compreendendo fornecer uma célula que está infectada com o referido poliomavírus com um oligonucleotídeo antissentido da invenção que é específico para o poliomavírus.

[0025] A invenção fornece ainda um método de preparo de um enxerto para transplante, o método caracterizado pelo fato de que células doadoras, de preferência células renais doadoras, são fornecidas com um oligonucleotídeo antissentido da invenção que é específico para o poliomavírus.

[0026] Também é fornecido um método de tratamento de uma infecção por poliomavírus em um indivíduo, o método compreendendo a administração de um oligonucleotídeo antissentido da invenção que é específico para o poliomavírus, ao indivíduo em necessidade do mesmo.

[0027] É fornecido ainda um método de administração de um oligonucleotídeo antissentido a um indivíduo, para hibridização com uma sequência de RNA complementar em uma célula do referido indivíduo, o método caracterizado pelo fato de que o oligonucleotídeo antissentido é um oligonucleotídeo antissentido quimérico que compreende uma primeira e uma segunda região, e em que a referida primeira região compreende um ou mais desoxirribonucleotídeos e a referida segunda região compreende pelo menos um nucleotídeo 2'-O-(2-metoxi-etil) (ver Figura 7).

[0028] É fornecido ainda um método para inibir a replicação de um poliomavírus em uma célula, o método compreendendo fornecer à referida célula um oligonucleotídeo antissentido de 12 a 30 nucleotídeos de

comprimento que compreende uma sequência que é o complemento reverso de um trecho contíguo de pelo menos 12 nucleobases de um pré-mRNA do antígeno T grande de poliomavírus e cujo oligonucleotídeo antissentido pode modular o splicing do referido pré-mRNA do antígeno T grande. O referido oligonucleotídeo antissentido é de preferência um oligonucleotídeo antissentido como aqui descrito, de preferência um oligonucleotídeo antissentido de SEQ ID NO: 1-25 como descrito ou modificado aqui.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0029] O termo "oligonucleotídeo antissentido" refere-se a um oligômero ou polímero de ácido ribonucleico (RNA) ou ácido desoxirribonucleico (DNA), ou miméticos, quimeras, análogos e homólogos dos mesmos. Este termo inclui oligonucleotídeos antissentido compostos de nucleobases naturais, açúcares, e ligações internucleosídeo (estrutura) covalentes, bem como oligonucleotídeos antissentido com porções de ocorrência não natural que funcionam de forma semelhante. Tais oligonucleotídeos antissentido modificados ou substituídos são frequentemente preferidos em relação às formas nativas por causa de propriedades desejáveis, como, por exemplo, absorção celular aumentada, afinidade aumentada para um ácido nucleico alvo e estabilidade aumentada na presença de nucleases (ver Figura 7).

[0030] Um oligonucleotídeo antissentido como aqui descrito é de preferência um oligonucleotídeo antissentido de fita simples.

[0031] Os oligonucleotídeos antissentido da presente invenção também incluem oligonucleotídeos antissentido modificados nos quais uma base diferente está presente em uma ou mais das posições de nucleotídeo no oligonucleotídeo antissentido. Por exemplo, se o primeiro nucleotídeo for uma adenosina, podem ser produzidos oligonucleotídeos antissentido modificados que contêm timidina, guanosina ou citidina nesta posição. Isso pode ser feito em qualquer uma das posições do oligonucleotídeo antissentido. Esses oligonucleotídeos antissentido são então testados usando os métodos aqui descritos para determinar sua capacidade de inibir o RNA do antígeno T.

[0032] Um oligonucleotídeo antissentido da presente invenção pode hibridizar com RNA de poliomavírus produzido após infecção de uma célula suscetível. Como tal, o oligonucleotídeo antissentido compreende uma sequência que é o complemento reverso da sequência do (a parte do) RNA alvo. O oligonucleotídeo antissentido pode ser introduzido na forma de composto oligomérico circular de fita simples, fita dupla, parcialmente de fita simples ou circular. Em uma modalidade preferida, o oligonucleotídeo antissentido é um oligonucleotídeo antissentido de cadeia simples.

[0033] O oligonucleotídeo antissentido pode ser ligado a uma ou mais outras estruturas químicas. A outra estrutura pode ser um peptídeo ou proteína, um açúcar, um lipídeo ou outra estrutura química. A outra estrutura também pode ser um ou mais outros nucleotídeos. O um ou mais outros nucleotídeos podem desempenhar uma função diferente da parte antissentido. Por exemplo, hibridização com outra sequência alvo nucleica. A outra estrutura pode executar qualquer uma de uma série de uma ou mais funções diferentes. Exemplos não limitativos de tais funções são estabilidade do oligonucleotídeo antissentido, aumento na biodisponibilidade, aumento na penetração celular, aumento na distribuição nuclear, direcionamento para células específicas e semelhantes.

[0034] Uma vez introduzidos em um sistema, os oligonucleotídeos antissentido da invenção podem induzir a ação de uma ou mais enzimas ou proteínas estruturais para efetuar a modificação do ácido nucleico alvo. É conhecido na técnica que os oligonucleotídeos antissentido de fita simples que são "semelhantes ao DNA" desencadeiam RNase H, uma endonuclease celular que cliva a fita de RNA de um duplex de RNA:DNA. A ativação da RNase H, portanto, resulta na clivagem do RNA alvo. Esta é uma forma de aumentar a eficiência da inibição da expressão gênica mediada por oligonucleotídeo antissentido. Em modalidades, os

oligonucleotídeos antissentido da invenção não recrutam, e não são concebidos para recrutar, a ação de RNase H para o híbrido de RNA/oligonucleotídeo antissentido alvo. Papéis semelhantes foram postulados para outras ribonucleases, como aquelas na família de enzimas RNase III e ribonuclease L. Os oligonucleotídeos antissentido, conforme descritos aqui, de preferência têm modificações que conferem resistência à nuclease ao oligonucleotídeo antissentido e ao híbrido de RNA/oligonucleotídeo antissentido alvo. Especificamente excluídos da definição de "oligonucleotídeos antissentido" aqui estão as ribozimas que contêm "protuberâncias" internas ou externas que não hibridizam com a sequência alvo.

[0035] Um oligonucleotídeo antissentido de acordo com a invenção compreende de 12 a 30, de preferência 17, 18, 19 ou 20 a 30 nucleobases (isto é, de cerca de 12 a e incluindo 30 nucleosídeos ligados). Um versado na técnica apreciará que a invenção incorpora oligonucleotídeos antissentido de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ou 30 nucleobases de comprimento. Um versado na técnica apreciará que isso incorpora oligonucleotídeos antissentido de 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ou 30 nucleobases de comprimento. Um versado na técnica apreciará que isso incorpora oligonucleotídeos antissentido de 17,

18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 ou 26 nucleobases de comprimento. Frequentemente, os oligonucleotídeos antissentido têm 18, 19, 20, 21 ou 22 nucleobases de comprimento. Os oligonucleotídeos antissentido, conforme descritos aqui, têm de preferência 17, 18, 19, 20, 21 ou 22 nucleotídeos de comprimento.

[0036] Em uma modalidade, um oligonucleotídeo antissentido compreende pelo menos 12 nucleobases contíguas de uma sequência de um oligonucleotídeo cuja sequência é especificamente divulgada aqui. Os oligonucleotídeos antissentido de 12 a 30 nucleobases de comprimento compreendendo um trecho de pelo menos doze (12) nucleobases consecutivas selecionadas a partir dos oligonucleotídeos antissentido ilustrativos também são considerados oligonucleotídeos antissentido adequados.

[0037] Um oligonucleotídeo antissentido compreende uma sequência de nucleobases que é o complemento reverso da sequência do RNA alvo. Um oligonucleotídeo antissentido, conforme descrito aqui, compreende um trecho de pelo menos 12 nucleobases com uma sequência que é o complemento reverso da sequência de pelo menos 12 nucleobases contíguas do RNA alvo. O trecho também é conhecido como região de complementaridade ou região de hibridização. Um versado na técnica apreciará que a invenção incorpora oligonucleotídeos antissentido com uma região de

complementaridade de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ou 30 nucleobases de comprimento. Um versado na técnica apreciará que a invenção incorpora oligonucleotídeos antissentido com uma região de complementaridade de 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ou 30 nucleobases de comprimento. Um versado na técnica apreciará que a invenção incorpora oligonucleotídeos antissentido com uma região de complementaridade de 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 ou 26 nucleobases de comprimento. Frequentemente, os oligonucleotídeos antissentido têm uma região de complementaridade de 18, 19, 20, 21 ou 22 nucleobases de comprimento. Os oligonucleotídeos antissentido, conforme descritos aqui, de preferência têm uma região de complementaridade de 17, 18, 19, 20, 21 ou 22 nucleobases de comprimento.

[0038] Os oligonucleotídeos antissentido têm de preferência um comprimento que é proporcional ao comprimento da região de complementaridade.

[0039] A sequência alvo de um oligonucleotídeo antissentido como aqui descrito é uma parte de um pré-mRNA do antígeno T de poliomavírus. Pré-mRNA ou mRNA precursor é uma fita simples imatura de ácido ribonucleico mensageiro (mRNA). O pré-mRNA do antígeno T de poliomavírus é sintetizado a partir de um modelo de DNA de poliomavírus no

núcleo da célula por transcrição. O pré-mRNA contém um ou mais íntrons que são processados durante a maturação do pré-mRNA em mRNA. O processo de splicing remove íntrons de transcrições e une exons. Os íntrons são tipicamente flanqueados por um sítio doador (extremidade 5' do íntron) e um sítio aceitador (extremidade 3' do íntron). Os locais de splice são necessários para o splicing e tipicamente incluem uma sequência quase invariante GU na extremidade 5' do intron e um sítio aceitador de splice na extremidade 3' do intron com uma sequência AG quase invariante. A sequência GU e AG e a sequência interveniente são separadas do pré-mRNA. Uma característica do pré-mRNA do antígeno T de poliomavírus é que ele pode ser alternativamente spliced ou não spliced levando à geração de pelo menos dois e, frequentemente, 3, 4 ou 5 mRNAs spliced diferentemente (ver Figura 1). A propagação do vírus depende da disponibilidade do genoma do vírus, da presença de proteínas do vírus, da maquinaria celular e, particularmente, da delicada interação entre os vários estágios e componentes. O processo de splicing de RNAs de vírus é um método importante para regular o processo de propagação do vírus e influencia o nível e provavelmente também o tempo de formação de certos produtos nas células. Na presente invenção, foi surpreendentemente descoberto que direcionar um oligonucleotídeo da invenção para um doador de splice ou

sítio aceitador de splice para splicing de mRNA do antígeno T grande tem um efeito profundo não apenas na produção de mRNA do antígeno T, mas também no nível da proteína do capsídeo produzida e a produção de vírus pela célula infectada.

[0040] A sequência alvo de um oligonucleotídeo antissentido, conforme descrito aqui, compreende um local doador de splice de um pré-mRNA do antígeno T de poliomavírus, um local aceitador de splice de um pré-mRNA do antígeno T de poliomavírus ou uma combinação dos mesmos. A sequência alvo compreende tipicamente um trecho de 12 nucleobases contíguas que compreendem um local doador de excisão de um pré-mRNA do antígeno T de poliomavírus ou um local aceitador de processamento de um pré-mRNA do antígeno T de poliomavírus. A sequência contígua compreende de preferência uma sequência de íntron além do doador de splice ou da sequência aceitadora de splice. Em uma modalidade preferida, a sequência contígua compreende uma ou duas nucleobases de íntron adjacentes ao doador de splice ou à sequência aceitadora de splice. Em uma modalidade preferida, a sequência contígua compreende 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 ou 28 nucleobases de íntron adjacentes ao doador de splice ou sequência aceitadora de splice. Em uma modalidade preferida, a sequência contígua compreende

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 ou 28 nucleobases de exon adjacentes ao doador de splice ou à sequência aceitadora de splice. O oligonucleotídeo antissentido compreende de preferência uma sequência que é o complemento reverso de uma sequência contígua de nucleobases do pré-mRNA alvo. A soma do número de nucleobases de íntron, local de splice e exon não excede o número total de nucleobases no oligonucleotídeo antissentido.

[0041] A sequência alvo compreende de preferência a sequência doadora de splice ou a sequência aceitadora de splice que define o íntron que de outra forma é processado para produzir mRNA que codifica para o antígeno T grande do poliomavírus específico (ver Figura 8).

[0042] A sequência de um oligonucleotídeo antissentido, conforme descrito aqui, compreende complementaridade com a sequência doadora de splice ou a sequência aceitadora de splice que define o íntron que é, de outra forma, processado para produzir mRNA que codifica para o antígeno T grande do poliomavírus específico (ver Figura 8).

[0043] Em uma modalidade preferida, a sequência alvo de um primeiro oligonucleotídeo é uma sequência na região alvo do local de splice 3' indicada abaixo para os respectivos vírus. Em uma modalidade preferida, a sequência

alvo de outro oligonucleotídeo é uma sequência na região alvo do local de splice 5' indicada abaixo para os respectivos vírus. Um oligonucleotídeo que é direcionado para uma sequência alvo em uma região indicada abaixo compreende a sequência complementar do doador de splice ou aceitador de splice na sequência indicada. Se mais de um AON for usado em um método conforme descrito aqui, é preferido que os AONs sejam direcionados a uma sequência alvo do mesmo vírus.

Abreviação	Acesso	Região alvo do local de splice 3'	Região alvo do local de splice 5'
BKPyV	NC_001538	4537-4596	4881-4940
JCPyV	NC_001699	4397-4456	4741-4800
KIPyV	NC_009238	4299-4358	4686-4745
WUPyV	NC_009539	4477-4536	4876-4935
MCPyV	NC_010277	4693-4752	5124-5183
HPyV6	NC_014406	4264-4323	4654-4713
HPyV7	NC_014407	4272-4331	4677-4736
TSPyV	NC_014361	4352-4411	4765-4824
HPyV9	NC_015150	4408-4467	4760-4819
MWPpyV	NC_018102	4303-4362	4658-4717
STLPyV	NC_020106	4159-4218	4504-4563
HPyV12	NC_020890	4392-4451	4791-4850
NJPyV	NC_024118	4471-4530	4859-4918

[0044] A primeira coluna contém uma abreviatura do nome do vírus. Uma sequência de protótipo para o vírus é indicada com o código de acesso para a sequência no banco de dados de sequência. A terceira e quarta colunas especificam uma região na sequência de protótipo do vírus que contém o doador de splice (coluna 4) ou aceitador de splice (coluna 3) para o qual um AON como descrito aqui pode compreender uma região de complementaridade.

[0045] Um oligonucleotídeo antissentido de acordo com a invenção pode modular o splicing do pré-mRNA do antígeno T na célula infectada. Sem estar limitado pela teoria, acredita-se que um oligonucleotídeo antissentido, conforme descrito aqui, inibe o uso do local de splice ao qual é direcionado. A produção reduzida resultante de antígeno T grande impacta a expressão das proteínas do capsídeo e, portanto, a produção de vírus (ver Figuras 4-6). Sem estar limitado pela teoria, acredita-se que o desequilíbrio dos produtos de splice específicos do antígeno T induzidos pelos oligonucleotídeos antissentido da invenção tem um efeito mais pronunciado na propagação do vírus do que a redução do mRNA específico do antígeno T por abordagens semelhantes a RNAi.

[0046] No contexto desta invenção, "hibridização" significa o emparelhamento de fitas complementares de ácido nucleico. Na presente invenção, o mecanismo preferido de

emparelhamento envolve ligação de hidrogênio, que pode ser Watson-Crick, Hoogsteen ou ligação de hidrogênio invertida de Hoogsteen, entre nucleosídeos complementares ou bases de nucleotídeos (nucleobases). Por exemplo, adenina e timina são nucleobases complementares que emparelham através da formação de ligações de hidrogênio. A hibridização pode ocorrer em várias circunstâncias. A hibridização de fitas complementares geralmente melhora com o comprimento da sequência. A hibridização específica de duas fitas é realizada com um trecho contíguo de 12 ou mais nucleobases complementares. A sequência de um oligonucleotídeo antissentido pode ser, mas não precisa ser, 100% complementar à de sua sequência alvo para ser especificamente hibridizável. Além disso, um oligonucleotídeo antissentido pode hibridizar sobre um ou mais segmentos de modo que os segmentos intervenientes ou adjacentes não estejam envolvidos no evento de hibridização. Em uma modalidade desta invenção, o oligonucleotídeo antissentido da presente invenção compreende pelo menos 70%, ou pelo menos 75%, ou pelo menos 80%, ou pelo menos 85% de complementaridade de sequência com uma região alvo dentro do pré-mRNA alvo. Em outras modalidades, o oligonucleotídeo antissentido da presente invenção compreende pelo menos 90% de complementaridade de sequência e ainda compreende pelo menos 95% ou pelo menos

96% de complementaridade de sequência com a região alvo dentro do pré-mRNA alvo. Por exemplo, um composto antissentido no qual 18 de 20 nucleobases do composto antissentido são complementares a uma região alvo e, portanto, hibridizaria especificamente, representaria 90 por cento de complementaridade. Quando um oligonucleotídeo antissentido de 18 nucleotídeos tem uma sequência que é o complemento reverso de um trecho contíguo de pelo menos 12 nucleobases de um pré-mRNA do antígeno T grande de poliomavírus, as 6 nucleobases complementares restantes podem ser agrupadas com 12 ou não ser contíguas com 12. A complementaridade percentual de um oligonucleotídeo antissentido com uma região de um pré-mRNA alvo pode ser determinada rotineiramente usando programas BLAST (ferramentas básicas de pesquisa de alinhamento local) e programas PowerBLAST conhecidos na técnica (Altschul et al., *J. Mol. Biol.*, 1990, 215, 403-410; Zhang e Madden, *Genome Res.*, 1997, 7.649-656). Como o número de nucleotídeos é sempre um inteiro, a porcentagem real pode não ser exatamente 90% ou não exatamente 96%. A sequência contígua de preferência não tem nenhuma ou apenas uma incompatibilidade de nucleotídeo com a sequência de ácido nucleico alvo.

[0047] Um oligonucleotídeo antissentido de 12 a 30, de preferência 17, 18, 19 ou 20 a 30 nucleobases de

comprimento é de preferência pelo menos 80% complementar aos nucleotídeos na região 4537-4596 ou na região 4881-4940 tomada de NC_001538 e pelo menos compreendendo complementaridade com a sequência doadora de splice ou sequência aceitadora de splice nas respectivas regiões, de preferência pelo menos 90% complementar aos nucleotídeos 4537-4596 ou 4881-4940 retirados de NC_001538. As 12 a 30, de preferência 17, 18, 19 ou 20 a 30 nucleobases são de preferência complementares a um trecho de pelo menos 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 30, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ou 30 nucleotídeos contíguos do pré-mRNA alvo. Em uma modalidade preferida, o oligonucleotídeo tem 12 a 30, de preferência 17, 18, 19 ou 20 a 30 nucleobases de comprimento e de preferência compreende uma sequência como apresentada em SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 20; SEQ ID NO: 21; SEQ ID NO: 22; SEQ ID NO: 23; SEQ ID NO: 24; SEQ ID NO: 25; SEQ ID NO: 26 ou SEQ ID NO: 27; de preferência conforme estabelecido em SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 7; SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 20; SEQ ID NO: 21; SEQ ID NO: 22; SEQ ID NO: 23; SEQ ID NO: 24 ou SEQ ID NO: 25; de preferência conforme estabelecido em SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 20; SEQ ID

NO: 21; SEQ ID NO: 22; SEQ ID NO: 23; SEQ ID NO: 24 ou SEQ ID NO: 25.

[0048] Um oligonucleotídeo antissentido de 12 a 30, de preferência 17, 18, 19 ou 20 a 30 nucleobases de comprimento é de preferência pelo menos 80% complementar aos nucleotídeos na região 4397-4456 ou na região 4741-4800 tomada de NC_001699 e pelo menos compreendendo complementaridade com a sequência doadora de splice ou sequência aceitadora de splice nas respectivas regiões, de preferência pelo menos 90% complementar aos nucleotídeos 4397-4456 ou a região 4741-4800 tomada de NC_001699. As 12 a 30, de preferência 17, 18, 19 ou 20 a 30 nucleobases são de preferência complementares a um trecho de pelo menos 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 30, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ou 30 nucleotídeos contíguos do pré-mRNA alvo.

[0049] Um oligonucleotídeo antissentido de 12 a 30, de preferência 17, 18, 19 ou 20 a 30 nucleobases de comprimento é de preferência pelo menos 80% complementar aos nucleotídeos na região 4299-4358 ou na região 4686-4745 retirada de NC_009238 e pelo menos compreendendo complementaridade com a sequência doadora de splice ou sequência aceitadora de splice nas respectivas regiões, de preferência pelo menos 90% complementar aos nucleotídeos 4299-4358 ou a região 4686-4745 retirada de NC_009238. As 12 a 30, de preferência 17, 18, 19 ou 20 a 30 nucleobases

são de preferência complementares a um trecho de pelo menos 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 30, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ou 30 nucleotídeos contíguos do pré-mRNA alvo.

[0050] Um oligonucleotídeo antissentido de 12 a 30, de preferência 17, 18, 19 ou 20 a 30 nucleobases de comprimento é de preferência pelo menos 80% complementar aos nucleotídeos na região 4477-4536 ou na região 4876-4935 retirados de NC_009539 e pelo menos compreendendo complementaridade com a sequência doadora de splice ou sequência aceitadora de splice nas respectivas regiões, de preferência pelo menos 90% complementar aos nucleotídeos 4477-4536 ou a região 4876-4935 retirada de NC_009539. As 12 a 30, de preferência 17, 18, 19 ou 20 a 30 nucleobases são de preferência complementares a um trecho de pelo menos 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 30, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ou 30 nucleotídeos contíguos do pré-mRNA alvo.

[0051] Um oligonucleotídeo antissentido de 12 a 30, de preferência 17, 18, 19 ou 20 a 30 nucleobases de comprimento é de preferência pelo menos 80% complementar aos nucleotídeos na região 4693-4752 ou na região 5124-5183 tomada de NC_010277 e pelo menos compreendendo complementaridade com a sequência doadora de splice ou sequência aceitadora de splice nas respectivas regiões, de preferência pelo menos 90% complementar aos nucleotídeos 4693-4752 ou a região 5124-5183 tomada de NC_010277. As 12

a 30, de preferência 17, 18, 19 ou 20 a 30 nucleobases são de preferência complementares a um trecho de pelo menos 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 30, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ou 30 nucleotídeos contíguos do pré-mRNA alvo.

[0052] Um oligonucleotídeo antissentido de 12 a 30, de preferência 17, 18, 19 ou 20 a 30 nucleobases de comprimento é de preferência pelo menos 80% complementar aos nucleotídeos na região 4264-4323 ou na região 4654-4713 retirado de NC_014406 e pelo menos compreendendo complementaridade com a sequência doadora de splice ou sequência aceitadora de splice nas respectivas regiões, de preferência pelo menos 90% complementar aos nucleotídeos 4264-4323 ou a região 4654-4713 retirado de NC_014406. As 12 a 30, de preferência 17, 18, 19 ou 20 a 30 nucleobases são de preferência complementares a um trecho de pelo menos 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 30, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ou 30 nucleotídeos contíguos do pré-mRNA alvo.

[0053] Um oligonucleotídeo antissentido de 12 a 30, de preferência 17, 18, 19 ou 20 a 30 nucleobases de comprimento é de preferência pelo menos 80% complementar aos nucleotídeos na região 4272-4331 ou na região 4677-4736 retirada de NC_014407 e pelo menos compreendendo complementaridade com a sequência doadora de splice ou sequência aceitadora de splice nas respectivas regiões, de preferência pelo menos 90% complementar aos nucleotídeos

4272-4331 ou a região 4677-4736 retirada de NC_014407. As 12 a 30, de preferência 17, 18, 19 ou 20 a 30 nucleobases são de preferência complementares a um trecho de pelo menos 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 30, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ou 30 nucleotídeos contíguos do pré-mRNA alvo.

[0054] Um oligonucleotídeo antissentido de 12 a 30, de preferência 17, 18, 19 ou 20 a 30 nucleobases de comprimento é de preferência pelo menos 80% complementar aos nucleotídeos na região 4352-4411 ou na região 4765-4824 tomada de NC_014361 e pelo menos compreendendo complementaridade com a sequência doadora de splice ou sequência aceitadora de splice nas respectivas regiões, de preferência pelo menos 90% complementar aos nucleotídeos 4352-4411 ou a região 4765-4824 tomada de NC_014361. As 12 a 30, de preferência 17, 18, 19 ou 20 a 30 nucleobases são de preferência complementares a um trecho de pelo menos 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 30, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ou 30 nucleotídeos contíguos do pré-mRNA alvo.

[0055] Um oligonucleotídeo antissentido de 12 a 30, de preferência 17, 18, 19 ou 20 a 30 nucleobases de comprimento é de preferência pelo menos 80% complementar aos nucleotídeos na região 4408-4467 ou na região 4760-4819 tomada de NC_015150 e pelo menos compreendendo complementaridade com a sequência doadora de splice ou sequência aceitadora de splice nas respectivas regiões, de

preferência pelo menos 90% complementar aos nucleotídeos 4408-4467 ou a região 4760-4819 tomada de NC_015150. As 12 a 30, de preferência 17, 18, 19 ou 20 a 30 nucleobases são de preferência complementares a um trecho de pelo menos 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 30, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ou 30 nucleotídeos contíguos do pré-mRNA alvo.

[0056] Um oligonucleotídeo antissentido de 12 a 30, de preferência 17, 18, 19 ou 20 a 30 nucleobases de comprimento é de preferência pelo menos 80% complementar aos nucleotídeos na região 4303-4362 ou na região 4658-4717 tomada de NC_018102 e pelo menos compreendendo complementaridade com a sequência doadora de splice ou sequência aceitadora de splice nas respectivas regiões, de preferência pelo menos 90% complementar aos nucleotídeos 4303-4362 ou a região 4658-4717 tomada de NC_018102. As 12 a 30, de preferência 17, 18, 19 ou 20 a 30 nucleobases são de preferência complementares a um trecho de pelo menos 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 30, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ou 30 nucleotídeos contíguos do pré-mRNA alvo.

[0057] Um oligonucleotídeo antissentido de 12 a 30, de preferência 17, 18, 19 ou 20 a 30 nucleobases de comprimento é de preferência pelo menos 80% complementar aos nucleotídeos na região 4159-4218 ou na região 4504-4563 retirado de NC_020106 e pelo menos compreendendo complementaridade com a sequência doadora de splice ou

sequência aceitadora de splice nas respectivas regiões, de preferência pelo menos 90% complementar aos nucleotídeos 4159-4218 ou a região 4504-4563 retirado de NC_020106. As 12 a 30, de preferência 17, 18, 19 ou 20 a 30 nucleobases são de preferência complementares a um trecho de pelo menos 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 30, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ou 30 nucleotídeos contíguos do pré-mRNA alvo.

[0058] Um oligonucleotídeo antissentido de 12 a 30, de preferência 17, 18, 19 ou 20 a 30 nucleobases de comprimento é de preferência pelo menos 80% complementar aos nucleotídeos na região 4392-4451 ou na região 4791-4850 tomada de NC_020890 e pelo menos compreendendo complementaridade com a sequência doadora de splice ou sequência aceitadora de splice nas respectivas regiões, de preferência pelo menos 90% complementar aos nucleotídeos 4392-4451 ou a região 4791-4850 retirada de NC_020890. As 12 a 30, de preferência 17, 18, 19 ou 20 a 30 nucleobases são de preferência complementares a um trecho de pelo menos 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 30, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ou 30 nucleotídeos contíguos do pré-mRNA alvo.

[0059] Um oligonucleotídeo antissentido de 12 a 30, de preferência 17, 18, 19 ou 20 a 30 nucleobases de comprimento é de preferência pelo menos 80% complementar aos nucleotídeos na região 4471-4530 ou na região 4859-4918 retirados de NC_024118 e pelo menos compreendendo

complementaridade com a sequência doadora de splice ou sequência aceitadora de splice nas respectivas regiões, de preferência pelo menos 90% complementar aos nucleotídeos 4471-4530 ou a região 4859-4918 retirada de NC_024118. As 12 a 30, de preferência 17, 18, 19 ou 20 a 30 nucleobases são de preferência complementares a um trecho de pelo menos 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 30, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ou 30 nucleotídeos contíguos do pré-mRNA alvo.

[0060] Um oligonucleotídeo antissentido como aqui descrito compreende de preferência pelo menos 12 nucleobases contíguas de SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 7; SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 16; SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 18; SEQ ID NO: 20; SEQ ID NO: 21; SEQ ID NO: 22; SEQ ID NO: 23; SEQ ID NO: 24; SEQ ID NO: 25; SEQ ID NO: 26 ou SEQ ID NO: 27 de preferência de SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 7; SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 20; SEQ ID NO: 21; SEQ ID NO: 22; SEQ ID NO: 23; SEQ ID NO: 24 ou SEQ ID NO: 25; de preferência de SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 20; SEQ ID NO: 21; SEQ ID NO: 22; SEQ ID NO: 23; SEQ ID NO: 24 ou SEQ ID NO: 25, em que os pelo menos doze nucleotídeos compreendem de preferência o

complemento reverso do sítio doador de splice, sítio aceitador de splice ou combinação dos mesmos do pré-mRNA alvo, ou seja, o doador/aceitador de splice do pré-mRNA do antígeno T grande do respectivo poliomavírus. O complemento reverso está presente nas respectivas SEQ IDs.

[0061] A invenção se refere ainda a um oligonucleotídeo antissentido que compreende pelo menos 12 nucleobases contíguas da sequência de nucleotídeos (ver Figura 3 e Figura 10):

5' ACCUCUGAGCUACUCCAGGU 3'	SEQ ID NO: 1;
5' ACAAACCUCUGAGCUACUCC 3'	SEQ ID NO: 2;
5' CAGCACAAACCUCUGAGCUA 3'	SEQ ID NO: 3;
5' UCCAUAGGUUGGCACCUAGA 3'	SEQ ID NO: 4;
5' UGUUCCAUAGGUUGGCACCU 3'	SEQ ID NO: 5;
5 'AAACCUCUGAGCUACUCCAG 3'	SEQ ID NO: 20;
5 'GCACAAACCUCUGAGCUACU 3'	SEQ ID NO: 21;
5 'AUCAGCACAAACCUCUGAGC 3'	SEQ ID NO: 22;
5 'AAAUCAGCACAAACCUCUGA 3'	SEQ ID NO: 23;
5 'GAAAAUCAGCACAAACCUCU 3'	SEQ ID NO: 24;
5 'AGGAAAAUCAGCACAAACCU 3'	SEQ ID NO: 25;
5 'CAUAGGUUGGCACCUAUAAA 3'	SEQ ID NO: 26 ou
5 'UUCCAUAGGUUGGCACCUAU 3'	SEQ ID NO: 27.

[0062] Um oligonucleotídeo antissentido como aqui descrito compreende de preferência pelo menos 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 nucleobases contíguas de SEQ ID NO: 1;

SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 7; SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 16; SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 18; SEQ ID NO: 20; SEQ ID NO: 21; SEQ ID NO: 22; SEQ ID NO: 23; SEQ ID NO: 24; SEQ ID NO: 25; SEQ ID NO: 26 ou SEQ ID NO: 27; de preferência de SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 7; SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 20; SEQ ID NO: 21; SEQ ID NO: 22; SEQ ID NO: 23; SEQ ID NO: 24 ou SEQ ID NO: 25; de preferência de SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 20; SEQ ID NO: 21; SEQ ID NO: 22; SEQ ID NO: 23; SEQ ID NO: 24 ou SEQ ID NO: 25, em que pelo menos respectivamente 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 nucleotídeos compreendem de preferência o complemento reverso do sítio doador de splice, sítio aceitador de splice ou combinação dos mesmos do pré-mRNA alvo. Uma nucleobase, como indicado aqui, pode ser substituída por uma nucleobase diferente com a mesma atividade de emparelhamento de base em espécie, não necessariamente em quantidade. Um exemplo de tal alternativa é a timidina básica como um substituto para o uracil. Outras nucleobases podem ser substituídas por uma alternativa com o mesmo tipo de atividade de emparelhamento de base.

[0063] Outra alternativa são bases que combinam com qualquer base. Um exemplo de base é a inosina. Essas bases normalmente não adicionam especificidade ao oligonucleotídeo em comparação com uma base que emparelha com a base apropriada no RNA alvo. Os oligonucleotídeos podem acomodar isto até certo ponto, como é do conhecimento do versado na técnica. Se a mesma especificidade for desejada, uma base seletiva adicional pode ser adicionada ao oligonucleotídeo, por exemplo, mas não se limitando a, uma base seletiva adicional para cada inosina ou outra base não seletiva.

[0064] O oligonucleotídeo antissentido compreende de preferência pelo menos 12 nucleobases contíguas da sequência de nucleotídeos (ver Figura 9):

SEQ ID	Vírus	Alvo	Sequência
1	BKPyV	Doador	5' ACCUCUGAGCUACUCCAGGU 3'
2	BKPyV	Doador	5' ACAAACCUCUGAGCUACUCC 3'
3	BKPyV	Doador	5' CAGCACAAACCUCUGAGCUA 3'
4	BKPyV	Aceitador	5' UCCAUAGGUUGGCACCUAGA 3'
5	BKPyV	Aceitador	5' UGUUCCAUAGGUUGGCACCU 3'
6	JCPyV	Doador	5' ACCUCUGAACUAUUC CAUGU 3'
7	JCPyV	Doador	5' ACCAACCUCUGAACUAUUC 3'
8	JCPyV	Doador	5' CACAACCAACCUCUGAACUA 3'
9	JCPyV	Aceitador	5' UCCAUAGGUUGGCACCUAAA 3'
10	JCPyV	Aceitador	5' UGUUCCAUAGGUUGGCACCU 3'

11	KIPyV	Doador	5' GUAUACCUGAGAAGAUUGCC 3'
12	KIPyV	Doador	5' UCUUUGCAGUAUACCUGAGA 3'
13	KIPyV	Aceitador	5' UGUACCGUAUGUAGGUAUCU 3'
14	KIPyV	Aceitador	5' CCGUAUGUAGGUAUCUAUAC 3'
15	WUPyV	Doador	5' UCUACCUGUGAAGAGCUCCA 3'
16	WUPyV	Doador	5' UGUGCAUUCUACCUGUGAAG 3'
17	MCPyV	Doador	5' CCUCAUCAAAACAUAGAGAAG 3'
18	MCPyV	Doador	5' GGAAAUUUUGUACUGACCUC 3'
19	Control	-	5' AGGUCCACACUCAAUCCUCA 3'
20	HYB_06	Doador	5' AAACCUCUGAGCUACUCCAG 3'
21	HYB_07	Doador	5' GCACAAACCUCUGAGCUACU 3'
22	HYB_08	Doador	5' AUCAGCACAAACCUCUGAGC 3'
23	HYB_09	Doador	5' AAAUCAGCACAAACCUCUGA 3'
24	HYB_10	Doador	5' GAAAAUCAGCACAAACCUCU 3'
25	HYB_11	Doador	5' AGGAAAAUCAGCACAAACCU 3'
26	HYB_12	Aceitador	5' CAUAGGUUGGCACCUAUAAA 3'
27	HYB_13	Aceitador	5' UUCAUAGGUUGGCACCUAU 3'
28	HYB_14	Codificação de Exon 1	5' UGAGCUCCAUGGAUUCUCC 3'
29	SAN-73	Codificação de Exon 2	5' CACTCTTCTGTTCCAT 3'
30	SAN-74	Doador	5' CACAAACCTCTGAGCT 3'

[0065] Em uma modalidade, o oligonucleotídeo antissentido conforme descrito aqui compreende pelo menos uma modificação de estrutura principal. Em uma modalidade,

o oligonucleotídeo antissentido compreende uma modificação de fosforotioato. A modificação de fosforotioato (PS) substitui um átomo de enxofre por um oxigênio sem ponte na estrutura de fosfato de um oligo. Esta modificação torna a ligação internucleotídeo resistente à degradação da nuclease. As ligações de fosforotioato podem ser introduzidas entre os últimos 3 a 5 nucleotídeos na extremidade 5' ou 3' do oligo para inibir a degradação da exonuclease (ver Figura 7). Incluir ligações de fosforotioato em todo o oligo ajudará a reduzir o ataque de endonucleases também (ver Figura 3).

[0066] Em outra modalidade, o oligonucleotídeo antissentido compreende uma modificação morfolino (fosforodiamidato morfolino). Embora os morfolinos tenham bases de ácido nucléico padrão, essas bases estão ligadas a anéis de morfolina ligados uns aos outros por grupos fosforodiamidato em vez de fosfatos. Os morfolinos não provocam a degradação de suas moléculas de RNA alvo.

[0067] Em uma modalidade, o oligonucleotídeo antissentido compreende pelo menos uma modificação de açúcar no carbono 2' da fração de ribose do nucleosídeo. Em uma modalidade, o oligonucleotídeo antissentido compreende pelo menos uma modificação de açúcar 2'. Uma visão geral das modificações de açúcar para fins antissentido é dada em Prakash (2011; *Chem. Biodivers.* Sept 8 (9): 1616-1641. Doi

10.1002/cbdv.201100081). Como mostrado na Figura 7, as modificações preferidas de 2' açúcar são modificações 2'-alcoxi ou 2'-alcoxialcoxi, mais preferencialmente 2'-metoxietoxi. As modificações preferidas são 2'-O-metil (2'-O-Me), 2'-O-metoxietil (2'-MOE), 2'-S-etil restrito (2'-cEt) e ácido nucleico bloqueado (LNA). Outras modificações incluem ácido nucleico peptídico (PNA).

[0068] Em algumas modalidades, todas as posições em um determinado oligonucleotídeo antissentido são uniformemente modificadas. Em outras modalidades, algumas posições em um determinado oligonucleotídeo antissentido não são uniformemente modificadas. Na verdade, mais de uma das modificações acima mencionadas pode ser incorporada em um único oligonucleotídeo antissentido ou mesmo em um único nucleosídeo dentro de um oligonucleotídeo antissentido. A presente invenção também inclui oligonucleotídeos antissentido que são oligonucleotídeos antissentido quiméricos. Os oligonucleotídeos antissentido quiméricos são oligonucleotídeos antissentido que contêm duas ou mais regiões quimicamente distintas, cada uma composta de pelo menos um nucleotídeo. Estes oligonucleotídeos antissentido contêm pelo menos uma região em que o oligonucleotídeo antissentido é modificado de modo a conferir ao oligonucleotídeo antissentido maior resistência à

degradação da nuclease, aumento da absorção celular e/ou aumento da afinidade de ligação para o ácido nucleico alvo.

[0069] Um oligonucleotídeo antissentido pode servir como um substrato para enzimas capazes de clivar RNA:DNA ou RNA:híbridos de RNA. Frequentemente, essa possibilidade é mediada pela inclusão de uma região no interior do oligonucleotídeo antissentido. Esses oligonucleotídeos antissentido também são referidos como "gapmers". Um gapmer é um oligonucleotídeo antissentido quimérico que contém um bloco central típico de monômeros de desoxirribonucleotídeos suficientemente longo para induzir a clivagem de RNaseH. A clivagem de RNase eficiente requer um trecho de 4 ou mais desoxirribonucleotídeos. Normalmente, esses trechos têm 9 ou mais desoxirribonucleotídeos. Na presente invenção, é preferido que o oligonucleotídeo antissentido não contenha uma região que possa servir como um substrato para enzimas capazes de clivar RNA:DNA ou RNA:híbridos de RNA.

[0070] O oligonucleotídeo antissentido compreende de preferência nucleotídeos modificados, tais como nucleobases modificadas com fosforotioato e/ou modificações de açúcar 2', proporcionando assim resistência à degradação inadvertida por nucleases. Como mostrado na Figura 7, as modificações de açúcar 2' preferidas são modificações 2'-alcoxi ou 2'-alcoxialcoxi, mais preferencialmente 2'-

metoxietoxi. As modificações de açúcar 2' preferidas incluem 2'-O-metil (2'-O-Me), 2'-O-metoxietil (2'-MOE), 2'-S-etil restrito (2'-cEt) e ácido nucleico bloqueado (LNA). A estrutura principal pode conter fosforotioato. Outras configurações de oligonucleotídeo antissentido também são compreendidas por esta invenção. O oligonucleotídeo antissentido compreende de preferência nucleotídeos modificados que fornecem resistência à degradação inadvertida por nucleases do RNA alvo, tais como nucleobases modificadas com fosforotioato e/ou modificações de açúcar 2'. Esse oligonucleotídeo antissentido está dentro do escopo da invenção. Um oligonucleotídeo como aqui divulgado, portanto, de preferência tem uma região que fornece resistência à nuclease ao RNA alvo. O duplex formado pelo oligonucleotídeo antissentido e o RNA alvo não é sensível à ação de RNase H.

[0071] Em uma modalidade preferida, o oligonucleotídeo antissentido compreende uma ou mais nucleobases com uma estrutura de polímero modificada. O esqueleto do polímero modificado é de preferência um esqueleto modificado é indicado em outro momento aqui. Em uma modalidade preferida, a estrutura do polímero modificado compreende 2'-O-metil (2'-O-Me), 2'-O-metoxietil (2'-MOE), 2'-S-etil restrito (2'-cEt), ácido nucleico bloqueado (LNA), ácido nucleico peptídico (PNA) ou

nucleotídeo morfolino (PMO). Em uma modalidade preferida, todos os nucleotídeos na estrutura do polímero modificado compreendem uma porção de açúcar modificada, de preferência no carbono 2'. Em uma modalidade preferida, o grupo fosfato que liga dois nucleotídeos é modificado para um grupo fosforotioato. De preferência, todas as ligações fosfodiéster são ligações fosforotioato na estrutura do polímero modificado.

[0072] Os poliomavírus humanos podem ser divididos em vários gêneros, denominados gênero alfa, beta e delta (Helle, F. *et. al.*, *Viruses*, 2017). Em uma modalidade preferida, o poliomavírus é um vírus alfa ou beta, de preferência um vírus beta. Vários poliomavírus humanos estão listados na tabela abaixo. Em uma modalidade preferida, o poliomavírus é um poliomavírus BK (ou vírus BK, também referido neste pedido como BKPyV ou BKV), um poliomavírus JC (ou vírus JC, também referido neste pedido como JCV) ou um poliomavírus de célula Merkel (Poliomavírus MC, vírus MC ou também referido neste pedido como MCV). Em uma modalidade particularmente preferida, o poliomavírus é vírus BK ou vírus JC, de preferência vírus BK.

Abreviação	Acesso	Região alvo do local de splice 3'	Região alvo do local de splice 5'
BKPyV	NC_001538	4537-4596	4881-4940

JCPyV	NC_001699	4397-4456	4741-4800
KIPyV	NC_009238	4299-4358	4686-4745
WUPyV	NC_009539	4477-4536	4876-4935
MCPyV	NC_010277	4693-4752	5124-5183
HPyV6	NC_014406	4264-4323	4654-4713
HPyV7	NC_014407	4272-4331	4677-4736
TSPyV	NC_014361	4352-4411	4765-4824
HPyV9	NC_015150	4408-4467	4760-4819
MWPyV	NC_018102	4303-4362	4658-4717
STLPyV	NC_020106	4159-4218	4504-4563
HPyV12	NC_020890	4392-4451	4791-4850
NJPyV	NC_024118	4471-4530	4859-4918

[0073] A invenção também fornece um método para inibir a replicação de poliomavírus em uma célula, o método compreendendo fornecer uma célula que está infectada com o referido poliomavírus com o oligonucleotídeo antissentido como aqui descrito. O oligonucleotídeo antissentido é de preferência um oligonucleotídeo que tem como alvo o poliomavírus da infecção (ver Figura 3). A célula é de preferência uma célula que é suscetível à replicação do poliomavírus. Quando a célula é uma célula de um animal, como um humano, é preferível que o animal seja um hospedeiro permissivo, isto é, um hospedeiro que permite a um vírus contornar suas defesas e replicar o vírus. Para

poliomavírus, como o vírus BK e o vírus JC, a replicação geralmente é detectada primeiro por meio da detecção de vírus na urina do animal (uremia). Posteriormente, quando a infecção persiste, o vírus também pode ser detectado no soro do animal (viremia). A maioria dos humanos encontra os vírus BK e JC durante a infância, causando uma doença leve. No entanto, quando reativado ou adquirido no hospedeiro imunocomprometido, os vírus BK e JC foram implicados em vários estados de doença clínica humana. BK está mais comumente associado ao envolvimento renal, como estenose ureteral, cistite hemorrágica e nefropatia (Leploeg, M.D. et. al., *Clinical Infectious Diseases*, 2001; Helle, F. et. al., *Viruses*, 2017). A susceptibilidade ou permissividade do hospedeiro pode ser induzida pelo comprometimento do sistema imunológico do hospedeiro. Várias circunstâncias podem levar a uma redução temporária ou permanente da capacidade imunológica do hospedeiro. Imunodeficiência (ou deficiência imunológica) é um estado em que a capacidade do sistema imunológico de combater doenças infecciosas e o câncer está comprometida ou totalmente ausente. A maioria dos casos de imunodeficiência é adquirida ("secundária") devido a fatores extrínsecos que afetam o sistema imunológico do paciente. Exemplos desses fatores extrínsecos incluem infecção por HIV, idades extremas e fatores ambientais, como nutrição. A imunossupressão também

pode ser induzida por algumas drogas, como glicocorticoides, citostáticos, anticorpos e compostos que atuam sobre imunofilinas (como inibidores de calcineurina, belatacept (uma molécula semelhante a imunoglobulina que tem o domínio extracelular de CTLA-4) e moléculas semelhantes). Este pode ser um efeito desejado, como na cirurgia de transplante de órgãos como uma medida anti-rejeição e em pacientes que sofrem de um sistema imunológico hiperativo, como em doenças autoimunes. No entanto, às vezes, esse efeito desejado tem o efeito adicional de reduzir a capacidade dos indivíduos de combater infecções por vírus, como a infecção por poliomavírus. Uma pessoa com imunodeficiência de qualquer tipo é considerada imunodeficiente. Uma pessoa imunocomprometida pode ser particularmente vulnerável a infecções oportunistas, além de infecções normais que podem afetar a todos.

[0074] Em uma modalidade, a invenção fornece um método de preparação de um enxerto para transplante, o método caracterizado por células doadoras, de preferência células renais doadoras, serem fornecidas com o oligonucleotídeo antissentido como aqui descrito. O oligonucleotídeo antissentido é de preferência um oligonucleotídeo que tem como alvo um poliomavírus que se replica nas células de enxerto. No caso de um enxerto renal

ou enxerto de célula renal, o poliomavírus é de preferência um vírus BK, um vírus JC ou um oligonucleotídeo específico do vírus MC. As células do enxerto assim tratadas são menos susceptíveis à replicação do poliomavírus para o qual o oligonucleotídeo antissentido é específico. Isso aumenta a taxa de sucesso do transplante. Facilita o gerenciamento de receptores de transplantes. Uma das maneiras de gerenciar a replicação de poliomavírus oportunista em receptores de transplantes e outra imunossupressão induzida por drogas em pacientes é reduzir a administração da droga imunossupressora, permitindo assim que o sistema imunológico se recupere na medida em que a infecção e/ou replicação do vírus é reduzida. Quando um enxerto é preparado como aqui descrito, as infecções/replicação de poliomavírus em um paciente são menos frequentes e, quando detectadas, muitas vezes menos graves em comparação com pacientes que recebem enxertos não tratados. É preferido que os receptores de enxerto recebam uma ou mais administrações adicionais com o oligonucleotídeo antissentido conforme desejado. A invenção também fornece um método de tratamento de uma infecção por poliomavírus em um indivíduo, o método compreendendo a administração do oligonucleotídeo antissentido como aqui descrito ao indivíduo em necessidade do mesmo. O indivíduo é de preferência um indivíduo imunocomprometido.

[0075] O enxerto é de preferência um aloenxerto ou um xenoenxerto. Os receptores de tais enxertos são frequentemente tratados com drogas imunossupressoras para aumentar a sobrevivência do enxerto ou para diminuir a incidência e/ou a gravidade dos efeitos do hospedeiro *versus* enxerto. Atualmente, muitos tecidos podem ser enxertados. Os efeitos hospedeiro *versus* enxerto são frequentemente de alto risco ao transplantar células ou órgãos de outro ser humano não geneticamente idêntico ou de um animal não humano. Os enxertos incluem pulmão, coração, válvula cardíaca, rim, fígado, pâncreas, intestino, timo e medula óssea. Os poliomavírus foram detectados no plasma de até 3% desses pacientes que receberam imunossupressão após o transplante de órgãos (De Vlaminc, I. *et. al.*, *Cell*, 2013). O enxerto compreende de preferência um rim ou células renais. O indivíduo é de preferência o receptor de um transplante de rim ou de células renais.

[0076] O oligonucleotídeo antissentido é de preferência aquele que confere resistência a RNase H a um duplex do oligonucleotídeo e do RNA alvo. O oligonucleotídeo antissentido compreende de preferência uma sequência que é o complemento reverso de um trecho contíguo de pelo menos 12 e de preferência pelo menos 17 nucleobases de um RNA que pode estar presente em células renais humanas, de preferência um RNA de um vírus humano que pode

se replicar em células renais humanas, de preferência um poliomavírus. Em uma modalidade, a invenção fornece um oligonucleotídeo antissentido de 12 a 30, de preferência de 17, 18, 19 ou 20 a 30 nucleobases de comprimento que compreende uma sequência que é o complemento reverso de um trecho contíguo de pelo menos 12 nucleobases de um pré-mRNA do antígeno T de poliomavírus e que o oligonucleotídeo antissentido pode modular o splicing do referido pré-mRNA do antígeno T em uma célula, em que o oligonucleotídeo antissentido compreende pelo menos 12 nucleobases contíguas de SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 7; SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 16; SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 18; SEQ ID NO: 20; SEQ ID NO: 21; SEQ ID NO: 22; SEQ ID NO: 23; SEQ ID NO: 24; SEQ ID NO: 25; SEQ ID NO: 26 ou SEQ ID NO: 27. É ainda fornecido um oligonucleotídeo antissentido que compreende pelo menos 12 nucleobases contíguas de SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 7; SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 16; SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 18; SEQ ID NO: 20; SEQ ID NO: 21; SEQ ID NO: 22; SEQ ID NO: 23; SEQ ID NO: 24; SEQ ID NO: 25; SEQ ID NO: 26 ou SEQ ID NO: 27, em que

os pelo menos doze nucleotídeos compreendem o complemento reverso da sequência doadora de splice ou a sequência aceitadora de splice do pré-mRNA do antígeno T grande do respectivo poliomavírus.

[0077] O oligonucleotídeo antissentido, conforme descrito aqui, compreende de preferência uma modificação que torna o duplex de mRNA-oligonucleotídeo resistente à ação de RNase H. De preferência compreendendo pelo menos uma nucleobase com uma estrutura de polímero modificada, de preferência um 2'-O-metil (2'-O -Me), 2'-O-metoxietil (2'-MOE), 2'-S-etil restrito (2'-cEt), ácido nucleico bloqueado (LNA), ácido nucleico peptídico (PNA) ou nucleotídeo morfolino (PMO). De preferência, todas as nucleobases compreendem uma estrutura polimérica modificada, de preferência um 2'-O-metil (2'-O-Me), 2'-O-metoxietil (2'-MOE), 2'-S-etil restrito (2'-cEt), ácido nucleico bloqueado (LNA), ácido nucleico peptídico (PNA) ou nucleotídeo morfolino (PMO).

[0078] Em uma modalidade preferida, o oligonucleotídeo antissentido compreende pelo menos 17, preferencialmente pelo menos 18, 19 e preferencialmente pelo menos 20 nucleobases contíguas de SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 7; SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 14;

SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 16; SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 18; SEQ ID NO: 20; SEQ ID NO: 21; SEQ ID NO: 22; SEQ ID NO: 23; SEQ ID NO: 24; SEQ ID NO: 25; SEQ ID NO: 26 ou SEQ ID NO: 27 ou compreendendo pelo menos 17, de preferência pelo menos 18, 19 e de preferência pelo menos 20 nucleobases contíguas de SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 7; SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 16; SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 18; SEQ ID NO: 20; SEQ ID NO: 21; SEQ ID NO: 22; SEQ ID NO: 23; SEQ ID NO: 24; SEQ ID NO: 25; SEQ ID NO: 26 ou SEQ ID NO: 27 com uma incompatibilidade e em que a incompatibilidade não é o primeiro ou o último nucleotídeo do trecho contíguo.

[0079] Também é fornecido um método para inibir a replicação de poliomavírus em uma célula, o método compreendendo fornecer uma célula que está infectada com o referido poliomavírus com o oligonucleotídeo antissentido. Também é fornecido um método de preparação de um enxerto para transplante, o método caracterizado por células doadoras, preferencialmente células renais doadoras, serem fornecidas com o oligonucleotídeo antissentido.

[0080] É fornecido ainda um método de tratamento de uma infecção por poliomavírus em um indivíduo, o método compreendendo a administração do oligonucleotídeo

antissentido, conforme descrito aqui, ao indivíduo em necessidade do mesmo. Esse indivíduo é um indivíduo imunocomprometido. O indivíduo é preferencialmente o receptor de um transplante de rim ou de células renais.

[0081] Também é fornecido um método de administração de um oligonucleotídeo antissentido a um indivíduo, para hibridização com uma sequência de RNA complementar em uma célula renal do referido indivíduo, o método caracterizado pelo fato de que o oligonucleotídeo antissentido é um oligonucleotídeo como aqui descrito.

[0082] É ainda fornecido um oligonucleotídeo antissentido compreendendo uma modificação que torna um duplex do oligonucleotídeo antissentido e o mRNA alvo resistente à ação de RNase, em que o oligonucleotídeo antissentido compreende a sequência de SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 7; SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 16; SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 18; SEQ ID NO: 20; SEQ ID NO: 21; SEQ ID NO: 22; SEQ ID NO: 23; SEQ ID NO: 24; SEQ ID NO: 25; SEQ ID NO: 26 ou SEQ ID NO: 27, com nenhuma, uma ou duas incompatibilidades.

[0083] Observou-se que os oligonucleotídeos como aqui descritos são eficientemente entregues e absorvidos pelas células renais relevantes quando administrados ao

animal. O método de administração é de preferência a administração IV. Para poliomavírus que podem atravessar a barreira hematoencefálica para o sistema nervoso central (SNC), como o vírus JC, é possível administrar um oligonucleotídeo antissentido ao SNC. Várias maneiras são conhecidas na técnica. Para o tratamento mediado por oligonucleotídeo antissentido de infecção por vírus JC do SNC a administração intratecal é preferida. A infecção pelo vírus JC também pode ser combatida por administração intravenosa, visto que a infecção inicial é considerada frequentemente através das amígdalas ou do trato gastrointestinal, após o que se espalha para outros órgãos, como, mas não se limitando a, células epiteliais tubulares nos rins, onde pode permanecer latente ou continuar a se reproduzir, liberando partículas de vírus na urina e no cérebro.

[0084] O oligonucleotídeo antissentido de preferência não tem uma sequência que consiste na sequência

5'-CACAAACCTCTGAGCTA;

5'-AACCUCUGAACUAUCCAUGU;

5'-ACCUCUGAACUAUCCAUGUA;

5'-TTCATCTGTTCCATAGGTTGGCACCTA; ou

5'-TTCCATAGGTTGGCACCTAAAAAAA, ou uma alternativa das mesmas, onde uma ou mais timidinas são uracilas e vice-versa.

[0085] Para fins de clareza e uma descrição concisa, os recursos são descritos aqui como parte das mesmas modalidades ou modalidades separadas, no entanto, será apreciado que o escopo da invenção pode incluir modalidades com combinações de todas ou algumas das características descritas.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0086] **Figura 1: Esquema do genoma viral BK e similaridade de sequência de vários subtipos do genoma do vírus BK.** *Esquerda:* O genoma do vírus BK codifica cinco proteínas primárias, a saber, antígenos T pequenos e T grandes (genes iniciais), bem como agnoproteína e as proteínas do capsídeo principais VP1, VP2 e VP3 (genes tardios). O genoma viral também contém uma região não codificante (NCCR) que contém a origem de replicação, bem como a região promotora para fatores de transcrição que conduzem a expressão dos genes iniciais e tardios, juntamente com a replicação do genoma viral. Digno de nota, o splicing alternativo de pré-mRNAs iniciais e tardios resulta em numerosas isoformas de proteínas, incluindo antígeno t pequeno, antígeno T truncado (2 íntrons) e antígeno T grande (1 íntron), juntamente com o splicing alternativo determinando a proporção de VP1, VP2 ou VP3 que é gerado. No entanto, é importante notar que a variante de splice primária gerada para a região tardia é o mRNA maduro

que codifica predominantemente VP1. *Continuação:* A sequência genômica da região inicial codifica as proteínas do antígeno T, a saber, t pequeno (tAg), T truncado (truncTAg) e antígeno T grande (TAg). O tAg desempenha um papel crítico na condução das células infectadas para a fase S, permitindo a replicação do genoma viral mediada pelo TAg. Além disso, TAg liga-se ao NCCR para conduzir a expressão do pré-mRNA da região tardia. Isso leva à produção de VP1, VP2 e VP3, que são essenciais para a encapsulação do DNA viral.

[0087] **Figura 2:** Sequências de genes inteiros de TAg, incluindo sequências de íntrons, foram alinhadas usando clustalW (pacote "msa" em R) para 245 isolados de poliomavírus BK únicos (baixados do banco de dados NCBI disponível publicamente). Destes registros, apenas os isolados relatando um genoma completo foram usados para a conservação dos sítios de splice em TAg. A cepa Dunlop foi usada como genoma de referência. Uma árvore filogenética foi construída usando o método UPGMA (pacotes "phangorn" e "ggtree" em R). Um logo de sequência foi construído para os locais de splice aceitador e doador para mostrar a conservação específica de nucleotídeos entre os subtipos (pacote "msa" em R).

[0088] **Figura 3: Composição de oligonucleotídeos antissentido para modular o splicing de TAg de BKPyV.**

Sequências de oligonucleotídeos antissentido (AONs) dirigidos para a junção do exon 1 - íntron (AONs #1, #2 e #3) e junção do íntron - exon 2 (AONs #4 e #5) de BKPyV TAg.

[0089] **Figura 4: AONs moduladores de splice de TAg reduzem os níveis de expressão de mRNAs TAg e VP1 em células epiteliais humanas infectadas com BKPyV.** *Esquerda:* Redução nos níveis de RNA de TAg em células HK2 tratadas com AON scramble versus células HK2 tratadas com AONs moduladores de splice #1, #2, #3, #4 e #5 em 7 dias após a infecção com o vírus BKPyV em uma multiplicidade de infecção de ~100 (n=5; p<0,05). *Direita:* Redução nos níveis de RNA de VP1 em células HK2 tratadas com AON scramble versus células HK2 tratadas com AONs moduladores de splice #1, #2, #3, #4 e #5 após infecção com vírus BKPyV em uma multiplicidade de infecção de ~100 (n=5; p <0,05).

[0090] **Figura 5: AONs moduladores de splice de TAg reduzem os níveis de expressão da proteína VP1 em células epiteliais humanas infectadas com BKPyV.** Análise de Western blot de lisados celulares de HK2 colhidos 7 dias após a infecção com poliomavírus BK em uma multiplicidade de infecção de ~100. Em comparação com as células HK2 tratadas com AON codificado, AON #2, #3 e #4 anulam claramente os níveis de expressão da proteína VP1 (n=4).

[0091] **Figura 6: AONs moduladores de splice de TAg reduzem a replicação do vírus BK.** As concentrações de DNA viral no sobrenadante da cultura foram determinadas pelo método de análise de PCR para VP1 no genoma de BKPyV. As células HK2 tratadas com AONs #2, #3 e #4 revelam consistentemente níveis reduzidos do genoma de BKPyV no sobrenadante da cultura, em comparação com aqueles tratados com o AON codificado.

[0092] **Figura 7: Modificações químicas para AONs.** Estão representadas algumas modificações químicas que foram aplicadas aos AONs moduladores de splice de TAg atuais (estrutura de fosforotioato e 2'-OMe na porção ribose). Outras modalidades desses AONs podem empregar modificações 2'-MOE ou 2'-cEt nesta posição. Essas modificações servem principalmente para melhorar a estabilidade do AON.

[0093] **Figura 8: Semelhança de sequência para os 13 poliomavírus conhecidos por terem hospedeiros humanos.** É importante notar que essas cepas cobrem os gêneros alfa, beta e delta, a maioria dos quais foi recentemente identificada. Como mostrado na informação da árvore filogenética no lado esquerdo da figura, BKPyV e JCPyV compartilham similaridade de sequência considerável, sugerindo que sua co-localização nas células epiteliais do

túbulo proximal do rim os permite direcionar com os AONs moduladores de splice descritos aqui.

[0094] **Figura 9: Projeto de AONs que podem ser empregados para direcionar outros poliomavírus.** Juntamente com os AONs moduladores de splice de TAg de vírus BK e JC acima mencionados, os AONs foram concebidos com base na possibilidade de também poderem ter como alvo o poliomavírus humano 3 (Karolinska Institute ou KI), poliomavírus humano 4 (Washington University ou WU) e poliomavírus humano 5 (Vírus Merkel Cell ou MCV). Para poliomavírus humanos 3-5, 2 AONs foram projetados visando a junção do exon 1 - íntron, e 2 para a junção íntron - exon 2, em oposição ao local 3 AONs no exon 1 - íntron.

[0095] **Figura 10: Esquema do genoma viral de BK e AONs de direcionamento de BKV.** *Parte 1:* O genoma do vírus BK codifica seis proteínas primárias, a saber, antígeno T pequeno e grande (genes iniciais), bem como agnoproteína e as proteínas do capsídeo principal VP1, VP2 e VP3 (genes tardios). O genoma viral também contém uma região não codificadora (NCCR), cuja sequência possui uma origem de replicação, bem como a região promotora que é responsável por recrutar fatores de transcrição que conduzem a expressão precoce e tardia do gene, enquanto também coordena a replicação do genoma viral. Conforme mostrado na Figura 1, o splicing alternativo de pré-mRNAs iniciais e

tardios resulta em numerosas isoformas de proteínas, incluindo antígeno t pequeno, antígeno T truncado (2 íntrons) e antígeno T grande (1 íntron), juntamente com o splicing alternativo determinando a proporção de VP1, VP2 ou VP3 gerado. A variante de splice primária gerada para a região tardia resulta predominantemente na expressão de VP1. *Parte 2:* Sequências AON usadas para direcionar a junção exon-íntron do antígeno T grande de BKV (TAg), conforme ilustrado no painel superior. *Parte 3:* Esquema representando locais de ligação para AONs na junção exon - íntron de BKV TAg.

[0096] **Figura 11: Análise bioinformática de conservação de sítio de splice de TAg para projeto de AONs de direcionamento de BKV universais.** *Parte 1:* Árvore filogenética contendo sequências completas do gene TAg para isolados/cepas únicas de BKV, mostrando distinções claras entre subgrupos de BKV. *Parte 2:* Logos de sequência para sítios de splice de TAg com regiões flanqueadoras (20 nucleotídeos) mostrando uma alta conservação de sequência entre subgrupos. Sequências de oligonucleotídeos antissentido (AONs) direcionados ao exon 1 - junção do íntron (HYB_01, HYB_02, HYB_03, HYB_06, HYB_07, HYB_08, HYB_09, HYB_10 e HYB_11) e íntron - junção do exon 2, HYB_12, HYB_04 de BKV TAg são fornecidos.

[0097] **Figura 12: AONs moduladores de splice de TAg reduzem os níveis de expressão de mRNAs de TAg em células epiteliais renais humanas infectadas com BKV.** Redução nos níveis de RNA de TAg em células HK2 tratadas com AON scramble versus células HK2 tratadas com AONs direcionados a BKV, após o que as células foram infectadas com BKV em uma multiplicidade de infecção de ~100 (n=3 réplicas biológicas). Nota: HYB_14 liga-se exclusivamente à região exônica do exon 1 de TAg e não tem como alvo um limite exon - intron.

[0098] **Figura 13: AONs moduladores de splice de TAg reduzem os níveis de expressão de mRNAs de VP1 em células epiteliais renais humanas infectadas com BKV.** Redução nos níveis de RNA de VP1 em células HK2 tratadas com AON scramble versus células HK2 tratadas com AONs direcionados a BKV, após o que as células foram infectadas com BKV em uma multiplicidade de infecção de ~100 (n=3 réplicas biológicas). Nota: HYB_14 liga-se exclusivamente à região exônica do exon 1 de TAg e não tem como alvo um limite exon - intron.

[0099] **Figura 14: AONs moduladores de splice de TAg reduzem os níveis de expressão da proteína VP1 em células epiteliais renais humanas infectadas com BKV.** Análise representativa de Western blot de lisados celulares colhidos de células HK2 tratadas com AON direcionadas a

BKV. O blot descreve os níveis de proteína VP1 de lisados colhidos 7 dias após a infecção com poliomavírus BK em uma multiplicidade de infecção de ~100 (n=3 réplicas biológicas).

[00100] **Figura 15: Quantificação dos níveis de expressão da proteína VP1 em células epiteliais renais humanas após tratamento com AONs direcionados a BKV e infectadas com BKV.** Quantificação da análise de Western blot de lisados celulares de HK2 colhidos 7 dias após a infecção com poliomavírus BK em uma multiplicidade de infecção de ~100. Células HK2 tratadas com Scramble AON foram usadas como um controle, e todos os valores estão na escala log2 (n=3 réplicas biológicas). Nota: HYB_14 liga-se exclusivamente à região exônica do exon 1 de TAg e não tem como alvo um limite exon - intron.

[00101] **Figura 16: AONs moduladores de splice de TAg reduzem a replicação de DNA de BKV.** As concentrações de partículas virais no sobrenadante da cultura aos 7 dias pós-infecção foram determinadas pelo método de análise de PCR para VP1 no genoma de BKV. As células HK2 tratadas com AONs de direcionamento de BKV revelam consistentemente níveis reduzidos de partículas de BKV no sobrenadante da cultura, em comparação com aqueles tratados com o AON codificado. Os dados representam um n=3 biológico.

[00102] **Figura 17: AONs moduladores de splice de TAg reduzem os níveis de reinfecção por HK2.** O sobrenadante da cultura foi removido aos 7 dias de células HK2 que haviam sido pré-tratadas com AONs direcionados a BKV e infectadas com BKV. O sobrenadante foi usado para infectar células HK2 não tratadas (2h) após o qual as células foram cultivadas por 7 dias e coradas imunohistoquimicamente para TAg e hoechst (para núcleos). Subsequentemente, a percentagem de células positivas foi determinada e representada em relação às células tratadas com AON codificado. Os dados são representativos de n=3 biológico.

[00103] **Figura 18: Mapa de calor que descreve os efeitos cumulativos do tratamento AON de direcionamento de BKV em vários aspectos da infecção por BKV de células HK2.** Resumo dos efeitos observados no mRNA de TAg e VP1, proteína VP1, produção de partículas virais e reinfecção. A escala indica que o preto representa pouco ou nenhum efeito, enquanto o branco indica grande efeito (alteração de 2log dobra em comparação com scrambled, n=3).

[00104] **Figura 19: AONs principais moduladores de splice de TAg reduzem os níveis de expressão de mRNAs de TAg em células epiteliais renais humanas infectadas com BKV.** Redução nos níveis de RNA de TAg em células HK2 tratadas com AON scramble versus células HK2 tratadas com AONs principais de direcionamento de BKV (HYB_01, HYB_03 ou

HYB_11), após o que as células foram infectadas com BKV em uma multiplicidade de infecção de ~100 (n=3 réplicas biológicas). Nota: SAN_73 e SAN_74 são AONs descritos anteriormente (16 nucleotídeos de comprimento). Esses dados são representativos de um n=3 biológico.

[00105] **Figura 20: AONs condutores moduladores de splice de TAg reduzem os níveis de expressão de mRNAs de VP1 em células epiteliais renais humanas infectadas com BKV.** Redução nos níveis de mRNA de VP1 em células HK2 tratadas com AON scramble versus células HK2 tratadas com AONs principais de direcionamento de BKV (HYB_01, HYB_03 ou HYB_11), após o qual as células foram infectadas com BKV em uma multiplicidade de infecção de ~100. Nota: SAN_73 e SAN_74 são AONs descritos anteriormente (16 nucleotídeos de comprimento). Esses dados são representativos de um n=3 biológico.

[00106] **Figura 21: AONs principais moduladores de splice de TAg reduzem os níveis de expressão da proteína VP1 em células epiteliais renais humanas infectadas com BKV.** Visualização representativa de Western blot dos níveis de proteína VP1 em lisados celulares colhidos de células HK2 tratadas com AONs de composto principal de direcionamento de BKV e 7 dias após a infecção com poliomavírus BK em uma multiplicidade de infecção de ~100 (n=3 réplicas biológicas).

[00107] **Figura 22: Os AONs principais moduladores de splice de TAg reduzem os níveis de expressão da proteína VP1 em células epiteliais renais humanas infectadas com BKV.** Redução nos níveis de proteína VP1 em células HK2 tratadas com AON scramble versus células HK2 tratadas com AONs principais de direcionamento de BKV (HYB_01, HYB_03 ou HYB_11), após o que as células foram infectadas com BKV em uma multiplicidade de infecção de ~100. Nota: SAN_73 e SAN_74 são AONs descritos anteriormente (16 nucleotídeos de comprimento). Esses dados são representativos de um n=3 biológico.

[00108] **Figura 23: AONs condutores moduladores de splice de TAg reduzem a produção de partículas virais em células epiteliais renais humanas infectadas com BKV.** Redução nos níveis de partículas virais em células HK2 tratadas com AON scramble versus células HK2 tratadas com AONs principais de direcionamento de BKV (HYB_01, HYB_03 ou HYB_11), após o que as células foram infectadas com BKV em uma multiplicidade de infecção de ~100. Nota: SAN_73 e SAN_74 são AONs descritos anteriormente (16 nucleotídeos de comprimento). Esses dados são representativos de um n=3 biológico.

[00109] **Figura 24: AONs condutores moduladores de splice de TAg reduzem os níveis de reinfecção por HK2.** O sobrenadante da cultura foi removido em 7 dias de células

HK2 que haviam sido pré-tratadas com AONs principais de direcionamento de BKV (HYB_01, HYB_03 ou HYB_11) e infectadas com BKV. O sobrenadante foi usado para infectar células HK2 não tratadas (2h), após o que as células foram cultivadas por 7 dias e coradas imunohistoquimicamente para TAg e Hoechst (para núcleos). Subsequentemente, a percentagem de células positivas foi determinada e representada em relação às células tratadas com AON codificado. Os dados são representativos de n=3 biológico.

[00110] **Figura 25: Mapa de calor que descreve os efeitos cumulativos do tratamento com composto principal AON direcionado a BKV em vários aspectos da infecção por BKV de células HK2.** Resumo dos efeitos observados em TAg e VP1 mRNA, proteína VP1, produção de partícula viral e reinfeção para células HK2 pré-tratadas com nossos compostos principais AONs (HYB_01, HYB_03 ou HYB_11). A escala indica que o preto representa pouco ou nenhum efeito, enquanto o branco indica grande efeito (alteração de 2log dobra em comparação com scrambled, n=3).

[00111] **Figura 26: Eficácia de AON moduladora de splice de TAg para reduzir a expressão de mRNA de TAg em HK2 pré-infectado com BKV.** Ao contrário do tratamento pré-AON, primeiro infectamos células HK2 com BKV e, subsequentemente, avaliamos a eficácia com a qual os AONs poderiam reduzir os níveis de expressão de mRNA de TAg.

Painel esquerdo: a dosagem única de AONs pós-infecção reduziu significativamente os níveis de expressão de mRNA de TAg, embora a adição de AON em momentos posteriores pareça menos eficaz. Painel direito: doses múltiplas de AON direcionado a BKV reduzem mais potentemente os níveis de expressão de mRNA de TAg. É de notar que os níveis de expressão de RNA para todos os pontos de tempo de tratamento foram determinados em t=7 após a infecção, resultando em exposições mais curtas ao tratamento para pontos de tempo posteriores em comparação com o tratamento inicial. Os dados são representativos de n=1 biológico.

[00112] **Figura 27: Eficácia do AON modulador de splice de TAg para reduzir a expressão de mRNA de VP1 em HK2 pré-infectado com BKV.** Ao contrário do tratamento pré-AON, primeiro infectamos células HK2 com BKV e, subsequentemente, avaliamos a eficácia com a qual os AONs poderiam reduzir os níveis de expressão de mRNA de VP1. Painel esquerdo: a dosagem única de AONs pós-infecção reduziu significativamente os níveis de expressão de mRNA de VP1, embora a adição de AON em momentos posteriores pareça menos eficaz. Painel direito: doses múltiplas de AON direcionado a BKV reduzem mais potentemente os níveis de expressão de mRNA de VP1. É de notar que os níveis de expressão de RNA para todos os pontos de tempo de tratamento foram determinados em t=7 após a infecção,

resultando em exposições mais curtas ao tratamento para pontos de tempo posteriores em comparação com o tratamento inicial. Os dados são representativos de n=1 biológico.

[00113] **Figura 28: AONs condutores moduladores de splice de TAg reduzem os níveis de expressão de mRNAs de TAg em células epiteliais do túbulo proximal humano infectadas com BKV (hPTECs).** Redução nos níveis de RNA de TAg em hPTECs tratados com AON scramble versus hPTECs tratados com AONs principais de direcionamento de BKV (HYB_01, HYB_03 ou HYB_11) ou HYB_14, após o qual as células foram infectadas com BKV em uma multiplicidade de infecção de ~100 (n=3 réplicas biológicas). Esses dados são representativos de um n=3 biológico.

[00114] **Figura 29: AONs condutores moduladores de splice de TAg reduzem os níveis de expressão de mRNAs de VP1 em hPTECs infectados com BKV.** Redução nos níveis de RNA de VP1 em hPTECs tratados com AON scramble versus hPTECs tratados com AONs principais de direcionamento de BKV (HYB_01, HYB_03 ou HYB_11) ou HYB_14, após o qual as células foram infectadas com BKV em uma multiplicidade de infecção de ~100 (n=3 réplicas biológicas). Esses dados são representativos de um n=3 biológico.

[00115] **Figura 30: AONs condutores moduladores de splice de TAg reduzem os níveis de expressão das proteínas VP1 e VP3 em hPTECs infectados com BKV.** Visualização

representativa de Western blot dos níveis de proteína VP1 e VP3 em lisados celulares colhidos de hPTECs tratados com AONs do composto principal de direcionamento de BKV e 7 dias após a infecção com poliomavírus BK em uma multiplicidade de infecção de ~100 (VP1 e GAPDH: n=3 réplicas biológicas, VP3: n=1).

[00116] **Figura 31: AONs principais moduladores de splice de TAg reduzem os níveis de expressão de proteínas VP1 em hPTECs infectados com BKV.** Redução nos níveis de proteína VP1 em hPTECs tratados com AON scramble versus hPTECs tratados com AONs principais de direcionamento de BKV (HYB_01, HYB_03 ou HYB_11) ou HYB_14, após o qual as células foram infectadas com BKV em uma multiplicidade de infecção de ~100 (n=3 réplicas biológicas). Esses dados são representativos de um n=3 biológico.

[00117] **Figura 32: AONs condutores moduladores de splice de TAg reduzem os níveis de expressão de proteínas VP3 em hPTECs infectados com BKV.** Redução nos níveis de proteína VP3 em hPTECs tratados com AON scramble versus hPTECs tratados com AONs principais de direcionamento de BKV (HYB_01, HYB_03 ou HYB_11) ou HYB_14, após o qual as células foram infectadas com BKV em uma multiplicidade de infecção de ~100 (n=3 réplicas biológicas). Esses dados são representativos de um n=1 biológico.

[00118] **Figura 33: AONs condutores moduladores de splice de TAg reduzem a produção de partículas virais em hPTECs infectados com BKV.** Redução nos níveis de partículas virais em hPTECs tratados com AON scramble versus hPTECs tratados com AONs principais de direcionamento de BKV (HYB_01, HYB_03 ou HYB_11) ou HYB_14, após o qual as células foram infectadas com BKV em uma multiplicidade de infecção de ~100. Esses dados são representativos de um n=3 biológico.

[00119] **Figura 34: Mapa de calor que descreve os efeitos cumulativos do tratamento com composto principal AON direcionado a BKV em vários aspectos da infecção por BKV de hPTECs.** Resumo dos efeitos observados em TAg e VP1 mRNA, proteína VP1 e produção de partículas virais para hPTECs pré-tratados com nosso composto principal AONs (HYB_01, HYB_03 ou HYB_11) ou HYB_14. A escala indica que o preto representa pouco ou nenhum efeito, enquanto o branco indica grande efeito (alteração de 2log dobra em comparação com scrambled, n=3).

[00120] **Figura 35: Análise de RNA-seq de modulação de splicing induzido por AONs direcionados a BKV.** Transcrições primárias e eventos de splicing são representados na parte superior do painel, enquanto na parte inferior do painel os padrões de splicing e pontuações z observados são apresentados, indicando que

nossos AONs de segmentação BKV de fato modulam o splicing. Os eventos são observados no exon 1 - sítio intrônico, bem como na região 3' do exon 2. Coletivamente, a presença de um único AON que parece impactar os efeitos proximal e distal no splicing é indicativa de um evento de splicing complexo.

[00121] **Figura 36: Análise de leitura de sequência longa de modulação de splicing induzida por AONs do composto principal de direcionamento de BKV.** Análise de leitura de sequência longa de transcritos de RNA de células HK2 pré-tratadas com AON codificado ou nossos compostos principais AONs (HYB_01, HYB_03 ou HYB_11). *Esquerda:* Os gráficos de barras representam a porcentagem de transcritos utilizando o local doador T Grande ou t pequeno em combinação com um local aceitador fixo (íntron - exon 2) ou transcrito não dividido, indicativo de modulação de splicing por AONs direcionados a BKV. *Direita:* os gráficos de barras representam a porcentagem de transcritos utilizando o local aceitador T truncado ou T* truncado em combinação com um local doador fixo, indicativo de modulação de splicing por AONs direcionados a BKV.

[00122] **Figura 37: Esquema do genoma viral de JC e AONs de direcionamento de JCV.** *Parte 1:* Semelhante ao vírus BK, o genoma do vírus JC codifica o antígeno T pequeno e grande (genes iniciais), bem como a agnoproteína e as

proteínas do capsídeo principal VP1, VP2 e VP3 (genes tardios). O genoma viral também contém uma região não codificante (NCCR) com uma origem de replicação e região promotora para a ligação do fator de transcrição que direciona a expressão dos genes iniciais e tardios e a replicação do genoma viral. Em contraste com o amplo conhecimento sobre o splicing de BKV de pré-mRNAs da região inicial e tardia, menos se sabe sobre o splicing de JCV.

Parte 2: Sequências AON usadas para direcionar a junção exon-intron do antígeno T grande de JCV (TAg), conforme ilustrado no painel superior. *Parte 3:* Esquema representando locais de ligação para AONs na junção exon - intron de JCV TAg.

[00123] **Figura 38: AONs moduladores de splice de TAg reduzem os níveis de expressão de mRNAs de TAg em células-tronco pluripotentes induzidas humanas derivadas de astrócitos infectados com JCV.** Redução nos níveis de mRNA de TAg em astrócitos derivados de hiPSC tratados com AON scramble versus astrócitos derivados de hiPSC tratados com AONs de direcionamento de JCV, após o que as células foram infectadas com JCV (n=1).

[00124] **Figura 39: AONs moduladores de splice de TAg reduzem os níveis de expressão de mRNAs de VP1 em células-tronco pluripotentes induzidas humanas derivadas de astrócitos infectados com JCV.** Redução nos níveis de mRNA

de VP1 em astrócitos derivados de hiPSC tratados com AON scramble versus astrócitos derivados de hiPSC tratados com AONs de direcionamento de JCV, após o que as células foram infectadas com JCV (n=1).

[00125] **Figura 40: AONs moduladores de splice de TAg reduzem os níveis de expressão de mRNAs de TAg em astrócitos humanos primários infectados com JCV.** Redução nos níveis de mRNA de TAg em astrócitos primários tratados com AON scramble versus astrócitos primários tratados com AONs direcionados a JCV, após o qual as células foram infectadas com JCV (n=2 réplicas biológicas).

[00126] **Figura 41: AONs moduladores de splice de TAg reduzem os níveis de expressão de mRNAs de VP1 em astrócitos humanos primários infectados com JCV.** Redução nos níveis de mRNA de VP1 em astrócitos primários tratados com AON scramble versus aqueles tratados com AONs direcionados a JCV, após o que as células foram infectadas com JCV (n=2 réplicas biológicas).

[00127] **Figura 42: Cobertura do genoma de BKV por RNAs amplificados durante RNA-seq.** O alinhamento de leituras de extremidades emparelhadas com o genoma de BKV do controle codificado, HYB_01, HYB_03, HYB_11, HYB_14 ou SAN_73 e células tratadas com SAN_74 permite a avaliação semiquantitativa dos níveis de expressão de RNA de BKV. Os

dados são indicativos de um n=3 biológico e foram separados em perfis de expressão gênica de fase inicial e tardia.

[00128] **Figura 43: Análise eletroforética de (pré-)mRNAs de TAg gerados por polimerase de Phusion de alta fidelidade de leitura longa.** A polimerase de fusão foi usada para gerar mRNAs de alta fidelidade de leitura longa a partir de RNA colhido de células HK2 tratadas com AON de controle de scramble (pista 1) ou AONs direcionados a BKV (nomeadamente HYB_01, HYB_03 ou HYB_11; pistas 2-4, respectivamente) e avaliados por eletroforese capilar. Os dados são representativos de um n=3 biológico.

[00129] **Figura 44: Microscopia de fluorescência da captação de AON em rins de camundongo 24 horas após a administração intravenosa.** Imagens de alta ampliação separadas por cor de seções de rim de camundongo 24 horas após a administração intravenosa de 40 mg/kg de HYB_01 (2'MOE sem rótulo 5'6-FAM) em camundongos C57BL/6J. Os núcleos são corados com Hoechst, a captação de células epiteliais do túbulo proximal é evidente com base na co-localização com células positivas de lectina de tetragonolobus de lótus (LTL) do rim (túbulos proximais). Os painéis da esquerda representam uma ampliação de 100x (objetiva de 10x, barra de escala = 100 µm), enquanto os painéis da direita são ampliados de 400x (objetiva de 40x, barra de escala = 20 µm).

[00130] **Figura 45: Coloração imunohistoquímica de tecidos de camundongo para absorção de AON direcionada a BKV.** Os órgãos foram excisados 24 horas após a administração intravenosa de 40 mg/kg de HYB_01 (2'MOE sem rótulo 5'6-FAM) em camundongos C57BL/6J e a captação de AON avaliada imuno-histoquimicamente. A coloração com hematoxilina e eosina (H&E) precedeu a detecção específica da estrutura AON com anticorpo anti-fosforotioato e diaminobenzidina (DAB) como substrato de peroxidase para revelar o anticorpo secundário marcado com HRP. O sinal positivo para a coloração de AON foi visualizado por deconvolução de cor e limiar em ImageJ, indicando túbulos positivos com altos níveis de captação de AON, com sinal acentuadamente reduzido no fígado e ausência deste no tecido cardíaco.

EXEMPLOS

EXEMPLO 1

Material e Métodos

Acessos usados para análise filogenética

[00131] Sequências genômicas completas de isolados de poliomavírus BK foram baixadas do banco de dados NCBI disponível ao público. Destes registros, apenas os isolados relatando um genoma completo foram usados para a conservação dos sítios de splice em TAg. A cepa Dunlop foi usada como genoma de referência. Os isolados "MM" e "FNL-9"

foram removidos devido a uma grande deleção no íntron ou duplicação sobreposta ao local de splice do aceitador, respectivamente. Os números de acesso das 245 sequências genômicas únicas são fornecidos abaixo:

AB211369.1; AB211370.1; AB211371.1; AB211372.1; AB211373.1;
AB211374.1; AB211375.1; AB211376.1; AB211377.1; AB211378.1;
AB211379.1; AB211381.1; AB211382.1; AB211383.1; AB211384.1;
AB211385.1; AB211386.1; AB211387.1; AB211388.1; AB211389.1;
AB211390.1; AB211391.1; AB213487.1; AB217917.1; AB217918.1;
AB217919.1; AB217920.1; AB217921.1; AB260028.1; AB260029.1;
AB260030.1; AB260031.1; AB260032.1; AB260033.1; AB263912.1;
AB263913.1; AB263914.1; AB263915.1; AB263916.1; AB263917.1;
AB263918.1; AB263919.1; AB263920.1; AB263921.1; AB263922.1;
AB263923.1; AB263924.1; AB263925.1; AB263926.1; AB263927.1;
AB263928.1; AB263929.1; AB263930.1; AB263931.1; AB263932.1;
AB263934.1; AB263935.1; AB263936.1; AB263938.1; AB269825.1;
AB269826.1; AB269827.1; AB269828.1; AB269829.1; AB269830.1;
AB269831.1; AB269832.1; AB269834.1; AB269836.1; AB269837.1;
AB269838.1; AB269840.1; AB269841.1; AB269842.1; AB269843.1;
AB269844.1; AB269845.1; AB269846.1; AB269847.1; AB269848.1;
AB269849.1; AB269850.1; AB269851.1; AB269852.1; AB269853.1;
AB269854.1; AB269855.1; AB269856.1; AB269857.1; AB269858.1;
AB269859.1; AB269860.1; AB269861.1; AB269862.1; AB269863.1;
AB269864.1; AB269865.1; AB269866.1; AB269867.1; AB269868.1;
AB269869.1; AB298941.1; AB298942.1; AB298945.1; AB298946.1;

AB298947.1; AB301086.1; AB301087.1; AB301089.1; AB301090.1;
AB301091.1; AB301092.1; AB301093.1; AB301094.1; AB301095.1;
AB301096.1; AB301097.1; AB301099.1; AB301100.1; AB301101.1;
AB365130.1; AB365132.1; AB365133.1; AB365134.1; AB365136.1;
AB365137.1; AB365138.1; AB365139.1; AB365140.1; AB365141.1;
AB365142.1; AB365144.1; AB365145.1; AB365146.1; AB365148.1;
AB365149.1; AB365150.1; AB365151.1; AB365153.1; AB365154.1;
AB365156.1; AB365157.1; AB365158.1; AB365159.1; AB365160.1;
AB365162.1; AB365164.1; AB365165.1; AB365166.1; AB365167.1;
AB365168.1; AB365170.1; AB365173.1; AB365174.1; AB365175.1;
AB365176.1; AB365178.1; AB369087.1; AB369088.1; AB369089.1;
AB369090.1; AB369092.1; AB369093.1; AB369094.1; AB369095.1;
AB369096.1; AB369097.1; AB369098.1; AB369099.1; AB369101.1;
AB464953.1; AB464954.1; AB464956.1; AB464957.1; AB464958.1;
AB464960.1; AB464961.1; AB464962.1; AB485695.1; AB485696.1;
AB485697.1; AB485698.1; AB485699.1; AB485700.1; AB485701.1;
AB485703.1; AB485704.1; AB485707.1; AB485709.1; AB485710.1;
AB485711.1; AB485712.1; AY628224.1; AY628225.1; AY628226.1;
AY628227.1; AY628228.1; AY628229.1; AY628230.1; AY628231.1;
AY628232.1; AY628233.1; AY628234.1; AY628235.1; AY628236.1;
AY628237.1; AY628238.1; DQ305492.1; EF376992.1; FR720308.1;
FR720309.1; FR720310.1; FR720311.1; FR720312.1; FR720313.1;
FR720315.1; FR720317.1; FR720318.1; FR720320.1; FR720321.1;
JF894228.1; JN192431.1; JN192432.1; JN192433.1; JN192435.1;
JN192437.1; JN192438.1; JN192439.1; JN192440.1; JQ713822.1;

KF055891.1; KF055892.1; KF055893.1; KP412983.1; KP984526.1; KY114802.1; KY114803.1; KY132094.1; KY487998.1; LC029413.1; LC309239.1; LC309240.1; LT960370.1; M23122.1; V01108.1.

[00132] Da mesma forma, sequências genômicas completas foram baixadas para os 13 diferentes protótipos de poliomavírus humanos. Os números de acesso são descritos abaixo:

NC_001538; NC_001699; NC_009238; NC_009539; NC_010277; NC_014406; NC_014407; NC_014361; NC_015150; NC_018102; NC_020106; NC_020890; NC_024118.

Conservação de locais de splice do antígeno T grande

[00133] Sequências de nucleotídeos do genoma completo de todos os poliomavírus humanos de referência foram baixadas do site do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore>) em 20 de fevereiro de 2018 e alinhadas com WebPrank (disponível online: <https://www.ebi.ac.uk/goldman-srv/webprank/>) usando as configurações padrão. Uma árvore UPGMA filogenética foi construída e logos de sequência para cada local de splice foram criados para mostrar a conservação entre diferentes poliomavírus humanos. Todos os números de acesso refseq baixados são descritos abaixo.

[00134] **Sequências de referência:** NC_001538, NC_001699, NC_009238, NC_009539, NC_010277, NC_014406,

NC_014407, NC_014361, NC_015150, NC_018102, NC_020106,
NC_020890, NC_024118

[00135] Sequências de nucleotídeos do genoma completo para todos os isolados de poliomavírus humanos foram baixadas do site do NCBI em 20 de fevereiro de 2018. Sequências de genes inteiras do antígeno T Grande foram recuperadas apenas das sequências genômicas únicas e alinhadas com WebPrank usando configurações padrão. Logos de sequência foram criados para cada local de splice do antígeno T grande para mostrar a conservação dentro e entre diferentes poliomavírus humanos.

[00136] Todos os números de acesso baixados são descritos abaixo:

BKPyV: AB211369.1, AB211370.1, AB211371.1, AB211372.1,
AB211373.1, AB211374.1, AB211375.1, AB211376.1, AB211377.1,
AB211378.1, AB211379.1, AB211380.1, AB211381.1, AB211382.1,
AB211383.1, AB211384.1, AB211385.1, AB211386.1, AB211387.1,
AB211388.1, AB211389.1, AB211390.1, AB211391.1, AB213487.1,
AB217917.1, AB217918.1, AB217919.1, AB217920.1, AB217921.1,
AB260028.1, AB260029.1, AB260030.1, AB260031.1, AB260032.1,
AB260033.1, AB260034.1, AB263912.1, AB263913.1, AB263914.1,
AB263915.1, AB263916.1, AB263917.1, AB263918.1, AB263919.1,
AB263920.1, AB263921.1, AB263922.1, AB263923.1, AB263924.1,
AB263925.1, AB263926.1, AB263927.1, AB263928.1, AB263929.1,
AB263930.1, AB263931.1, AB263932.1, AB263933.1, AB263934.1,

AB263935.1, AB263936.1, AB263937.1, AB263938.1, AB269822.1,
AB269823.1, AB269824.1, AB269825.1, AB269826.1, AB269827.1,
AB269828.1, AB269829.1, AB269830.1, AB269831.1, AB269832.1,
AB269833.1, AB269834.1, AB269835.1, AB269836.1, AB269837.1,
AB269838.1, AB269839.1, AB269840.1, AB269841.1, AB269842.1,
AB269843.1, AB269844.1, AB269845.1, AB269846.1, AB269847.1,
AB269848.1, AB269849.1, AB269850.1, AB269851.1, AB269852.1,
AB269853.1, AB269854.1, AB269855.1, AB269856.1, AB269857.1,
AB269858.1, AB269859.1, AB269860.1, AB269861.1, AB269862.1,
AB269863.1, AB269864.1, AB269865.1, AB269866.1, AB269867.1,
AB269868.1, AB269869.1, AB298940.1, AB298941.1, AB298942.1,
AB298943.1, AB298944.1, AB298945.1, AB298946.1, AB298947.1,
AB301086.1, AB301087.1, AB301088.1, AB301089.1, AB301090.1,
AB301091.1, AB301092.1, AB301093.1, AB301094.1, AB301095.1,
AB301096.1, AB301097.1, AB301098.1, AB301099.1, AB301100.1,
AB301101.1, AB301102.1, AB301103.1, AB365130.1, AB365131.1,
AB365132.1, AB365133.1, AB365134.1, AB365135.1, AB365136.1,
AB365137.1, AB365138.1, AB365139.1, AB365140.1, AB365141.1,
AB365142.1, AB365143.1, AB365144.1, AB365145.1, AB365146.1,
AB365147.1, AB365148.1, AB365149.1, AB365150.1, AB365151.1,
AB365152.1, AB365153.1, AB365154.1, AB365155.1, AB365156.1,
AB365157.1, AB365158.1, AB365159.1, AB365160.1, AB365161.1,
AB365162.1, AB365163.1, AB365164.1, AB365165.1, AB365166.1,
AB365167.1, AB365168.1, AB365169.1, AB365170.1, AB365171.1,
AB365172.1, AB365173.1, AB365174.1, AB365175.1, AB365176.1,

AB365177.1, AB365178.1, AB369087.1, AB369088.1, AB369089.1,
AB369090.1, AB369091.1, AB369092.1, AB369093.1, AB369094.1,
AB369095.1, AB369096.1, AB369097.1, AB369098.1, AB369099.1,
AB369100.1, AB369101.1, AB464953.1, AB464954.1, AB464955.1,
AB464956.1, AB464957.1, AB464958.1, AB464959.1, AB464960.1,
AB464961.1, AB464962.1, AB464963.1, AB485694.1, AB485695.1,
AB485696.1, AB485697.1, AB485698.1, AB485699.1, AB485700.1,
AB485701.1, AB485702.1, AB485703.1, AB485704.1, AB485705.1,
AB485706.1, AB485707.1, AB485708.1, AB485709.1, AB485710.1,
AB485711.1, AB485712.1, AY628224.1, AY628225.1, AY628226.1,
AY628227.1, AY628228.1, AY628229.1, AY628230.1, AY628231.1,
AY628232.1, AY628233.1, AY628234.1, AY628235.1, AY628236.1,
AY628237.1, AY628238.1, DQ305492.1, EF376992.1, FR720308.1,
FR720309.1, FR720310.1, FR720311.1, FR720312.1, FR720313.1,
FR720314.1, FR720315.1, FR720316.1, FR720317.1, FR720318.1,
FR720319.1, FR720320.1, FR720321.1, FR720322.1, FR720323.1,
JF894228.1, JN192431.1, JN192432.1, JN192433.1, JN192434.1,
JN192435.1, JN192436.1, JN192437.1, JN192438.1, JN192439.1,
JN192440.1, JN192441.1, JQ713822.1, KF055891.1, KF055892.1,
KF055893.1, KP412983.1, KP984526.1, KY114802.1, KY114803.1,
KY132094.1, KY487998.1, LC029411.1, LC029412.1, LC029413.1,
LC029414.1, LC309239.1, LC309240.1, LT934539.1, LT960370.1,
M23122.1, MF627830.1, MF627831.1, V01108.1, V01109.1

JCPyV: AB038249.1, AB038250.1, AB038251.1, AB038252.1,
AB038253.1, AB038254.1, AB038255.1, AB048545.1, AB048546.1,

AB048547.1, AB048548.1, AB048549.1, AB048550.1, AB048551.1,
AB048552.1, AB048553.1, AB048554.1, AB048555.1, AB048556.1,
AB048557.1, AB048558.1, AB048559.1, AB048560.1, AB048561.1,
AB048562.1, AB048563.1, AB048564.1, AB048565.1, AB048566.1,
AB048567.1, AB048568.1, AB048569.1, AB048570.1, AB048571.1,
AB048572.1, AB048573.1, AB048574.1, AB048575.1, AB048576.1,
AB048577.1, AB048578.1, AB048579.1, AB048580.1, AB048581.1,
AB048582.1, AB074575.1, AB074576.1, AB074577.1, AB074578.1,
AB074579.1, AB074580.1, AB074581.1, AB074582.1, AB074583.1,
AB074584.1, AB074585.1, AB074586.1, AB074587.1, AB074588.1,
AB074589.1, AB074590.1, AB074591.1, AB077855.1, AB077856.1,
AB077857.1, AB077858.1, AB077859.1, AB077860.1, AB077861.1,
AB077862.1, AB077863.1, AB077864.1, AB077865.1, AB077866.1,
AB077867.1, AB077868.1, AB077869.1, AB077870.1, AB077871.1,
AB077872.1, AB077873.1, AB077874.1, AB077875.1, AB077876.1,
AB077877.1, AB077878.1, AB077879.1, AB081005.1, AB081006.1,
AB081007.1, AB081008.1, AB081009.1, AB081010.1, AB081011.1,
AB081012.1, AB081013.1, AB081014.1, AB081015.1, AB081016.1,
AB081017.1, AB081018.1, AB081019.1, AB081020.1, AB081021.1,
AB081022.1, AB081023.1, AB081024.1, AB081025.1, AB081026.1,
AB081027.1, AB081028.1, AB081029.1, AB081030.1, AB081600.1,
AB081601.1, AB081602.1, AB081603.1, AB081604.1, AB081605.1,
AB081606.1, AB081607.1, AB081608.1, AB081609.1, AB081610.1,
AB081611.1, AB081612.1, AB081613.1, AB081614.1, AB081615.1,
AB081616.1, AB081617.1, AB081618.1, AB081654.1, AB092578.1,

AB092579.1, AB092580.1, AB092581.1, AB092582.1, AB092583.1,
AB092584.1, AB092585.1, AB092586.1, AB092587.1, AB103387.1,
AB103402.1, AB103403.1, AB103404.1, AB103405.1, AB103406.1,
AB103407.1, AB103408.1, AB103409.1, AB103410.1, AB103411.1,
AB103412.1, AB103413.1, AB103414.1, AB103415.1, AB103416.1,
AB103417.1, AB103418.1, AB103419.1, AB103420.1, AB103421.1,
AB103422.1, AB103423.1, AB104487.1, AB113118.1, AB113119.1,
AB113120.1, AB113121.1, AB113122.1, AB113123.1, AB113124.1,
AB113125.1, AB113126.1, AB113127.1, AB113128.1, AB113129.1,
AB113130.1, AB113131.1, AB113132.1, AB113133.1, AB113134.1,
AB113135.1, AB113136.1, AB113137.1, AB113138.1, AB113139.1,
AB113140.1, AB113141.1, AB113142.1, AB113143.1, AB113144.1,
AB113145.1, AB113216.1, AB113217.1, AB118231.1, AB118232.1,
AB118233.1, AB118234.1, AB118235.1, AB118651.1, AB118652.1,
AB118653.1, AB118654.1, AB118655.1, AB118656.1, AB118657.1,
AB118658.1, AB118659.1, AB126981.1, AB126982.1, AB126983.1,
AB126984.1, AB126985.1, AB126986.1, AB126987.1, AB126988.1,
AB126989.1, AB126990.1, AB126991.1, AB126992.1, AB126993.1,
AB126994.1, AB126995.1, AB126996.1, AB126997.1, AB126998.1,
AB126999.1, AB127000.1, AB127001.1, AB127002.1, AB127003.1,
AB127004.1, AB127005.1, AB127006.1, AB127007.1, AB127008.1,
AB127009.1, AB127010.1, AB127011.1, AB127012.1, AB127013.1,
AB127014.1, AB127015.1, AB127016.1, AB127017.1, AB127018.1,
AB127019.1, AB127020.1, AB127021.1, AB127022.1, AB127023.1,
AB127024.1, AB127025.1, AB127026.1, AB127027.1, AB127342.1,

AB127343.2, AB127344.1, AB127345.2, AB127346.1, AB127347.1,
AB127348.1, AB127349.1, AB127350.2, AB127351.2, AB127352.1,
AB127353.1, AB183152.1, AB195639.1, AB195640.1, AB198940.1,
AB198941.1, AB198942.1, AB198943.1, AB198944.1, AB198945.1,
AB198946.1, AB198947.1, AB198948.1, AB198949.1, AB198950.1,
AB198951.1, AB198952.1, AB198953.1, AB198954.1, AB220939.1,
AB220940.1, AB220941.1, AB220942.1, AB220943.1, AB262396.1,
AB262397.1, AB262398.1, AB262399.1, AB262400.1, AB262401.1,
AB262402.1, AB262403.1, AB262404.1, AB262405.1, AB262406.1,
AB262407.1, AB262408.1, AB262409.1, AB262410.1, AB262411.1,
AB262412.1, AB262413.1, AB362351.1, AB362352.1, AB362353.1,
AB362354.1, AB362355.1, AB362356.1, AB362357.1, AB362358.1,
AB362359.1, AB362360.1, AB362361.1, AB362362.1, AB362363.1,
AB362364.1, AB362365.1, AB362366.1, AB372036.1, AB372037.1,
AB372038.1, AF030085.1, AF295731.1, AF295732.1, AF300945.1,
AF300946.1, AF300947.1, AF300948.1, AF300949.1, AF300950.1,
AF300951.1, AF300952.1, AF300953.1, AF300954.1, AF300955.1,
AF300956.1, AF300957.1, AF300958.1, AF300959.1, AF300960.1,
AF300961.1, AF300962.1, AF300963.1, AF300964.1, AF300965.1,
AF300966.1, AF300967.1, AF363830.1, AF363831.1, AF363832.1,
AF363833.1, AF363834.1, AY121907.1, AY121908.1, AY121909.1,
AY121910.1, AY121911.1, AY121912.1, AY121913.1, AY121914.1,
AY121915.1, AY328376.1, AY342299.1, AY349147.1, AY356539.1,
AY364314.1, AY366359.1, AY373463.1, AY376828.1, AY376829.1,
AY376830.1, AY376831.1, AY378084.1, AY378085.1, AY378086.1,

AY378087.1, AY382184.1, AY382185.1, AY382186.1, AY382187.1,
AY382188.1, AY386373.1, AY386374.1, AY386375.1, AY386376.1,
AY386377.1, AY386378.1, AY536239.1, AY536240.1, AY536241.1,
AY536242.1, AY536243.1, DQ875211.1, DQ875212.1, EU835194.1,
JF424834.1, JF424835.1, JF424836.1, JF424837.1, JF424838.1,
JF424839.1, JF424840.1, JF424841.1, JF424842.1, JF424843.1,
JF424844.1, JF424845.1, JF424846.1, JF424847.1, JF424848.1,
JF424849.1, JF424850.1, JF424851.1, JF424852.1, JF424853.1,
JF424854.1, JF424855.1, JF424856.1, JF424857.1, JF424858.1,
JF424859.1, JF424860.1, JF424861.1, JF424862.1, JF424863.1,
JF424864.1, JF424865.1, JF424866.1, JF424867.1, JF424868.1,
JF424869.1, JF424870.1, JF424871.1, JF424872.1, JF424873.1,
JF424874.1, JF424875.1, JF424876.1, JF424877.1, JF424878.1,
JF424879.1, JF424880.1, JF424881.1, JF424882.1, JF424883.1,
JF424884.1, JF424885.1, JF424886.1, JF424887.1, JF424888.1,
JF424889.1, JF424890.1, JF424891.1, JF424892.1, JF424893.1,
JF424894.1, JF424895.1, JF424896.1, JF424897.1, JF424898.1,
JF424899.1, JF424900.1, JF424901.1, JF424902.1, JF424903.1,
JF424904.1, JF424905.1, JF424906.1, JF424907.1, JF424908.1,
JF424909.1, JF424910.1, JF424911.1, JF424912.1, JF424913.1,
JF424914.1, JF424915.1, JF424916.1, JF424917.1, JF424918.1,
JF424919.1, JF424920.1, JF424921.1, JF424922.1, JF424923.1,
JF424924.1, JF424925.1, JF424926.1, JF424927.1, JF424928.1,
JF424929.1, JF424930.1, JF424931.1, JF424932.1, JF424933.1,
JF424934.1, JF424935.1, JF424936.1, JF424937.1, JF424938.1,

JF424939.1, JF424940.1, JF424941.1, JF424942.1, JF424943.1,
JF424944.1, JF424945.1, JF424946.1, JF424947.1, JF424948.1,
JF424949.1, JF424950.1, JF424951.1, JF424952.1, JF424953.1,
JF424954.1, JF424955.1, JF424956.1, JF424957.1, JF424958.1,
JF424959.1, JF424960.1, JF424961.1, JF424962.1, JF425488.1,
JF425489.1, JF425490.1, JF425491.1, JF425492.1, JF425493.1,
JF425494.1, JF425495.1, JF425496.1, JF425497.1, JF425498.1,
JF425499.1, JF425500.1, JF425501.1, JF425502.1, JF425503.1,
JF425504.1, JF425551.1, JF425552.1, JF425553.1, JF425554.1,
JF425555.1, JF425556.1, JQ237146.1, JQ823124.1, JX273163.1,
KJ659286.1, KJ659287.1, KJ659288.1, KJ659289.1, KM225765.1,
LC164349.1, LC164350.1, LC164351.1, LC164352.1, LC164353.1,
LC164354.1, MF662180.1, MF662181.1, MF662182.1, MF662183.1,
MF662184.1, MF662185.1, MF662186.1, MF662187.1, MF662188.1,
MF662189.1, MF662190.1, MF662191.1, MF662192.1, MF662193.1,
MF662194.1, MF662195.1, MF662196.1, MF662197.1, MF662198.1,
MF662199.1, MF662200.1, MF662201.1, MF662202.1, MF662203.1,
MF662204.1

KIPyV: EF520287.1, EF520288.1, EF520289.1, EU358766.1,
EU358767.1, KC571691.1, KM085447.1, KU746835.1

WUPyV: EF444549.1, EF444550.1, EF444551.1, EF444552.1,
EF444553.1, EF444554.1, EU296475.1, EU358768.1, EU358769.1,
EU711054.1, EU711055.1, EU711056.1, EU711057.1, EU711058.1,
FJ794068.1, FJ890981.1, FJ890982.1, GQ926975.1, GQ926976.1,
GQ926977.1, GQ926978.1, GQ926979.1, GQ926980.1, GU296361.1,

GU296362.1, GU296363.1, GU296364.1, GU296365.1, GU296366.1,
GU296367.1, GU296368.1, GU296369.1, GU296370.1, GU296371.1,
GU296372.1, GU296373.1, GU296374.1, GU296375.1, GU296376.1,
GU296377.1, GU296378.1, GU296379.1, GU296380.1, GU296381.1,
GU296382.1, GU296383.1, GU296384.1, GU296385.1, GU296386.1,
GU296387.1, GU296388.1, GU296389.1, GU296390.1, GU296391.1,
GU296392.1, GU296393.1, GU296394.1, GU296395.1, GU296396.1,
GU296397.1, GU296398.1, GU296399.1, GU296400.1, GU296401.1,
GU296402.1, GU296403.1, GU296404.1, GU296405.1, GU296406.1,
GU296407.1, GU296408.1, HQ218321.1, KC571693.1, KC571694.1,
KC571695.1, KC571696.1, KC571697.1, KC571698.1, KC571699.1,
KJ643309.1, KJ725028.1, KM265136.1, KU049032.1, KU672381.1,
KX650181.1, KX650182.1, KX650184.1, KX650185.1, KX650186.1,
KX650187.1, KX650188.1, KX650189.1, KX650190.1, KX650191.1,
KX650192.1, KX650193.1

MCPyV: EU375803.1, EU375804.1, FJ173815.1, FJ464337.1,
HM011538.1, HM011539.1, HM011540.1, HM011541.1, HM011542.1,
HM011543.1, HM011544.1, HM011545.1, HM011546.1, HM011547.1,
HM011548.1, HM011549.1, HM011550.1, HM011551.1, HM011552.1,
HM011553.1, HM011554.1, HM011555.1, HM011556.1, HM011557.1,
HM355825.1, JF812999.1, JF813000.1, JF813001.1, JF813002.1,
JF813003.1, JN383838.1, JN383839.1, JN383840.1, JN383841.1,
JQ479315.1, JQ479316.1, JQ479317.1, JQ479318.1, JQ479319.1,
JQ479320.1, JX045708.1, JX045709.1, KC202810.1, KC571692.1,

KF266963.1, KF266964.1, KF266965.1, KX781279.1, KX827417.1,
NC_010277.2

HPyV6: HM011558.1, HM011559.1, HM011560.1, HM011561.1,
HM011562.1, HM011563.1, KM387421.1, KM655817.1, KR090570.1,
KU596573.1, KX379630.1, KX379631.1, KX771234.1

HPyV7: HM011564.1, HM011565.1, HM011566.1, HM011567.1,
HM011568.1, HM011569.1, KJ733012.1, KJ733013.1, KX771235.1

TSPyV: AB873001.1, JQ723730.1, KF444091.1, KF444092.1,
KF444093.1, KF444094.1, KF444095.1, KF444096.1, KF444097.1,
KF444098.1, KF444099.1, KF444100.1, KF444101.1, KM007161.1,
KM655816.1, KU221329.1, KX249740.1, KX249741.1, KX249742.1,
KX249743.1

HPyV9: HQ696595.1, KC831440.1

MWPyV: JQ898291.1, JQ898292.1, KC549586.1, KC549587.1,
KC549588.1, KC549589.1, KC549590.1, KC549591.1, KC549592.1,
KC549593.1, KC549594.1, KC571700.1, KC571701.1, KC571702.1,
KC571703.1, KC571704.1, KC571705.1, KC690147.1, KR338953.1

STLPyV: JX463183.1, JX463184.1, KF525270.1, KF530304.1,
KF651951.1, KM893862.1, KR090571.1, NC_020106.1

HPyV12: JX308829.1, NC_020890.1

NJPyV: KF954417.1, NC_024118.1

Conservação do local de splice e árvores filogenéticas

[00137] Sequências de genes inteiros de TAg, incluindo sequências de íntron, foram alinhadas usando clustalW (pacote "msa" em R) para as 13 sequências de

referência de poliomavírus diferentes e todos os isolados de poliomavírus BK únicos. Uma árvore filogenética foi construída usando o método UPGMA (pacotes "phangorn" e "ggtree" em R). Um logo de sequência foi construído para os locais de splice aceitador e doador para mostrar a conservação específica de nucleotídeos entre subtipos (pacote "msa" em R).

Projeto de AON

[00138] Os oligonucleotídeos antissentido (AONs) foram projetados para direcionar os locais de splice em TAg. Os ácidos ribonucleicos nos AONs contêm modificações 2'-OMe. Os AONs têm 20 nucleotídeos de comprimento com uma estrutura de fosforotioato completa (*). Para estudos *in vitro*, os AONs contêm um rótulo 5'-FAM. A estrutura secundária e a energia de ligação dos AONs foram previstas usando a estrutura do RNA. Todas as sequências AON são descritas abaixo:

Nome	Sequência	Local Alvo de Splice em TAg
Scrambled	G*C*A*C*C*U*C*U*G*C*G*U*C*C*U*A*G*A*A*T	Não aplicável
1_1	A*C*C*U*C*U*G*A*G*C*U*A*C*U*C*C*A*G*G*U	Doador (exon 1)

1_2	A*C*A*A*A*C*C*U*C*U*G*A*G*C*U*A*C*U*C*C	Doador (exon 1)
1_3	C*A*G*C*A*C*A*A*A*C*C*U*C*U*G*A*G*C*U*A	Doador (exon 1)
2_1	U*C*C*A*U*A*G*G*U*U*G*G*C*A*C*C*U*A*G*A	Aceitador (exon 2)
2_2	U*G*U*U*C*C*A*U*A*G*G*U*U*G*G*C*A*C*C*U	Aceitador (exon 2)

* Indica uma ligação de fosforotioato.

Cultura celular

[00139] Células HK2 epiteliais de rim de túbulo proximal imortalizadas (ATCC ® CRL-2190™) foram obtidas a partir de ATCC e mantidas a 37°C, 5% de CO₂, em meio F12 de Eagle modificado por Dulbecco, mistura 1:1 com Hepes 15 mM, L-glutamina (Lonza) 2,5 mM e suplementado com Tri-iodo tironina, fator de crescimento epidérmico (EGF), insulina-transferrina-selênio-etanolamina (ITS-X), hidrocortisona e 100 U/mL penicilina-estreptomicina. O poliomavírus BK (ATCC® VR-837™) foi obtido a partir de ATCC e diluído em meio de cultura HK2 completo para reduzir a carga infecciosa. Para experimentos de tratamento, as células foram semeadas em placas de 6 ou 12 cavidades (Corning) a uma densidade de 32.000 células/cm² e cultivadas durante a

noite. O tratamento AON foi realizado incubando as células durante 5h com lipofectamina 3000 (Thermo Fisher) a uma concentração de AON de 50 nM, após o que a lipofectamina foi lavada. As infecções com poliomavírus BK foram realizadas 24 horas após a lavagem das células por incubação das células com meio de cultura contendo poliomavírus BK por 2 horas, após o que o vírus foi lavado. O sobrenadante foi coletado após a lavagem e aos 3, 5 e 7 dias após a infecção para determinar a produção de partículas virais por PCR. Uma amostra de carga viral foi coletada antes da infecção para determinar a carga infecciosa. O RNA e a proteína foram colhidos no dia 7 para determinar a expressão de TAg e VP1.

Determinações de carga viral

[00140] A fim de determinar a carga viral no sobrenadante da cultura, 200 µL foram coletados de cada cavidade para cada ponto de tempo. Pierce Universal Nuclease foi adicionado a cada amostra para degradar o DNA não empacotado por 15 minutos à temperatura ambiente e foi então inativado com EDTA 5 mM. O DNA viral foi isolado do sobrenadante usando o mini kit de DNA (Qiagen) e a carga viral foi determinada usando Taqman PCR conforme descrito abaixo (*Wunderink, H.F., et. al., J. Clin. Virol., 2017*).

[00141] Para monitorar a qualidade da extração de DNA e a inibição potencial de PCR, adicionamos baixas

concentrações de herpesvírus de focina ao tampão de lise. O DNA foi eluído em um volume final de 100 µL de tampão de eluição, dos quais 10 µL foram usados como entrada para PCR quantitativo em tempo real (qPCR). Usando os iniciadores 440BKVs 5'-GAAAAGGAGAGT-GTCCAGGG-3' e 441BKVs 5'-GAACTTCTACTCCTCCTTTTATTAGT-3' e uma sonda Taqman 576BKV-TQ-FAM FAM 5'-CCAAAAAGCCAAAGGAACCC-3'-BHQ1, um fragmento de 90-bp dentro do gene BKPyV VP1 foi amplificado. O BKPyV qPCR e PCR do herpesvírus de focina foram duplexados para a qualidade do DNA e o monitoramento da inibição potencial do PCR. Além disso, o BKPyV qPCR foi validado para detectar os genótipos I-IV do BKPyV.

[00142] As reações de PCR quantitativas foram realizadas em um volume total de 50 µL, contendo 25 µL de HotStarTaq Master Mix (QIAGEN, Hilden, Alemanha), 0,5 µmol/L de cada iniciador, 0,35 µmol/L de sonda BKPyV e 3,5 mmol/L de MgCl₂. As reações foram realizadas usando um sistema de detecção em tempo real CFX96 (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) com as seguintes condições de ciclo: 15 min a 95 °C seguido por 45 ciclos de amplificação (30 s a 95 °C; 30 s a 55 °C; 30 s a 72 °C). Para a quantificação, foi utilizado um padrão de uma amostra quantificada de urina positiva para BKPyV. A sensibilidade analítica do BKPyV qPCR foi de ~10 cópias/mL. Em cada placa, 3 controles negativos foram incluídos; esses controles testaram

negativo em todos os ensaios de PCR. Os resultados de PCR com um limiar de ciclo ≥ 40 foram considerados negativos.

Anticorpos e Western blot

[00143] As concentrações de proteína foram determinadas usando o método BCA. As amostras foram corridas em um gel de TGX 4-15% e transferidas para uma membrana de nitrocelulose ou PVDF. Os anticorpos usados foram: anti-actina-HRP policlonal de coelho (controle de carga), anti-SV40 VP1 policlonal de coelho (ab53977, Abcam), antígeno T anti-SV40 monoclonal de camundongo [PAb416] (ab16879, Abcam) e Antígeno T anti-SV40 monoclonal de camundongo (PAb108, Thermo Fisher). O anticorpo primário foi incubado durante a noite a 4 °C para TAg e VP1 e 30 minutos à temperatura ambiente para actina. Os anticorpos secundários usados para TAg e VP1 foram HRP anti-camundongo policlonal de cabra (P044701-2, Agilent) e HRP anti-coelho policlonal de cabra (P044801-2, Agilent), respectivamente. As membranas foram incubadas com SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher) e as bandas de proteína foram visualizadas usando o ChemiDoc MP Imaging System (Bio Rad).

qPCR em tempo real

[00144] As células HK2 infectadas com BK foram lisadas em Trizol e o RNA foi isolado usando o kit RNeasy (Qiagen). Um tratamento com DNase I (Qiagen) foi adicionado

para remover o excesso de DNA durante o isolamento e o cDNA foi sintetizado usando transcriptase reversa Promega, DTT, dNTPs e iniciadores aleatórios. Um PCR em tempo real foi realizado em um Sistema de Detecção de PCR em Tempo Real CFX384 Touch™ (Bio Rad) com SYBR™ Select Master Mix (Thermo Fisher) e os seguintes iniciadores:

Gene	Para Frente	Reverso
GAPDH	ACAAC TTTGGTATCGTGGAAGG	GCCATCACGCCACAGTTTC
TA _g	GAGGAGGATGTAAAGGTAGCTCA	ACTGGCAAACATATCTTCATGGC
VP1	TGCAGGGTCACAAAAAGTGC	AGCACTCCCTGCATTTCCAA

RESULTADOS

Projeto de oligonucleotídeos antissentido direcionados a BK

[00145] Os oligonucleotídeos antissentido eficientes (AONs) que têm como alvo o antígeno T grande de BKPyV (TA_g) devem ser específicos para BKPyV no sentido de que não são específicos para espécies de RNA hospedeiro, embora sejam preferencialmente também universais para outros isolados de BKPyV diferentes e poliomavírus diferentes em geral conforme possível. Os vírus dsDNA (neste caso, poliomavírus) em comparação com os vírus dsRNA/ssRNA são caracterizados por menos deriva genética. No entanto, permanece um grande número de genótipos e subgenótipos de BKPyV que dão origem a um grande número de sorotipos de BKPyV (ver árvore filogenética na Figura 2). Uma vez que

TAg contém dois exons, primeiro identificamos a sequência genômica nas junções exon-ínton nas tentativas de identificar candidatos AON (ver Figura 2). Para conseguir isso, extraímos as sequências genômicas BKPyV TAg únicas disponíveis (n = 245 números de acesso fornecidos na seção Materiais e Métodos) a partir do banco de dados NCBI e as alinhamos usando ClustalW. Regiões que representavam um alto nível de similaridade de sequência (ou conservação) foram tornadas alvo. Esses estudos revelaram um alto grau de conservação no exon 1 e na sequência intrônica de flanco (ver Figura 2). O Exon 2 também exibiu um alto nível de conservação de sequência. A sequência intrônica flanqueadora era tanto rica em nucleotídeos T quanto menos conservada em 4 nucleotídeos a partir da fronteira do exon. Os AON foram direcionados para o exon 1 de BKPyV TAg e porções de ponte da sequência intrônica no exon 1. Para o exon 2, os AON foram direcionados para 4-6 nucleotídeos na região intrônica do exon 2 e a sequência do exon 2 de flanqueamento.

[00146] Conforme mostrado na Figura 3, optamos por projetar 5 AONs que têm como alvo BKPyV TAg, 3 dos quais têm como alvo o exon 1 - porção do ínton (designado AON #1, #2 e #3), enquanto 2 AONs que têm como alvo o exon 2 - porção do ínton (denominado AON #4 e #5). Os AONs mudam progressivamente de primordialmente exônicos para incluir

sequência significativa de ligação ao íntron para AONs direcionados ao exon 1 (AON 1-3). Consulte a seção Material e Métodos e a figura 3 para sequências exatas, bem como as modificações da estrutura e da fração de açúcar.

[00147] Este projeto nos permitiu atingir especificamente o TAg de BKPyV, enquanto também foi universal para genótipos distintos de BKPyV em pacientes transplantados renais.

Redução mediada por AON em RNA TAg de BKPyV

[00148] Empregamos a entrega de AONs à base de lipofectamina, que melhorou significativamente a captação de AON dentro de 5 horas após a transfecção. Além disso, titulamos a dosagem de AON com base na intensidade celular do rótulo FAM para ser máxima em aproximadamente 50 nM. Vinte e quatro horas (24h) após a administração de AON, as células HK2 foram infectadas com BKV por 2 horas, após o que as células foram lavadas e cultivadas por 3, 5 e 7 dias. Nestes pontos, o RNA foi colhido das células e qRT-PCR realizado para determinar quais AONs poderiam afetar os níveis de expressão de TAg. As células HK2 que não foram transfectadas com AONs (não tratadas) exibiram níveis de expressão semelhantes de TAg em comparação com células tratadas com AON codificado (Scr) (dados não mostrados).

[00149] Está bem estabelecido que uma proporção considerável de AONs projetados para modular os níveis de

expressão ou splicing de um determinado RNA alvo são eficazes. Nossos estudos usando os AONs #2, #3 ou #4 exibiram repetidamente reduções significativas nos níveis de TAg RNA, geralmente revelando uma atenuação de 5 a 10 vezes nos níveis de RNA deste driver de DNA viral (ver Figura 4, painel esquerdo).

[00150] As culturas infectadas com BKPyV que foram tratadas com os AONs #2, #3, #4 ou #5 repetidos exibiram níveis de expressão de RNA de TAg diminuídos. Isso estabelece os locais direcionados por esses AON como bons locais de destino para reduzir a produção do vírus BK, reduzindo a produção de TAg. De notar que esta redução é observada na configuração de um MOI elevado, nomeadamente na gama de 100.

Redução mediada por AON de RNA VP1 e proteína

[00151] Em células infectadas latentemente por poliomavírus, tal como as células do túbulo proximal do rim infectadas com BKV, são mantidos baixos níveis de RNA TAg e expressão de proteínas. Em indivíduos com um sistema imunológico comprometido, seja ele natural ou induzido por um regime imunossupressor, a replicação do vírus e a indução da expressão de TAg é observada (Hasegawa, M. et. al., Transplantation Proceedings, 2014; Nickeleit, V. et. al., JASN, 2018). O aumento dos níveis de TAg, juntamente com a interação com fatores de transcrição acessórios para

a região não codificadora/promotora do genoma de BKV, direciona ambas a replicação do genoma de BK e a expressão das proteínas do capsídeo principal (região tardia). Coletivamente, a ativação mediada por TAg da replicação do DNA viral e encapsulamento pelas proteínas do capsídeo resulta na geração de partículas virais infecciosas que podem ser detectadas tanto na urina (virúria) quanto no soro (viremia) (Helle, F. et. al., Viruses, 2017).

[00152] Para testar se AONs são eficazes na redução da geração de BKV, determinamos o perfil de expressão de proteínas ativadas por TAg, incluindo VP1. VP1 é o principal constituinte estrutural do capsídeo viral icosaédrico. Esta camada externa tem 72 pentâmeros que são unidos em uma estequiometria de 5:1 por VP2 ou VP3. Como tal, realizamos qRT-PCR para VP1, que revelou que os níveis de expressão de VP1 são muito maiores do que TAg por cópias de GAPDH (dados não mostrados). Isso está de acordo com o fato de que TAg, junto com outros fatores de transcrição, induz a expressão de mRNA de VP1. Além disso, em todos os estudos, nossos AONs #2, #3, #4 e #5 reduziram os níveis de expressão de RNA de VP1, juntamente com reduções marcantes na proteína VP1 (ver Figura 5, painel direito).

[00153] Também testamos se uma terapia de combinação de AONs #2 e #4 poderia reduzir mais eficazmente os níveis de TAg e RNA VP1. Esta combinação também foi selecionada

com base no fato de que o Western blot acima mencionado para VP1 em células tratadas com AON (Figura 5) sugeriu que esses dois AONs levam à perda mais potente da proteína VP1. Com base nos níveis de expressão de TAg e mRNA VP1, este tratamento combinatório não produziu evidências que sugerissem que, juntos, eles eram mais eficazes (Figura 4).

[00154] A redução observada em VP1 mostra que AONs de segmentação por splice TAg são eficazes. Ao reduzir o RNA TAg (e potencialmente a expressão da proteína), os níveis de expressão dos genes de região tardia de BKPyV e proteínas correspondentes são reduzidos. Além disso, ao lado de um papel para VP1 no encapsulamento do DNA viral, VP1 também desempenha um papel de mediação fundamental na infecciosidade de partículas virais recém-formadas ao se ligar à superfície celular de células vizinhas e/ou distantes em ácidos siálicos em glicanos (Helle, F. et. Al., Viruses, 2017). Como tal, a infecciosidade do BKPyV provavelmente seria comprometida após uma redução (ou na ausência) da proteína VP1.

AONs de direcionamento por splice TAg diminuem o título viral de BK

[00155] Concomitante com nossas triagens para TAg e RNA VP1 e níveis de proteína (no dia 7) em células HK2 pré-tratadas com nossos AONs de direcionamento por splice TAg, também avaliamos a carga viral no sobrenadante de cultura

em 3, 5 e 7 dias após a infecção por BKPyV. Determinamos se a diminuição na VP1 afetou a produção de DNA viral encapsulado, uma vez que uma redução na expressão de TAg poderia potencialmente impactar tanto a replicação genômica viral quanto a geração da proteína VP1. Determinamos as partículas de vírus no sobrenadante da cultura quantificando o DNA encapsulado. Para discernir entre DNA encapsulado e não encapsulado, aplicamos um tratamento de (endo)nuclease para digerir o DNA não encapsulado. Como mostrado na figura 6, esses estudos revelaram que o AON #1 no dia 3 reduziu os níveis de DNA viral, mas em 7 dias esse nível se normalizou e é semelhante aos níveis de DNA viral em células tratadas com AON codificado (Figura 6). Os AONs #2, #3 e #4 são caracterizados por reduções no título viral em ambos os intervalos de tempo, com AONs #2, #3 e #4 em particular atenuando o DNA viral encapsulado em até 6 vezes (Figura 6). A combinação acima mencionada de AON #2 e #4 reduziu apenas ligeiramente a carga viral nos dias 3 e 7 (Figura 6).

[00156] Assim, a atenuação mediada por AON de TAg e RNA VP1 e proteína leva a uma diminuição na produção de vírus.

Modificações de alquila na posição 2' do açúcar ribose

[00157] A alteração da posição 2' do açúcar ribose nos AONs impacta sua capacidade de reduzir os níveis de

proteína e TAg e RNA VP1 e a produção de DNA de BKV (Figura 7). Os dados acima mencionados são baseados em uma modificação 2'-O metil (2'-OMe) do açúcar ribose em cada nucleotídeo dentro de um oligonucleotídeo antissentido. O RNA e a proteína foram colhidos a partir de células HK2 pré-tratadas com nucleotídeos 2'-OMe ou 2'-metoxi (2'-MOE) (ver Figura 7).

AONs de direcionamento de splice TAg para outros poliomavírus

[00158] Juntamente com o BKV, também desenvolvemos AONs que têm como alvo o TAg para o vírus JC (JCV). JCV tem 75% de similaridade de sequência com BKV, um nível de conservação que também é observado na junção do exon 1 - íntron, enquanto a similaridade de sequência na junção do íntron - exon 2 é virtualmente 100% (Figura 8). Os AONs que têm como alvo o exon 2 para BKV também podem reduzir a carga de JCV. O JCV também pode infectar células renais, tais como células do túbulo proximal, que se acredita ser um local secundário de infecção, após a infecção inicial via amígdalas e/ou trato digestivo. Os AONs de direcionamento de splice de TAg, em particular aqueles que têm como alvo o sítio de splice de íntron - exon 2, podem, assim, anular simultaneamente a produção de BKV e JCV. Além disso, estamos gerando novos AONs que têm como alvo a sequência única do exon 1 - íntron do JCV.

[00159] Dado que a sequência genômica nas junções exon 1 - íntron e íntron - exon 2 para TAg foram determinados para todos os poliomavírus conhecidos, é possível projetar AONs que afetam o splicing de TAg em todos esses poliomavírus (Figura 9).

[00160] Exemplos de AON adequados para outros poliomavírus são representados na Figura 9.

EXEMPLO

Material e Métodos

Conservação filogenética de subtipos de BKV

[00161] Sequências genômicas completas de isolados de poliomavírus BK foram baixadas a partir do banco de dados NCBI disponível publicamente (antes de 07-09-2018). A partir desses registros, apenas os isolados relatando um genoma completo foram usados para análise. Os isolados "MM" e "FNL-9" foram removidos devido a uma grande deleção no íntron ou duplicação sobreposta ao sítio de splice do aceitador, respectivamente. Sequências idênticas foram removidas, produzindo 248 sequências genômicas únicas, cujos números de acesso são fornecidos abaixo:

AB211369, AB211370, AB211371, AB211372, AB211373, AB211374, AB211375, AB211376, AB211377, AB211378, AB211379, AB211381, AB211382, AB211383, AB211384, AB211385, AB211386, AB211387, AB211388, AB211389, AB211390, AB211391, AB213487, AB217917, AB217918, AB217919, AB217920, AB217921, AB260028,

AB260029, AB260030, AB260031, AB260032, AB260033, AB263912,
AB263913, AB263914, AB263915, AB263916, AB263917, AB263918,
AB263919, AB263920, AB263921, AB263922, AB263923, AB263924,
AB263925, AB263926, AB263927, AB263928, AB263929, AB263930,
AB263931, AB263932, AB263934, AB263935, AB263936, AB263938,
AB269825, AB269826, AB269827, AB269828, AB269829, AB269830,
AB269831, AB269832, AB269834, AB269836, AB269837, AB269838,
AB269840, AB269841, AB269842, AB269843, AB269844, AB269845,
AB269846, AB269847, AB269848, AB269849, AB269850, AB269851,
AB269852, AB269853, AB269854, AB269855, AB269856, AB269857,
AB269858, AB269859, AB269860, AB269861, AB269862, AB269863,
AB269864, AB269865, AB269866, AB269867, AB269868, AB269869,
AB298941, AB298942, AB298945, AB298946, AB298947, AB301086,
AB301087, AB301089, AB301090, AB301091, AB301092, AB301093,
AB301094, AB301095, AB301096, AB301097, AB301099, AB301100,
AB301101, AB365130, AB365132, AB365133, AB365134, AB365136,
AB365137, AB365138, AB365139, AB365140, AB365141, AB365142,
AB365144, AB365145, AB365146, AB365148, AB365149, AB365150,
AB365151, AB365153, AB365154, AB365156, AB365157, AB365158,
AB365159, AB365160, AB365162, AB365164, AB365165, AB365166,
AB365167, AB365168, AB365170, AB365173, AB365174, AB365175,
AB365176, AB365178, AB369087, AB369088, AB369089, AB369090,
AB369092, AB369093, AB369094, AB369095, AB369096, AB369097,
AB369098, AB369099, AB369101, AB464953, AB464954, AB464956,
AB464957, AB464958, AB464960, AB464961, AB464962, AB485695,

AB485696, AB485697, AB485698, AB485699, AB485700, AB485701, AB485703, AB485704, AB485707, AB485709, AB485710, AB485711, AB485712, AY628224, AY628225, AY628226, AY628227, AY628228, AY628229, AY628230, AY628231, AY628232, AY628233, AY628234, AY628235, AY628236, AY628237, AY628238, DQ305492, EF376992, FR720308, FR720309, FR720310, FR720311, FR720312, FR720313, FR720315, FR720317, FR720318, FR720320, FR720321, JF894228, JN192431, JN192432, JN192433, JN192435, JN192437, JN192438, JN192439, JN192440, JQ713822, KF055891, KF055892, KF055893, KP412983, KP984526, KY114802, KY114803, KY132094, KY487998, LC029413, LC309239, LC309240, LT960370, M23122, MF358970, MF627830, MF627831, V01108.

Conservação do sítio de splice e árvores filogenéticas

[00162] Sequências de genes inteiros de TAg, incluindo sequências de íntrons, foram alinhadas usando Prank (v.140603). Ajustes manuais foram feitos nas sequências alinhadas para ajustar as imperfeições ao alinhar as exclusões. Uma árvore filogenética foi construída usando o método Neighbor-Joining (MEGA versão 10.0.5) com bootstrapping (1000 replicações) e o modelo Kimura de 2 parâmetros. A árvore filogenética foi posteriormente visualizada em R ("ggtree") e os logotipos de sequência foram construídos ("ggseqlogo") para os sítios de splice aceitador e doador para mostrar a conservação específica de nucleotídeos entre os subtipos. Os subtipos

de sequências foram determinados usando sequências de referência descritas por Zhong et al (Zhong, J Gen Virol, 2009).

Projeto de oligonucleotídeo

[00163] Os oligonucleotídeos antissentido foram projetados conforme descrito no EXEMPLO 1. Para estudos in vivo, um AON 2'-MOE (HYB_01) sem marcador 5' 6-FAM foi usado.

Animais

[00164] Camundongos C57BL6/J machos entre 6 e 10 semanas de idade foram injetados por via intravenosa com 40 mg/kg AON 2'-MOE sem marcador 5' 6-FAM ou solução salina (volume de + - 100 uL corrigido para o peso corporal). Os animais foram sacrificados sob anestesia com isoflurano e exsanguinação venosa 24 após administração de AON ou solução salina. Os órgãos foram removidos e fixados em inclusão de formalina e parafina.

Cultura de células

[00165] Células epiteliais tubulares proximais de rim humano (HK2, ATCC®) foram mantidas em Meio Eagle Modificado por Dulbecco: Mistura de Nutrientes F-12 (Gibco) suplementado com sal de sódio de 3,3',5-Triiodo-L-tironina (Sigma-Aldrich), insulina-transferrina-selênio-etanolamina (ITS-X; Sigma-Aldrich), fator de crescimento epidérmico humano (EGF; Sigma-Aldrich), hidrocortisona (Sigma-Aldrich)

e penicilina-estreptomicina 100 U/mL (Gibco). As células epiteliais tubulares proximais renais humanas (PTEC, Sciencell Research Laboratories) foram mantidas em meio de crescimento de células epiteliais renais REGM™ completo (Lonza). Astrócitos humanos primários (Sciencell Research Laboratories) foram mantidos em Meio de Astrócito completo (Sciencell Research Laboratorie). Astrócitos e oligodendrócitos derivados de iPSc foram mantidos em meio neuronal BrainPhys™ completo (Stemcell Technologies). Todas as células foram cultivadas a 37°C, 5% de CO₂.

Tratamento de AON e infecção viral de células

[00166] As células foram semeadas na densidade celular necessária e cultivadas durante a noite. A absorção celular de AONs foi alcançada cultivando células na presença de AON 50 nM com lipofectamina 2000 por 4h (astrócitos humanos e astrócitos/oligodendrócitos iPSc, Invitrogen) ou lipofectamina 3000 por 5h (HK2 e PTEC, Invitrogen), após o que as células foram lavadas em meios de cultura normais. A infecção por BKV de células epiteliais HK2 ou células epiteliais renais humanas foi realizada conforme descrito no EXEMPLO 1. A infecção por JCV de astrócitos/oligodendrócitos foi alcançada cultivando as células na presença de poliomavírus JC (cepa MAD-4, ATCC® VR-1583™) durante a noite. As células foram lavadas extensivamente após a infecção, a fim de remover o excesso

de partículas virais. O meio de cultura foi parcialmente atualizado e as amostras do sobrenadante foram coletadas em pontos de tempo específicos após a infecção para estudar a produção de partículas virais. A reinfecção das células foi realizada tomando o sobrenadante das cavidades contendo as células infectadas após o tratamento. Este sobrenadante foi então diluído 2 vezes e transferido para uma nova cavidade contendo células não infectadas e não tratadas por 2h, após o que as células foram lavadas extensivamente. As células infectadas foram lavadas após 7 dias usando PFA a 4%.

Determinações de carga viral

[00167] As cargas virais no sobrenadante da cultura foram realizadas conforme descrito no EXEMPLO 1, com as seguintes exceções. 1) Amostras de 100 µL foram coletadas de cada cavidade em cada ponto de tempo. 2) O DNA não empacotado foi degradado usando o kit TURBO DNA-free (Invitrogen) antes do isolamento.

qPCR em tempo real

[00168] O isolamento de RNA, síntese de cDNA e qPCR em tempo real foi realizado como descrito no EXEMPLO 1. No entanto, após o isolamento de RNA, o DNA residual foi degradado usando o kit TURBO DNA-free (Invitrogen). Para a amplificação de variantes de splice do antígeno T, o kit Phusion® High-Fidelity PCR foi utilizado usando tampão HF e os seguintes iniciadores: ATGGAGCTCATGGACCTTTTAGG para

frente, TGCAACTCTTGACTATGGGGG reverso. A detecção de qPCR do RNA do vírus JC foi realizada usando os seguintes iniciadores:

Gene	Para Frente	Reverso
GADPH	ACAACCTTGGTATCGTGGAAGG	GCCATCACGCCACAGTTTC
TAg	CACCCTGATAAAGGTGGGGAC	GCAAAACAGGTCTTCATCCCAC
VP1	CCAAAGAATGCCACAGTGCAA	GTGGGATCAGGAACCCAACAT

Anticorpos

[00169] Os seguintes anticorpos primários foram usados: anti-SV40 VP1 de coelho (ab53977), antígeno T anti-SV40 de camundongo (PAb416), antígeno T de anti-SV40 de camundongo (PAb108), anti-GAPDH de coelho (D16H11), Lectina de Lótus biotinilada (LTL, B-1325). O anticorpo antifosforotioato de coelho foi gentilmente cedido por Jonathan Watts (UMASS Medical School, MA, EUA). Os seguintes anticorpos secundários foram usados: Alexa 488 de cabra anti-coelho (A11008), Alexa 568 de cabra anti-coelho (A11011), HRP de cabra anti-coelho (P044801-2) e Alexa 532 estreptavidina (S11224).

Quantificação de proteína

[00170] Os lisados de proteína foram gerados por lise de células em tampão de lise contendo Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, SDS a 1%, desoxicolato a 0,5%, triton X-100 a 0,5% e inibidores de protease (pH 7,5). As concentrações de proteína da amostra foram determinadas usando o Kit Pierce™

BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific). A quantificação da expressão da proteína foi realizada usando o sistema de imunoensaio automatizado Wes Simple Western com uma matriz de separação de 12-230 kDa e módulo de detecção anti-coelho (ProteinSimple).

Imunohistoquímica

[00171] Para experimentos de reinfecção, as células foram fixadas com 4% de PFA e permeabilizadas em 0,3% Triton-X/3% BSA (Merck, Zwijndrecht, Holanda)/1% NGS (Dako, Amstelveen, Holanda)/1% FCS em PBS por 1h em temperatura ambiente. O anticorpo primário foi incubado em 3% BSA/1% NGS/1% FCS em PBS a 4 °C durante a noite, após o que as células foram lavadas extensivamente e incubadas com anticorpo secundário por 1h em temperatura ambiente. A aquisição de imagens e quantificação de células reinfectedas foi realizada usando o ImageXpress Micro High-Content Imaging System e o software MetaXpress usando módulos personalizados para identificar e contar núcleos (TAg⁺). O processamento adicional de imagens in vivo (deconvolução e limiarização de cores) foi realizado usando ImageJ.

[00172] Os órgãos dos camundongos foram incluídos em parafina, cortados e as lâminas foram desparafinadas, reidratadas e as peroxidases endógenas foram extintas por 10 min à temperatura ambiente em 3% de H₂O₂ em metanol. A

recuperação do antígeno foi realizada usando Proteinase K (Agilent, Amstelveen, Holanda) por 10 min à temperatura ambiente, seguido por uma etapa de bloqueio usando Background buster (Innovex, Gujarat, Índia). Entre as etapas, as lâminas foram lavadas em TBS/Tween. A incubação do anticorpo primário (anti-fosforotioato ou LTL) foi realizada a 4 °C em 2% BSA/5% NGS em TBS/Tween. A incubação do anticorpo secundário foi realizada por 90 min à temperatura ambiente. Os núcleos foram corados com Hoechst 33258 (Molecular Probes, Leiden, Holanda) e as lâminas foram montadas com Prolong Gold (Invitrogen). A aquisição de imagens foi realizada usando o Pannoramic MIDI II (3DHISTECH, Budapeste, Hungria).

Sequenciamento de próxima geração

[00173] O RNA-seq foi realizado em amostras de RNA derivadas de células HK2 infectadas e tratadas com AON, usando a tecnologia de sequenciamento Illumina. Resumindo, a qualidade da amostra foi determinada usando o Analisador de Fragmentos e o Kit NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep para Illumina foi usado para processar a(s) amostra(s). A preparação da amostra foi realizada de acordo com o protocolo " Kit NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep para Illumina" (NEB #E7760S/L). Resumidamente, o rRNA foi eliminado do RNA total usando o kit de depleção de rRNA (NEB#E6310). Após a fragmentação do RNA reduzido do

rRNA, foi realizada uma síntese de cDNA. Isso foi usado para ligação com os adaptadores de sequenciamento e amplificação por PCR do produto resultante. A qualidade e o rendimento após a preparação da amostra foram medidos com o Analisador de Fragmentos. O tamanho dos produtos resultantes era consistente com a distribuição de tamanho esperada (um pico amplo entre 300-500 bp). O agrupamento e o sequenciamento de DNA usando o NovaSeq6000 foram realizados de acordo com os protocolos do fabricante. Foi utilizada uma concentração de 1,1 nM de DNA. O software de controle NovaSeq NCS v1.5 foi usado. A análise de imagem, a chamada de base e a verificação de qualidade foram realizadas com o pipeline de análise de dados Illumina RTA3.3.5 e Bcl2fastq v2.20.

[00174] A referência humana Homo_sapiens.GRCh38.dna.primary_assembly foi combinada com a referência de vírus LC029411.1. O genoma combinado foi usado para o alinhamento das leituras para cada amostra. As leituras foram mapeadas para a sequência de referência usando um alinhador de leitura curto baseado em Burrows – Wheeler Transform (Tophat v2.0.14) com configurações padrão. Com base nos locais mapeados no arquivo de alinhamento, a frequência de quantas vezes uma leitura foi mapeada em uma transcrição foi determinada com HTSeq v0.6.1p1.

Identificação de evento de splice usando Eventpointer

[00175] A fim de identificar eventos de splicing alternativos em dados NGS, "Eventpointer" foi aplicado em leituras mapeadas para o genoma de referência viral. Os eventos de splice resultantes foram quantificados usando Kallisto para gerar valores de porcentagem de splice (PSI) para cada evento. Para o teste estatístico, o AON codificado foi usado como condição de controle.

Sequenciamento de leitura longa da Pacific Biosciences

[00176] A integridade do RNA foi avaliada primeiro em um bioanalisador. A síntese de cDNA foi realizada com o kit de síntese de cDNA SMARTer (Takara) e produtos de T grandes específicos foram amplificados usando Kapa HiFi HotStart Ready Mix (Roche). Os produtos de cDNA foram selecionados por tamanho, após o que os amplicons foram codificados em barras por amostra usando o Kit SMRTbell Barcoded Adapter Complete Prep (PacBio), depois agrupados equimolar e sequenciados em uma célula PacBio Sequel 1M v3 LR SMRT.

[00177] A identificação, polimento e anotação das transcrições foram realizadas usando o pipeline de bioinformática Iso-Seq3 tornado público pela Pacific Biosciences

(<https://github.com/PacificBiosciences/IsoSeq3>). As

leituras foram primeiro classificadas em comprimento total

e comprimento não total com base na presença de códigos de barras específicos da amostra. Para encontrar clusters de transcrição, um algoritmo de agrupamento em nível de isoforma (ICE) realiza um alinhamento de pares e atribuição reiterativa de leituras de comprimento total para clusters com base na probabilidade. Após o ICE, leituras parciais são adicionadas aos clusters de isoformas para aumentar a cobertura para um consenso final usando o algoritmo Arrow. A saída do pipeline de bioinformática é um conjunto de sequências de transcrição de comprimento total que podem ser mapeadas para a sequência de referência para construir um arquivo de anotação no formato GFF.

[00178] Com base na precisão consensual prevista do algoritmo Arrow, as sequências de transcrição que tiveram uma precisão prevista de >99% (excluindo QVs dos primeiros 100 bp e dos últimos 30 bp devido à cobertura ocasionalmente insuficiente para estimativa precisa de precisões) foram consideradas transcritos HQ e usadas para análise posterior. As sequências de transcrito HQ foram mapeadas de volta para a sequência de referência e filtradas para >99% de cobertura de alinhamento e >85% de identidade de alinhamento. Os transcritos redundantes foram recolhidos para criar um conjunto de dados final usado neste estudo.

RESULTADOS

Desenvolvimento de um novo AON direcionado a BKV

[00179] Conforme mostrado nas Figuras 10 e 11, ao lado de nossos AONs anteriores, optamos por projetar 9 novos AONs que têm como alvo BKV TAg, 6 dos quais têm como alvo a porção do exon 1 - íntron (designada HYB_06, _07, _08, _09, _10 e _11) , enquanto 2 novos AONs têm como alvo a porção do exon 2 - íntron (denominada HYB_12 e _13). Junto com esses 9 novos AONs direcionados à junção de exon-íntron TAg, também testamos 2 AONs previamente descritos por Santaris Pharma (WO2012/143427A1), que têm composições diferentes em relação aos nossos AONs, mas são complementares a uma parte da junção do exon 1 - íntron (SAN_74) ou apenas uma parte do exon 2 (SAN_73). Além disso, também projetamos e testamos um AON que se liga exclusivamente à região de codificação do exon 1, denominada HYB_14. Os AONs mudam progressivamente de primariamente exônicos para incluir sequência significativa de ligação ao íntron para AONs de direcionamento de exon 1, agora denominados coletivamente (HYB_01, _02, _03, _06, _07, _08, _09, _10, _11) e AONs de direcionamento de exon 2 (HYB _04 , _05, _12 e _13).

Redução mediada por AON em BKV TAg RNA

[00180] Os AONs de direcionamento de BKV exibiram vários intervalos de potência na redução dos níveis de mRNA TAg. Conforme mostrado nas Figuras 12 e 19, dos 14 AONs

projetados para direcionar a junção exon-íntron de TAg, HYB_01, HYB_03 e HYB_11 induziram as maiores reduções na expressão de mRNA TAg, geralmente na faixa de atenuação de 8 ou mais vezes nos níveis de RNA deste driver de DNA viral em 7 dias após a infecção.

[00181] Além disso, nossos dados também sugerem que os AONs direcionados à junção exon 1 - íntron são mais eficazes na redução dos níveis de mRNA TAg do que os AONs direcionados à junção exon 2 - intrônica (HYB_04, HYB_05, HYB_12 e HYB_13). Esta tendência é bioinformaticamente representada nas Figuras 18 e 25, onde apenas HYB_05 se agrupa com os AONs que têm como alvo a junção exon 1 - intrônica. Da mesma forma, SAN_73 e SAN_74 mostraram-se amplamente ineficazes na redução dos níveis de expressão de mRNA TAg. Digno de nota, essas reduções em mRNA TAg são observadas na configuração de um MOI alto, ou seja, na faixa de 100.

[00182] Juntamente com as células HK2, também testamos nossos AONs direcionados ao BKV em células epiteliais do túbulo proximal primárias (hPTECs). Com base nas reduções significativas e consistentes nos níveis de expressão de mRNA TAg observados em células HK2 com HYB_01, HYB_03 e HYB_11, optamos por prosseguir nesta fase com estes três sendo designados nossos 'compostos principais'. Conforme mostrado na Figura 28, HYB_01, HYB_03 e HYB_11

reduziram dramaticamente a expressão de mRNA TAg em hPTECs (n=3 réplicas biológicas), enquanto HYB_14 se mostrou ineficaz na redução dos níveis de mRNA TAg em hPTECs.

[00183] Curiosamente, a maioria dos nossos estudos envolve pré-tratamento com AON antes da infecção com BKV. Estudos preliminares nos quais primeiro infectamos células HK2 com BKV e subsequentemente tratamos as células com AON (nomeadamente HYB_01) revelaram que nossos AONs direcionados a BKV podem reprimir eficientemente a expressão de TAg de BKV em células que abrigam BKV 7 dias após a infecção (Figura 26, painel esquerdo), e que a administração de múltiplas dosagens pós-infecção pode potencialmente suprimir ainda mais os níveis de expressão de mRNA TAg (Figura 26, painel direito).

Redução mediada por AON de RNA VP1 e proteína

[00184] Curiosamente, os níveis de expressão de mRNA VP1 foram reduzidos pela maioria dos AONs de direcionamento de BKV, com exceção de HYB_04, HYB_12, HYB_13 e HYB_14 (Figuras 13 e 20). Semelhante aos nossos resultados obtidos para mRNA TAg, HYB_01, HYB_03 e HYB_11 em particular resultou em reduções marcantes na expressão de RNA VP1 em células HK2 (Figuras 13). Além disso, HYB_01 reduziu com eficiência os níveis de mRNA de VP1, independentemente de o AON ter sido administrado antes da infecção ou pós-infecção com vírus BK em células HK2 (Figura 26, painéis esquerdo e

direito). É importante notar que as reduções observadas no mRNA de VP1 resultaram na atenuação dramática dos níveis de proteína VP1 em células HK2 (Figuras 14-15 e 21-22). De acordo com nossas observações para os níveis de mRNA de TAg, SAN_73 e SAN_74 não impactaram significativamente os níveis de expressão de mRNA de VP1 e proteína.

[00185] Como mostrado nas Figuras 29-31, HYB_01, HYB_03 e HYB_11 reduziram drasticamente a expressão de mRNA de VP1 e proteína em hPTECs (n=3 repetições biológicas). Além disso, HYB_14 não afetou os níveis de proteína e mRNA de VP1. Além disso, também ganhamos evidências preliminares de que nossos AONs também reduzem efetivamente os níveis de proteína VP3 (Figuras 30 e 32).

Infecção e reinfecção de células epiteliais do túbulo proximal humano

[00186] Em seguida, avaliamos se nossa ampla variedade de AONs direcionados a BKV poderia impactar o grau de infecção e reinfecção por BKV em células HK2. Para conseguir isso, primeiro tratamos células HK2 com AONs direcionados a BKV e infectamos as células com BKV. Após 7 dias, nós coletamos o sobrenadante contendo a partícula viral e o usamos para infectar novos lotes de células HK2 não tratadas. Após 7 dias, nós realizamos a coloração imunofluorescente para células infectadas com TAg e pontuamos isso como uma porcentagem positiva (por

contracoloração com Hoechst para núcleos). Conforme mostrado nas Figuras 17 e 24, esses estudos revelaram que as células previamente tratadas com nossos AONs direcionados a BKV exibiram níveis significativamente mais baixos de reinfecção. Em contraste, o pré-tratamento de células HK2 com SAN_73 e SAN_74 não diminuiu os níveis de reinfecção no grau observado com HYB_01, HYB_03 e HYB_11.

AONs direcionados a BKV influenciam a produção de partículas virais

[00187] As reduções observadas na proteína VP1, uma proteína necessária para empacotar o DNA do vírus BK, devem impactar severamente a formação e a liberação de novas partículas virais no sobrenadante. De fato, como mostrado nas Figuras 16, 23 e 33, a grande maioria de nossos AONs direcionados a BKV diminui a produção de partículas virais 7 dias após a infecção, pelo que as maiores reduções são produzidas por HYB_01, HYB_03 e HYB_11. Em contraste, SAN_73 e SAN_74 diminuíram ligeiramente a produção de partículas virais. Este mecanismo é provavelmente responsável pela diminuição da (re)infecção de células locais e distais in vitro, e sugere fortemente que a captação de nossos AONs direcionados a BKV em células epiteliais do túbulo proximal do rim pós-transplante renal seria uma modalidade terapêutica eficaz na prevenção da ativação e/ou disseminação de BKV.

AONs de direcionamento de BKV modulam o splicing de TAg

[00188] Para obter uma visão mecanística de como nossos AONs direcionados a BKV estão levando às reduções aqui descritas em TAg e mRNA VP1, realizamos RNA-seq de RNA colhido a partir de células HK2 que foram tratadas com um AON codificado, HYB_01, HYB_03, HYB_11, HYB_14, SAN_73 ou SAN_74, após o qual as células foram infectadas com BKV por 2 horas. Após a lavagem, as células foram cultivadas por 7 dias após os quais o RNA foi coletado, avaliado em um bioanalisador para sinais de degradação. Posteriormente, quantidades equivalentes de RNA foram ribo-depletadas, submetidas à preparação da biblioteca após a qual RNA-seq foi realizada. De acordo com nossas reduções acima mencionadas em TAg e mRNA VP1 em células HK2, a cobertura do genoma de BKV do controle codificado, células tratadas com HYB_14 ou SAN_73 e SAN_74 foram claramente maiores do que aquelas tratadas com AONs direcionados a BKV (Figura 42). Para a análise das mudanças no splicing de BKV, tanto o genoma humano quanto o genoma de BKV foram fornecidos para alinhamento de sequências, com Bowtie sendo usado para alinhar as leituras de extremidades emparelhadas.

[00189] A fim de quantificar o splicing alternativo nas amostras, o EventPointer foi aplicado. Um arquivo GTF específico com diferentes transcrições do vírus foi usado.

O algoritmo tenta identificar possíveis eventos alternativos de splicing e relacionar cada uma das transcrições aos possíveis caminhos alternativos. Para avaliar o splicing em um pré-mRNA altamente complexo, tal como TAg, o pré-mRNA foi dissecado em eventos de splice únicos, levando o pré-mRNA de TAg a ser inicialmente separado em 7 fragmentos. Em cada junção, definida pela frequência com que um evento de emenda foi detectado, a porcentagem de emenda (PSI) foi determinada. Isso resultou em quatro eventos de splice alternativos únicos que ocorreram em todas as condições em alta frequência, conforme determinado pelo EventPointer. A frequência desses eventos foi pontuada usando o software Kallisto, resultando em uma quantificação por transcrição (com unidades sendo transcrições por milhão). Após o teste estatístico de significância, mudanças significativas no splicing foram observadas na junção exon 1 - intron de TAg, precisamente o sítio onde nossos AONs estão se ligando e previsto para impactar o splicing (Figura 35). Aqui, o painel superior fornece um esquema dos eventos de splicing relevantes no pré-mRNA TAg que podem ser posteriormente dissecados em eventos de splicing únicos, conforme mostrado no painel inferior. Para o evento de splice 1, HYB_01 produz uma modulação altamente significativa no padrão de splicing para o antígeno T truncado ($P=0,0108$), como um sítio

aceitador de splice alternativo é preferencialmente usado em relação às células HK2 tratadas com um AON de controle codificado (valor $Z = 2,5484$). Da mesma forma, para o evento de splice 2, uma mudança altamente significativa no splicing é detectada ($p=0,0149$), onde HYB_01 leva à geração preferencial de antígeno t pequeno (tAg) em oposição a TAG (valor $Z = -2,4342$). Em contraste, nenhuma mudança significativa de splicing é detectada em células tratadas com HYB_14, SAN_73 ou SAN_74. A ausência de modulação de splicing para SAN_74 é particularmente notável, dado que este AON também faz a ponte entre a junção de exon 1 - íntron. Isso sugere fortemente que o tamanho de nossos AONs (20 nt em oposição a 16 nt de comprimento) desempenha um papel na determinação de sua capacidade de impactar o splicing de TAG, potencialmente como resultado de impedimento estérico.

[00190] Além disso, os dados representados na Figura 35 também sugerem que a modulação de splicing na junção exon 1 - intrônica (evento de splice 2) influencia as decisões de splicing que ocorrem dentro do exon 2 (evento de splice 1). Portanto, nossos AONs de direcionamento de BKV parecem estar desencadeando um evento de splicing complexo ou mutuamente exclusivo a jusante no pré-mRNA de TAG. Esses estudos são baseados em um $n=3$ biológico.

[00191] Evidências de apoio de que nossos AONs direcionados a BKV medeiam alterações no splicing de TAg foram obtidas por meio da realização de PCR de longo alcance usando polimerase Phusion de alta fidelidade. Como mostrado na Figura 43, mudanças dramáticas no uso do sítio aceitador de antígeno T truncado (evento de splice 1 na Figura 35) foram observadas para HYB_01 e HYB_11 em comparação com células tratadas com controle de codificação, com uma mudança mais sutil evidente para HYB_03. Estes dados confirmam que os AONs direcionados à junção do exon 1 - intron impactam profundamente as decisões de splicing dentro do exon 2.

[00192] Para obter informações adicionais sobre os efeitos de mediação de splice de nossos AONs em BKV TAg, também empregamos o sequenciamento de PacBio para gerar leituras de sequência longa de TAg, onde os iniciadores de ligação às extremidades 5' e 3' de TAg foram usados para amplificar pré-mRNAs TAg de comprimento total. Esses estudos produziram uma visão precisa sobre o uso exato de sítios de splice individuais dentro do TAg, bem como eventos mutuamente exclusivos ou complexos, conforme indicado em nossos dados de RNA-seq. A degradação do RNA foi avaliada em um bioanalisador e, após o enriquecimento do alvo por PCR, os produtos de PCR foram selecionados por tamanho. A biblioteca de cDNA foi preparada, extremidades

reparadas, adaptadores ligados, DNA purificado e DNA SMRTbell sequenciado. Posteriormente, as subleitura foram convertidas em leituras de consenso circulares (inserir leituras de sequência). Conforme mostrado na Figura 36, de acordo com nossos dados de RNA-seq, esses estudos indicam que AONs direcionados ao aceitador TAg exon 1 - íntron impacta o uso ou acesso a este sítio de splice. Nossos AONs direcionados a BKV, em particular HYB_01, reduzem os níveis de TAg produzidos (painel esquerdo; barras à esquerda), levando a uma mudança em direção a níveis aumentados de antígeno t pequeno e antígeno T grande não splice (painel esquerdo; barras do meio e da direita, respectivamente). Além disso, os dados fornecem suporte adicional para a modulação mediada por AON do splicing do antígeno T truncado (painel direito).

[00193] É importante notar que a eficácia aqui exibida de nossos AONs de direcionamento de BKV na modulação do splicing de TAg na junção do exon 1 - íntron pode levar ao uso de sítios doadores de splice (alternativos) crípticos. O uso potencial de um local de splice críptico a montante (porção de sequência de codificação do exon 1) ou a jusante (porção intrônica antes do exon 2) pode levar a mRNAs com alteração de quadro que geralmente levam à introdução de códons de terminação prematura. Está bem estabelecido que esses transcritos

aberrantes seriam rapidamente degradados dentro da célula por decaimento mediado por nonsense (*Hug, N., et al., Nucleic Acids Research, 2016*). É importante ressaltar que esse processamento rápido provavelmente nos impediria de detectar a maioria dessas transcrições malformadas.

[00194] No entanto, nossas análises quantitativas e qualitativas dos transcritos TAg restantes indicam claramente que nossos AONs direcionados a BKV induzem reduções notáveis nos níveis de mRNA TAg e, simultaneamente, impactam o equilíbrio de mRNAs formados como resultado do splicing de pré-mRNA. Estes dados implicam a modulação dupla da expressão de TAg e splicing como um meio potente de atenuar a produção de partículas de BKV e infectabilidade.

Captação in vivo de AONs direcionados a BKV

[00195] Nossos dados gerados in vitro para AONs direcionados a BKV foram quimicamente modificados para conter uma modificação 2'-O metil (2'-OMe) do açúcar ribose em cada nucleotídeo dentro de um oligonucleotídeo antissentido. É importante notar que a absorção de AONs in vivo foi consistentemente encontrada para ser notadamente melhorada se o grupo 2' hidroxil for substituído por um grupo 2'-metoxi (2'-MOE). Portanto, modificamos o HYB_01, nosso composto principal para possuir a estrutura de fosforotioato completa e os grupos 2'-MOE, e injetamos este

AON por via intravenosa através da veia da cauda em camundongos C57BL/6J. 24 horas após a injeção, os camundongos foram sacrificados e o rim, fígado, baço, cérebro e músculo colhidos e seccionados. Como mostrado na coloração imunohistoquímica na Figura 44 e Figura 45, HYB_01 exibiu excelente captação no córtex renal e, em particular, nas células epiteliais do túbulo proximal do rim (como evidenciado pela absorção em células positivas de lectina tetragonolobus de lótus (LTL) do rim). Além disso, HYB_01 também foi detectável nas células Kupffer do fígado, e indetectável no cérebro (ver Figura 45). Além disso, os AONs eram detectáveis na polpa branca do baço, minimamente detectáveis no coração e indetectáveis no músculo (dados não mostrados).

AONs de direcionamento de splice TAg para outros poliomavírus

[00196] Embora o vírus JC (JCV) esteja bem estabelecido para infectar as células epiteliais do túbulo proximal dos rins humanos, nossas repetidas tentativas de atingir isso foram malsucedidas. Portanto, optamos por infectar outras células humanas que são reconhecidamente suscetíveis ao vírus JC e desempenham um papel no desenvolvimento de patofisiologias relacionadas ao JCV, nomeadamente astrócitos. Para esses estudos, nós pré-tratamos astrócitos derivados de células-tronco

pluripotentes induzidas por humanos ou uma linha de células astrocíticas primárias humanas com um de nossos 5 AONs direcionados a JCV (Figura 37), a saber HYB_15-19 (por 4 horas a uma concentração de 50nM por AON), e subsequentemente infectou as células com JCV durante a noite com um título de $10^{4,5}$ TCID₅₀/0,2 mL (informação fornecida pelo fornecedor com base na infecção de células Cos-7 em 7 dias após a infecção). Conforme mostrado nas Figuras 38 e 39, de acordo com nossa observação, que direcionar a junção exon 1 - íntron de TAg de BKV diminuiu os níveis de expressão de mRNA TAg e VP1, HYB_15, HYB_16 e HYB_17 resultou em reduções marcadas em ambos os níveis de expressão de TAg e VP1 em astrócitos derivados de células iPS (n = 1). Além disso, em astrócitos humanos primários também observamos reduções impressionantes nos níveis de expressão de mRNA de JCV TAg e VP1 em títulos variados de administração de JCV (Figuras 40 e 41; n=2).

Tabela

Polioma- Vírus Humano	genus	Nome do vírus	NCBI ref seq	Correlação clínica (se houver)
1	Beta	Poliomavírus BK	NC_001538	Py-assoc. nefropatia; cistite hemorrágica
2	Beta	Poliomavírus JC	NC_001699	Leucoencefalopatia multifocal progressiva
3	Beta	Poliomavírus KI	NC_009238	-
4	Beta	Poliomavírus WU	NC_009539	-
5	Alfa	Poliomavírus de células Merkel	NC_010277	Câncer de células de Merkel
6	Delta	Poliomavírus humano 6	NC_014406	HPyV6 assoc. dermatose pruriginosa e disceratótica
7	Delta	Poliomavírus humano 7	NC_014407	Hiperplasia epitelial relacionada ao HPyV7
8	Alfa	Tricodisplasia spinulosa poliomavírus	NC_014361	Tricodisplasia spinulosa
9	Alfa	Poliomavírus humano 9	NC_015150	
10	Delta	Poliomavírus MW	NC_018102	
11	Delta	STL poliomavírus	NC_020106	
12	Alfa	Poliomavírus humano 12	NC_020890	
13	Alfa	Poliomavírus de Nova Jersey	NC_024118	

REIVINDICAÇÕES

1. Oligonucleotídeo antissentido com 12 a 30, de preferência 17, 18, 19 ou 20 a 30 nucleobases de comprimento que compreende uma sequência que é o complemento reverso de um trecho contíguo de pelo menos 12 nucleobases de um pré-mRNA do antígeno T de poliomavírus e que o oligonucleotídeo antissentido pode modular o splicing do referido pré-mRNA do antígeno T em uma célula, em que o oligonucleotídeo antissentido é **caracterizado** pelo fato de que compreende pelo menos 12 nucleobases contíguas de SEQ ID N°: 1; SEQ ID N°: 2; SEQ ID N°: 3; SEQ ID N°: 4; SEQ ID N°: 5; SEQ ID N°: 6; SEQ ID N°: 7; SEQ ID N°: 8; SEQ ID N°: 9; SEQ ID N°: 10; SEQ ID N°: 11; SEQ ID N°: 12; SEQ ID N°: 13; SEQ ID N°: 14; SEQ ID N°: 15; SEQ ID N°: 16; SEQ ID N°: 17; SEQ ID N°: 18; SEQ ID N°: 20; SEQ ID N°: 21; SEQ ID N°: 22; SEQ ID N°: 23; SEQ ID N°: 24; SEQ ID N°: 25; SEQ ID N°: 26 ou SEQ ID N°: 27.

2. Oligonucleotídeo antissentido **caracterizado** pelo fato de que compreende pelo menos 12 nucleobases contíguas de SEQ ID N°: 1; SEQ ID N°: 2; SEQ ID N°: 3; SEQ ID N°: 4; SEQ ID N°: 5; SEQ ID N°: 6; SEQ ID N°: 7; SEQ ID N°: 8; SEQ ID N°: 9; SEQ ID N°: 10; SEQ ID N°: 11; SEQ ID N°: 12; SEQ ID N°: 13; SEQ ID N°: 14; SEQ ID N°: 15; SEQ ID N°: 16; SEQ ID N°: 17; SEQ ID N°: 18; SEQ ID N°: 20; SEQ ID N°: 21; SEQ ID N°: 22; SEQ ID N°: 23; SEQ ID N°: 24; SEQ ID N°: 25; SEQ

ID N°: 26 ou SEQ ID N°: 27, em que os pelo menos doze nucleotídeos compreendem o complemento reverso da sequência doadora de splice ou a sequência aceitadora de splice do pré-mRNA do antígeno T grande do respectivo poliomavírus.

3. Oligonucleotídeo antissentido, de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que compreende uma modificação que torna o duplex de mRNA-oligonucleotídeo resistente à ação de RNase H.

4. Oligonucleotídeo antissentido, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 3, **caracterizado** pelo fato de que compreende pelo menos uma nucleobase com uma estrutura de polímero modificada, de preferência um 2'-O-metil (2'-O-Me), 2'-O-metoxietil (2'-MOE), 2'-S-etil restrito (2'-cEt), ácido nucleico bloqueado (LNA), ácido nucleico peptídico (PNA) ou nucleotídeo morfolino (PMO).

5. Oligonucleotídeo antissentido, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 4, **caracterizado** pelo fato de que compreende pelo menos 17, preferivelmente pelo menos 18, 19 e preferivelmente pelo menos 20 nucleobases contíguas de SEQ ID N°: 1; SEQ ID N°: 2; SEQ ID N°: 3; SEQ ID N°: 4; SEQ ID N°: 5; SEQ ID N°: 6; SEQ ID N°: 7; SEQ ID N°: 8; SEQ ID N°: 9; SEQ ID N°: 10; SEQ ID N°: 11; SEQ ID N°: 12; SEQ ID N°: 13; SEQ ID N°: 14; SEQ ID N°: 15; SEQ ID N°: 16; SEQ ID N°: 17; SEQ ID N°: 18; SEQ ID N°: 20; SEQ ID N°: 21; SEQ ID N°: 22; SEQ ID N°: 23; SEQ ID N°:

24; SEQ ID N°: 25; SEQ ID N°: 26 ou SEQ ID N°: 27 ou compreendendo pelo menos 17, preferivelmente pelo menos 18, 19 e preferivelmente pelo menos 20 nucleobases contíguas de SEQ ID N°: 1; SEQ ID N°: 2; SEQ ID N°: 3; SEQ ID N°: 4; SEQ ID N°: 5; SEQ ID N°: 6; SEQ ID N°: 7; SEQ ID N°: 8; SEQ ID N°: 9; SEQ ID N°: 10; SEQ ID N°: 11; SEQ ID N°: 12; SEQ ID N°: 13; SEQ ID N°: 14; SEQ ID N°: 15; SEQ ID N°: 16; SEQ ID N°: 17; SEQ ID N°: 18; SEQ ID N°: 20; SEQ ID N°: 21; SEQ ID N°: 22; SEQ ID N°: 23; SEQ ID N°: 24; SEQ ID N°: 25; SEQ ID N°: 26 ou SEQ ID N°: 27 com uma incompatibilidade e em que a incompatibilidade não é o primeiro ou o último nucleotídeo do trecho contíguo.

6. Método de inibição da replicação de poliomavírus em uma célula, o método **caracterizado** pelo fato de que compreende o fornecimento de uma célula que está infectada com o referido poliomavírus com o oligonucleotídeo antissentido conforme definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 5 ou 12.

7. Método de preparo de um enxerto para transplante, o método **caracterizado** pelo fato de que as células doadoras, preferivelmente células renais doadoras são fornecidas com o oligonucleotídeo antissentido conforme definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 5, ou 12.

8. Método de tratamento de uma infecção de poliomavírus em um indivíduo, o método **caracterizado** pelo fato de que compreende a administração do oligonucleotídeo antissentido, conforme definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 5, ao indivíduo em necessidade do mesmo.

9. Método, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado** pelo fato de que o referido indivíduo é um indivíduo imunocomprometido.

10. Método, de acordo com a reivindicação 8 ou reivindicação 9, **caracterizado** pelo fato de que o indivíduo é o receptor de um rim ou transplante de células renais.

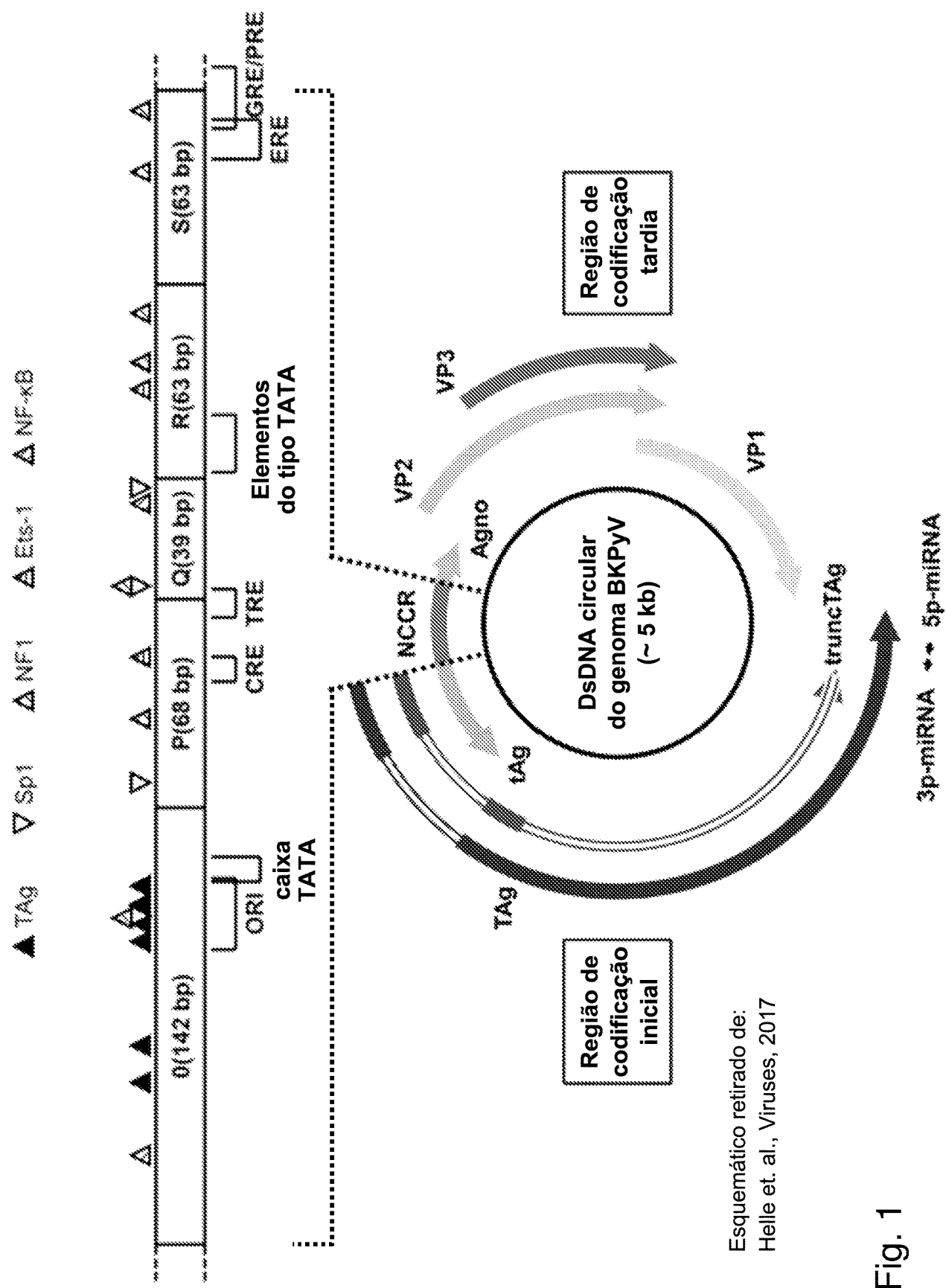
11. Método de administração de um oligonucleotídeo antissentido a um indivíduo, para hibridização com uma sequência de RNA complementar em uma célula renal do referido indivíduo, o método **caracterizado** pelo fato de que o oligonucleotídeo antissentido é um oligonucleotídeo, conforme definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 5 ou 12.

12. Oligonucleotídeo antissentido compreendendo uma modificação que torna um duplex do oligonucleotídeo antissentido e o mRNA alvo resistente à ação de RNase H, **caracterizado** pelo fato de que o oligonucleotídeo antissentido compreende a sequência de SEQ ID N°: 1; SEQ ID N°: 2; SEQ ID N°: 3; SEQ ID N°: 4; SEQ ID N°: 5; SEQ ID N°:

6; SEQ ID N°: 7; SEQ ID N°: 8; SEQ ID N°: 9; SEQ ID N°: 10; SEQ ID N°: 11; SEQ ID N°: 12; SEQ ID N°: 13; SEQ ID N°: 14; SEQ ID N°: 15; SEQ ID N°: 16; SEQ ID N°: 17; SEQ ID N°: 18; SEQ ID N°: 20; SEQ ID N°: 21; SEQ ID N°: 22; SEQ ID N°: 23; SEQ ID N°: 24; SEQ ID N°: 25; SEQ ID N°: 26 ou SEQ ID N°: 27, com nenhuma, uma ou duas incompatibilidades.

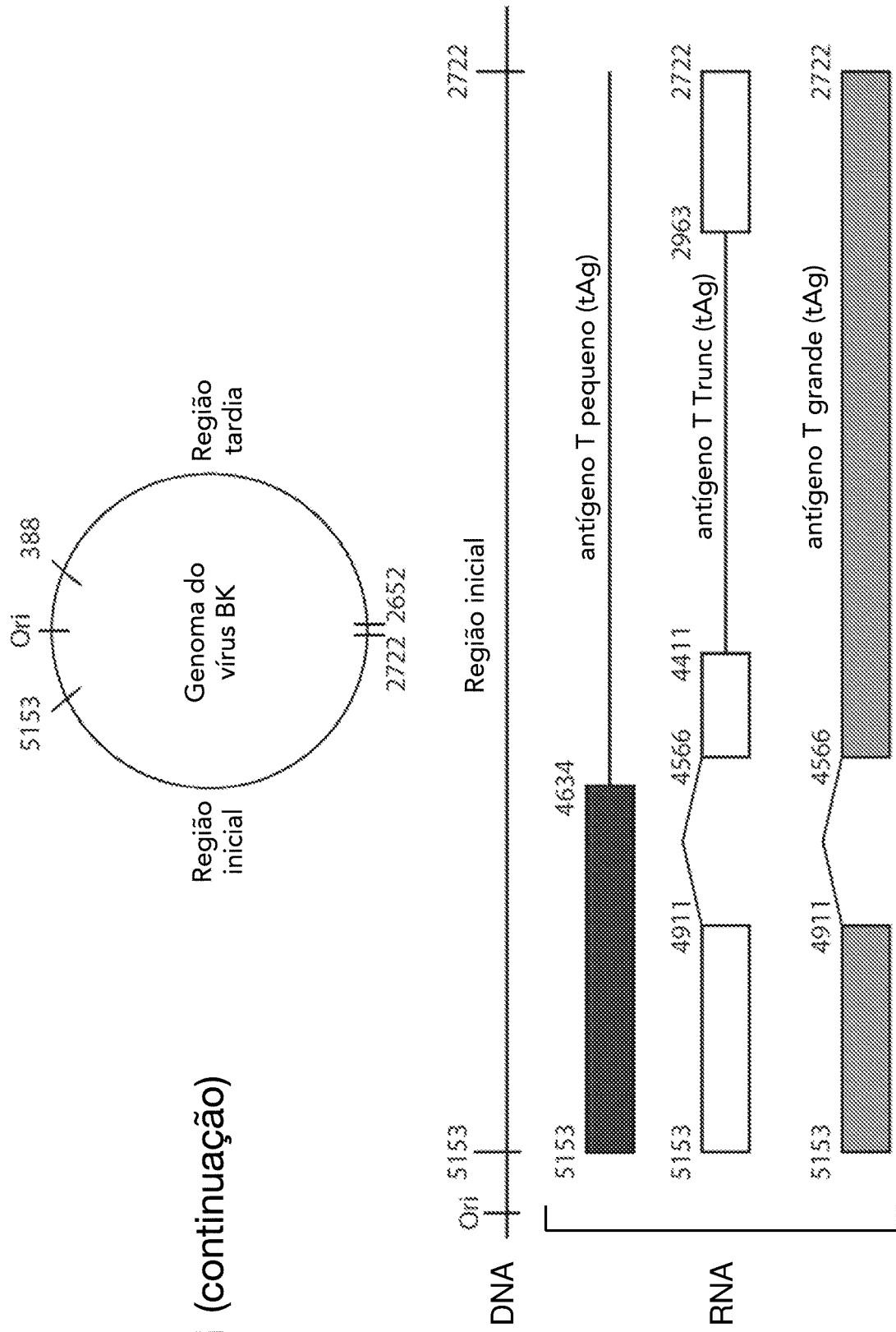
13. Método para inibir a replicação de um poliomavírus em uma célula, o método **caracterizado** pelo fato de que compreende fornecer à referida célula com um oligonucleotídeo antissentido de 12 a 30 nucleotídeos de comprimento que compreendem uma sequência que é o complemento reverso de um trecho contíguo de pelo menos 12 nucleobases de um pré-mRNA do antígeno T grande de poliomavírus e cujo oligonucleotídeo antissentido pode modular o splicing do referido pré-mRNA do antígeno T grande.

14. Método, de acordo com a reivindicação 13, **caracterizado** pelo fato de que o referido oligonucleotídeo antissentido é um oligonucleotídeo antissentido conforme definido em uma das reivindicações de 1 a 5 ou 12.



Esquemático retirado de:
Helle et. al., Viruses, 2017

Fig. 1



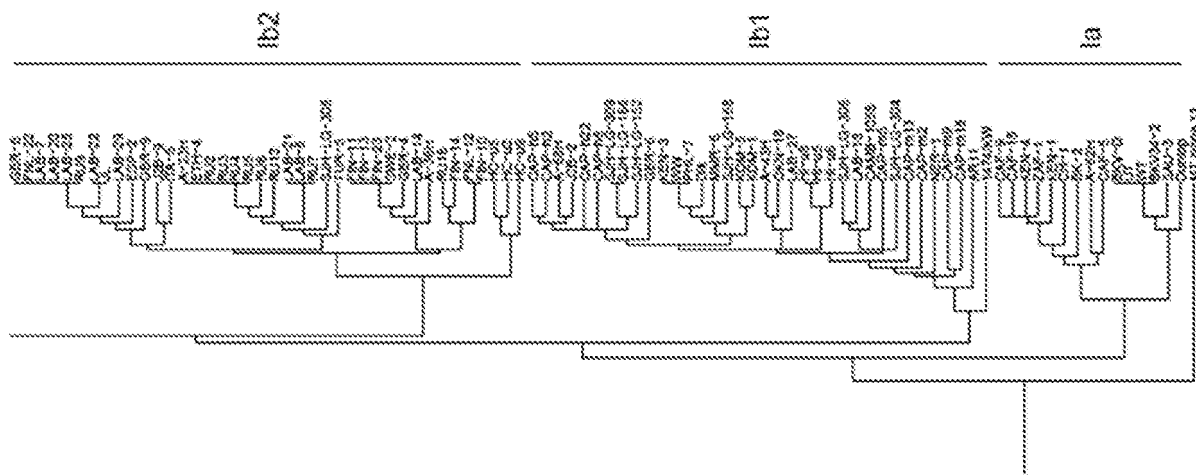
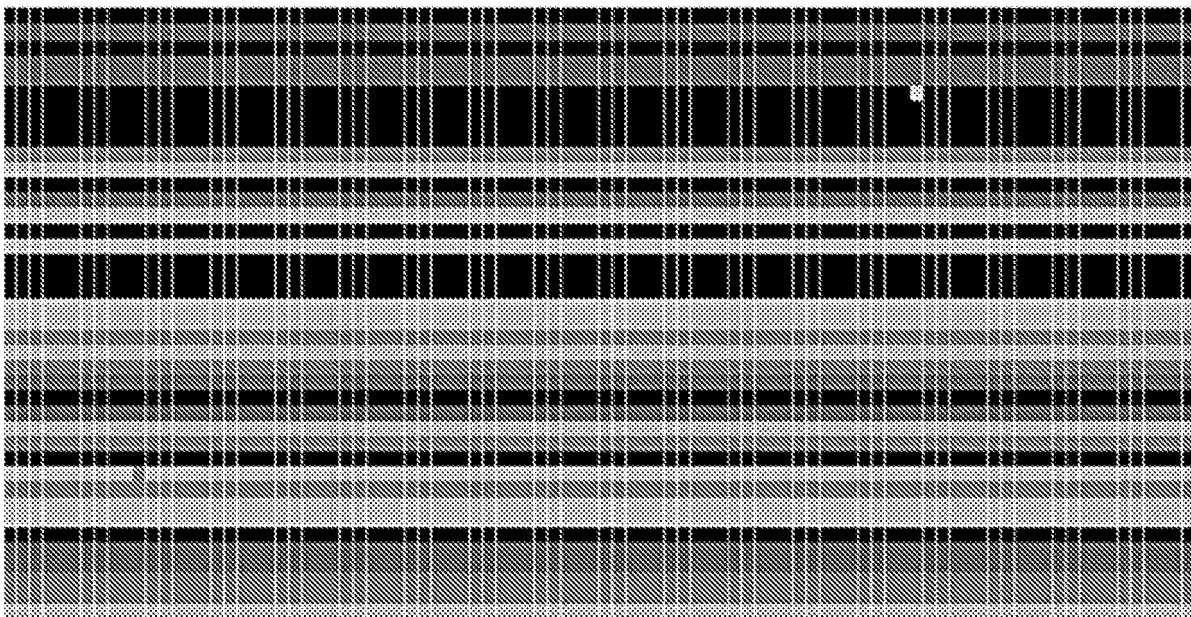
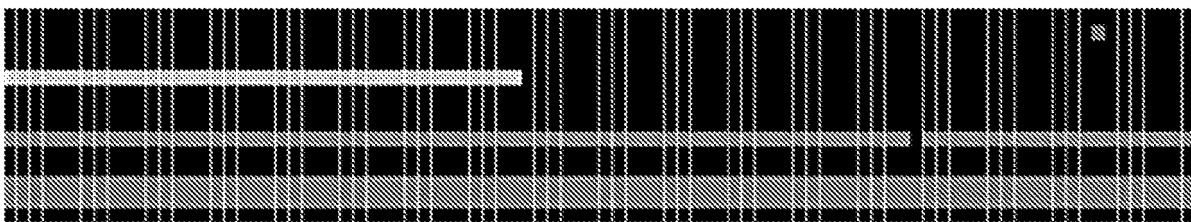
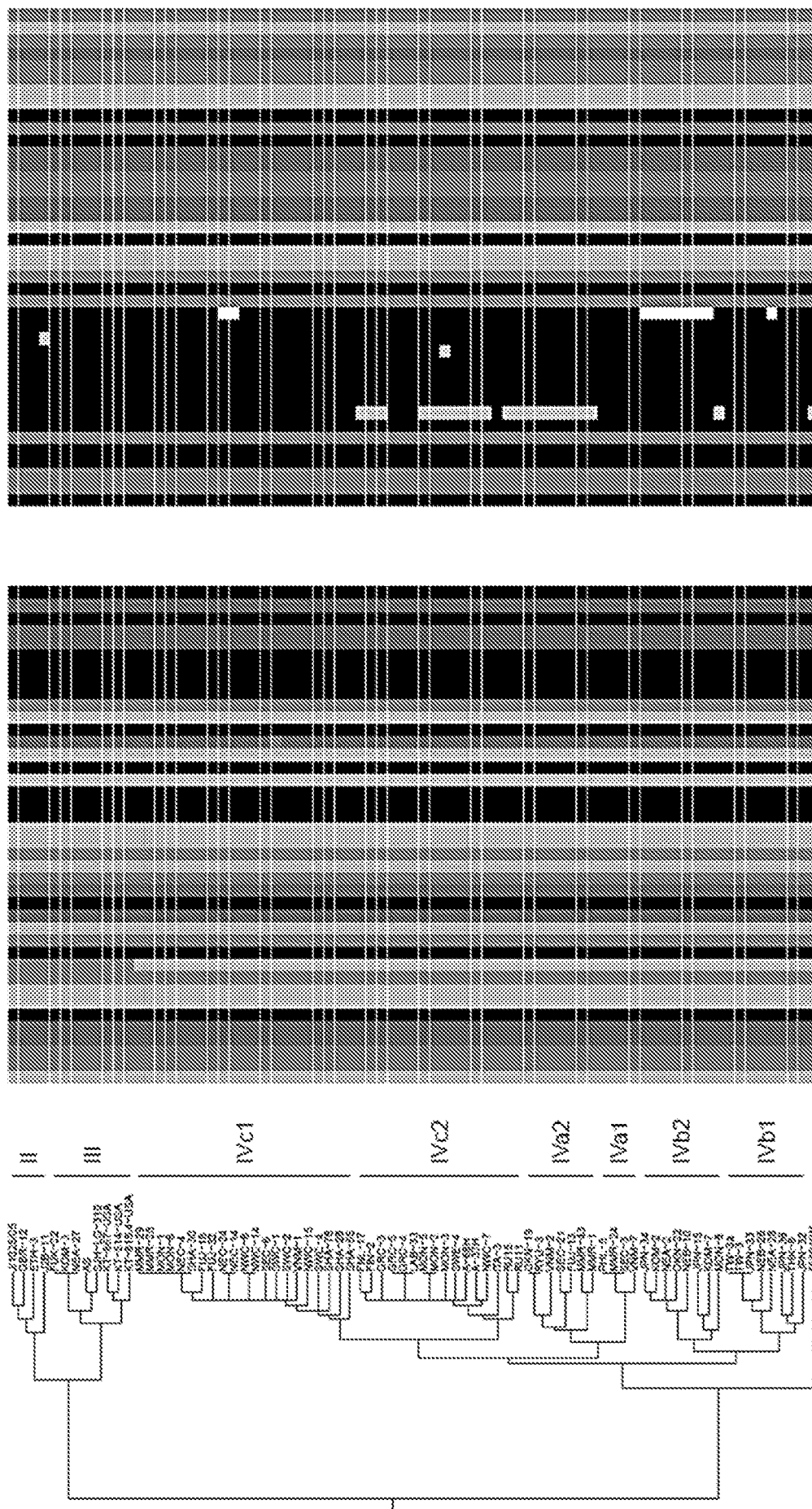


Fig. 2 (2)

Fig. 2 (3)



Nome	Sequência	Alvo local de emenda em Tag
Misturado	G*C*A*C*C*U*C*U*G*C*G*U*C*C*U*A*G*A*U	Sem segmentação
AON #1	A*C*C*U*C*U*G*A*G*C*U*A*C*U*C*C*A*G*G*U	Doador (exon 1)
AON #2	A*C*A*A*A*C*C*U*C*U*G*A*G*C*U*A*C*U*C*C	Doador (exon 1)
AON #3	C*A*G*C*A*C*A*A*A*C*C*U*C*U*G*A*G*C*U*A	Doador (exon 1)
AON #4	U*C*C*A*U*A*G*G*U*U*G*G*C*A*C*C*U*A*G*A	Aceitador (exon 2)
AON #5	U*G*U*U*C*C*A*U*A*G*G*U*U*G*G*C*A*C*C*U	Aceitador (exon 2)

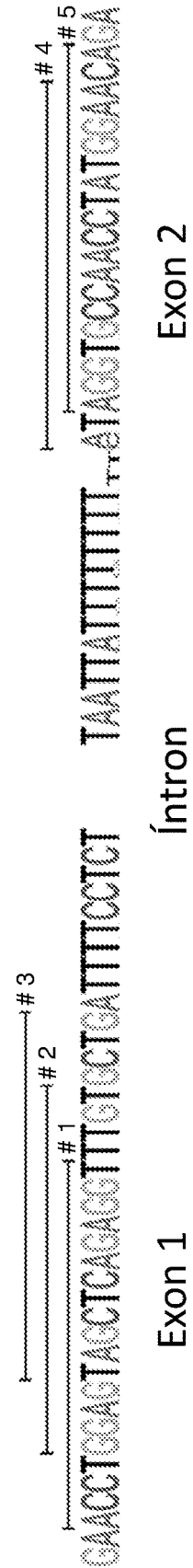


Fig. 3

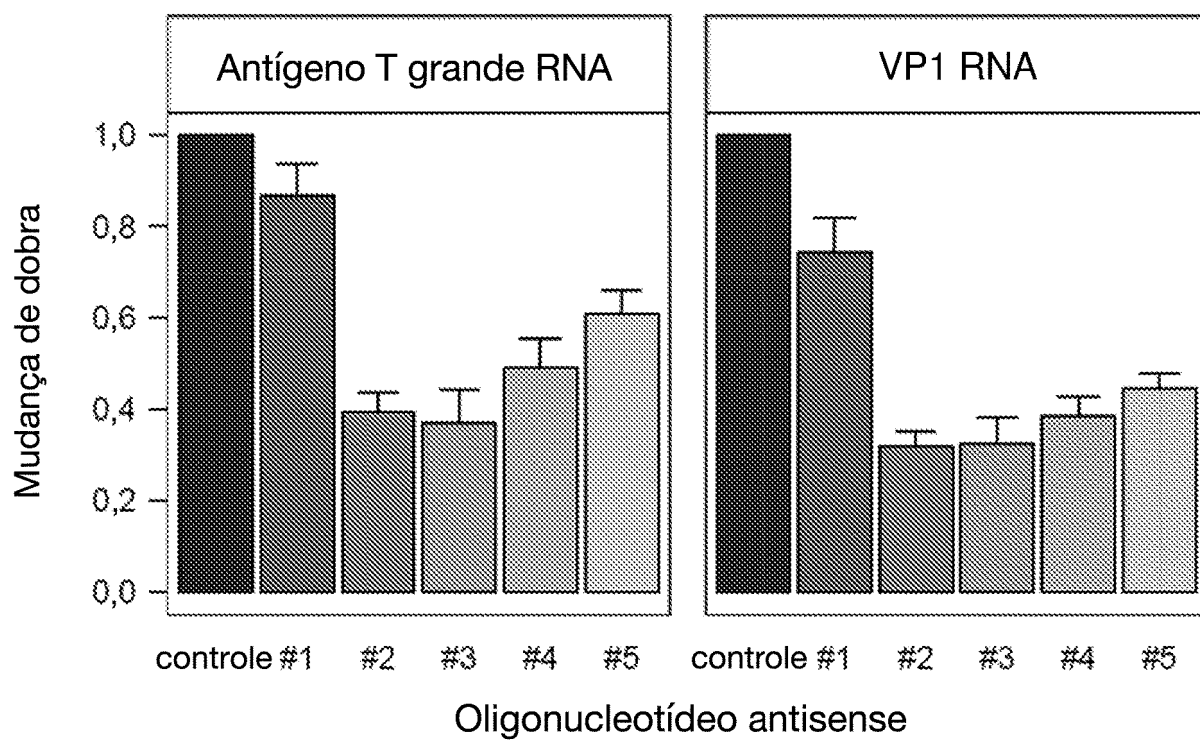


Fig. 4

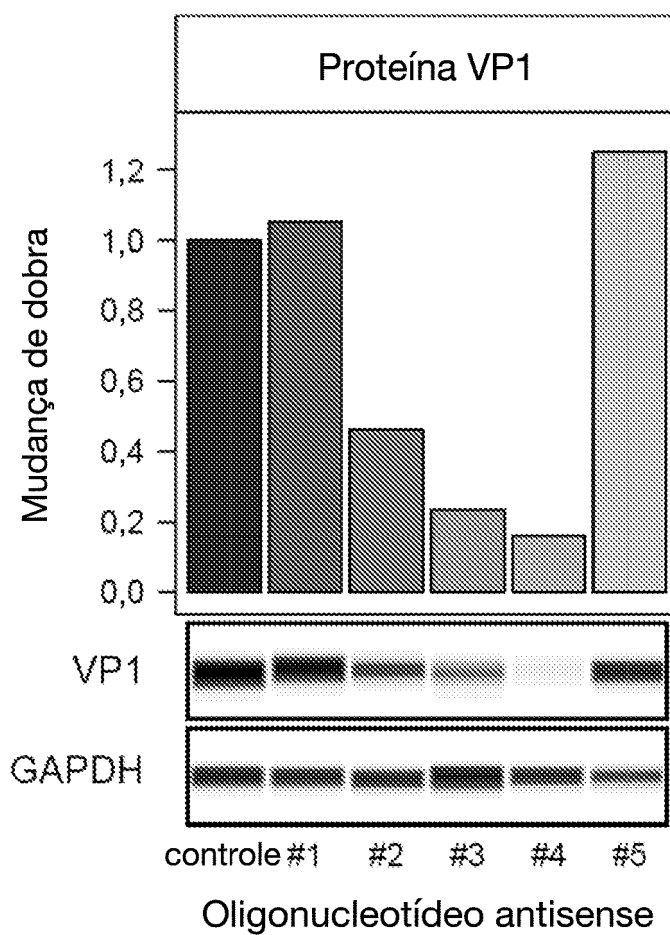


Fig. 5

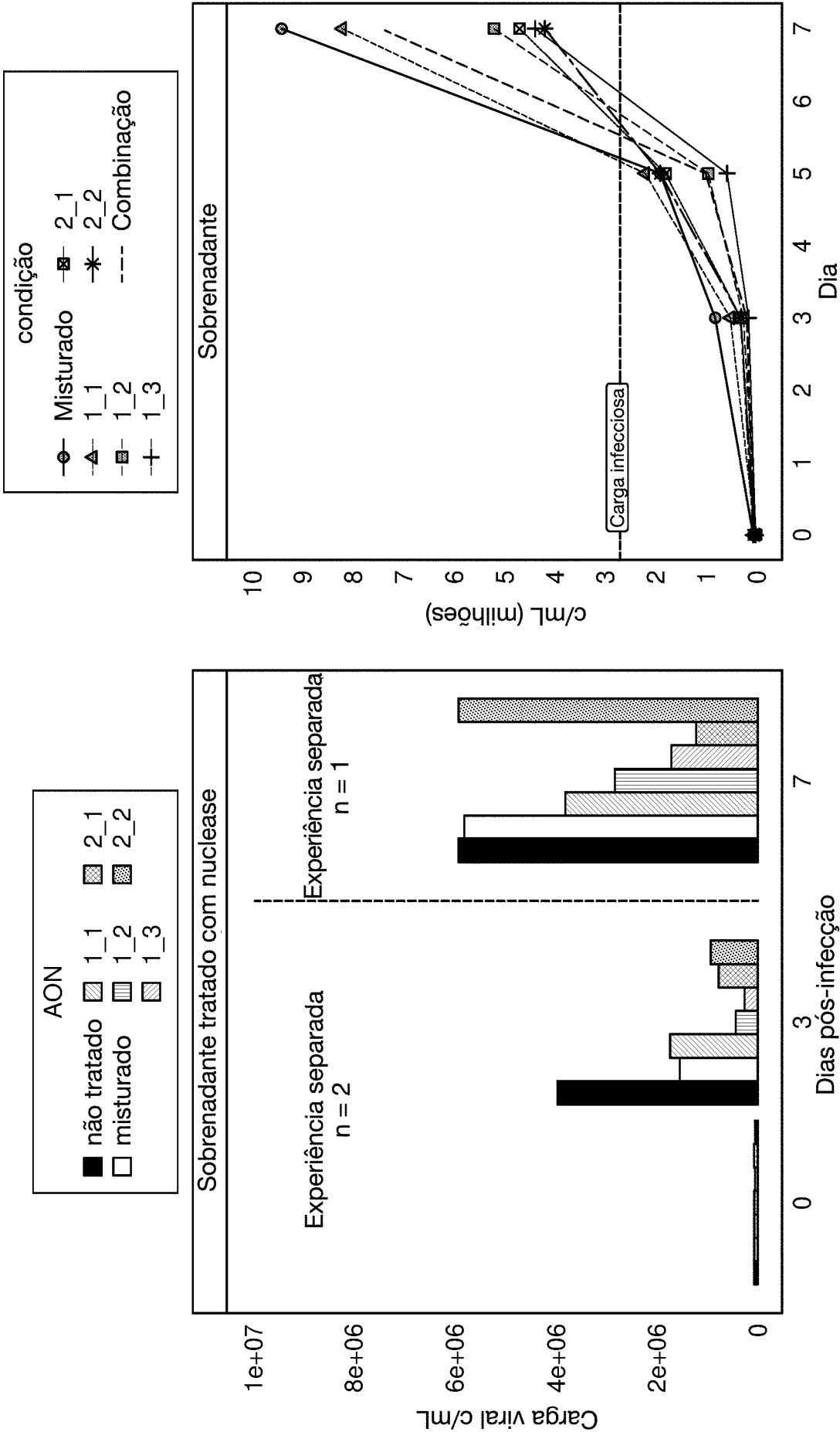


Fig. 6

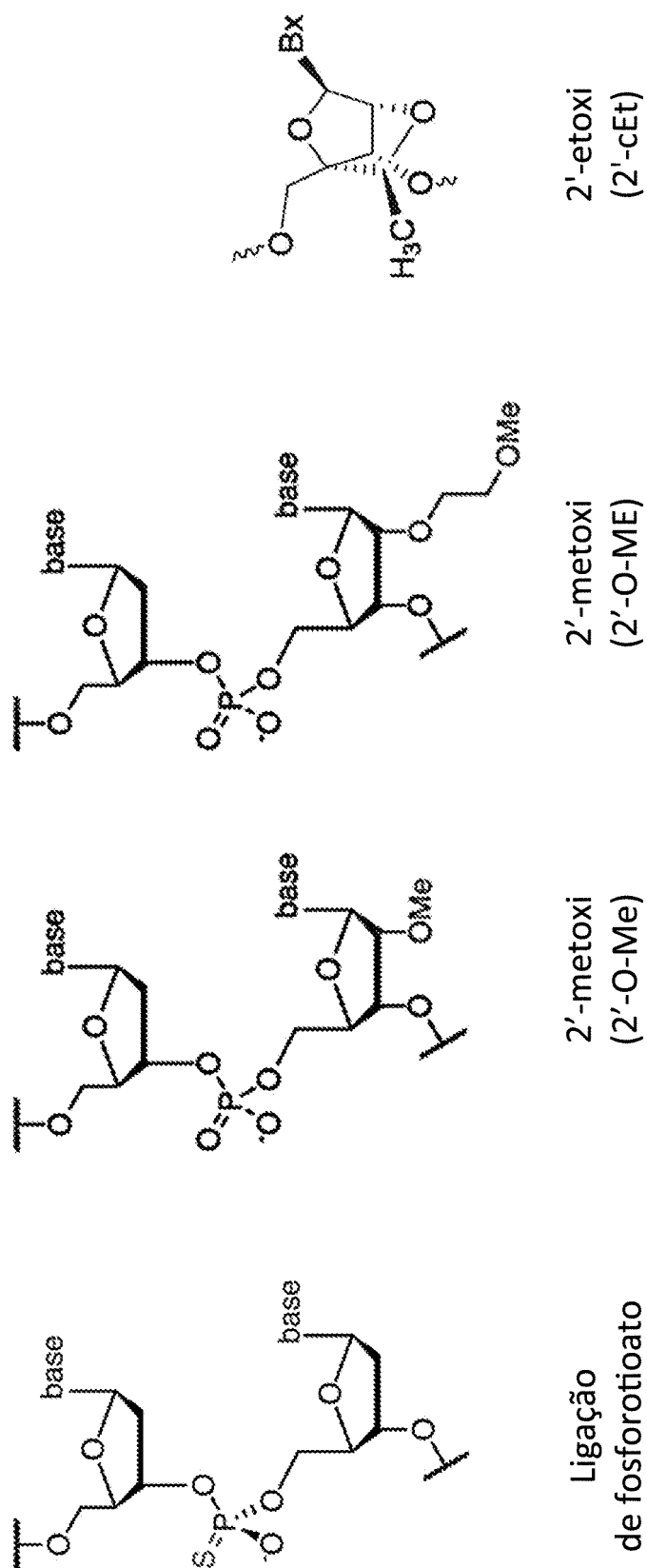


Fig. 7

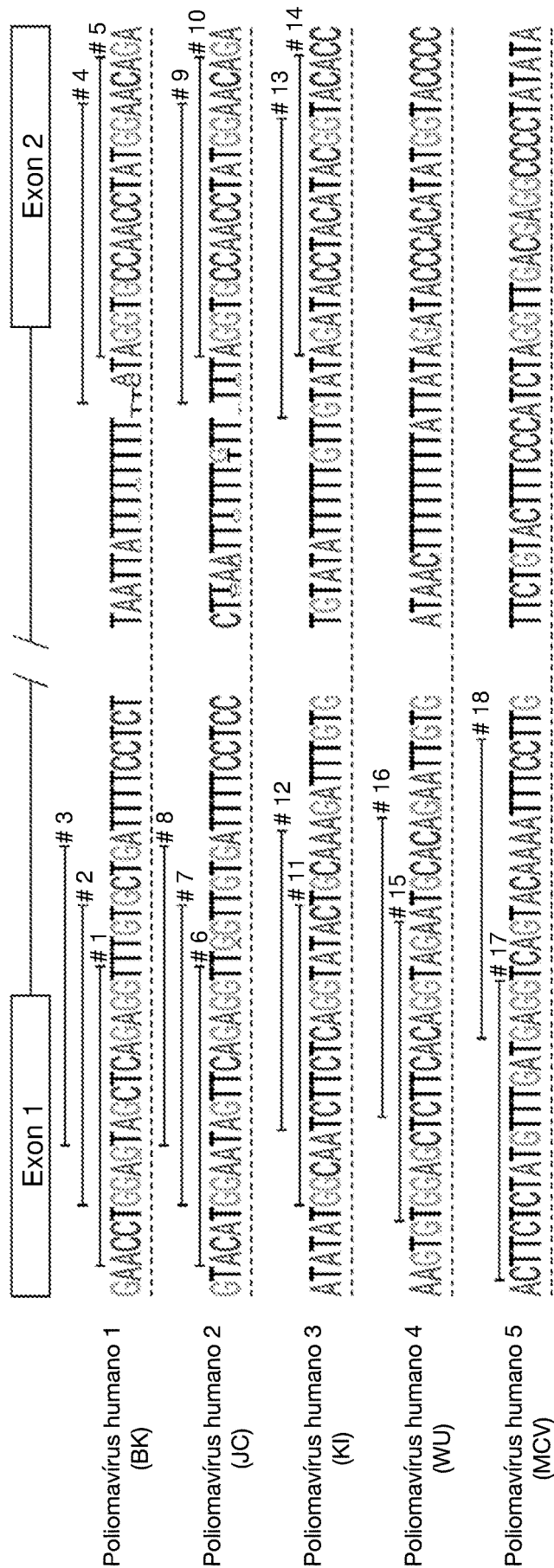


Fig. 9

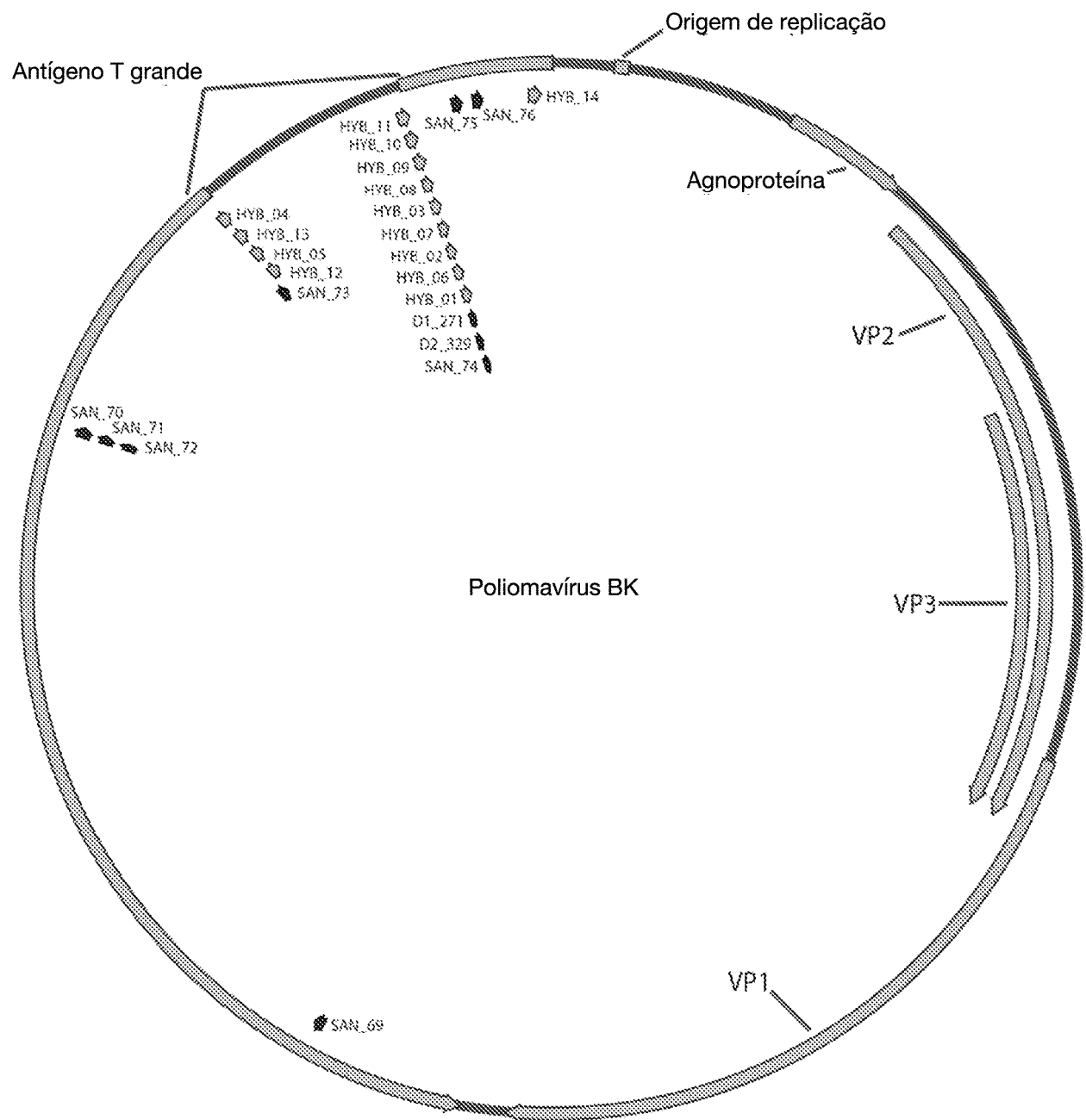


Fig. 10 (1)

AON	Localização	Sequência
HYB_01	4909..4928	ACCUCUGAGCUACUCCAGGU
HYB_02	4905..4924	ACAAACCUCUGAGCUACUCC
HYB_03	4901..4920	CAGCACAAACCUCUGAGCUA
HYB_04	4549..4568	UGUUCCAUAAGGUUGGCACCU
HYB_05	4552..4571	UCCAUAAGGUUGGCACCUAUA
HYB_06	4907..4926	AAACCUCUGAGCUACUCCAG
HYB_07	4903..4922	GCACAAACCUCUGAGCUACU
HYB_08	4899..4918	AUCAGCACAAACCUCUGAGC
HYB_09	4897..4916	AAAUCAGCACAAACCUCUGA
HYB_10	4895..4914	GAAAAUCAGCACAAACCUCU
HYB_11	4893..4912	AGGAAAAUCAGCACAAACCU
HYB_12	4554..4573	CAUAAGGUUGGCACCUAUAAA
HYB_13	4551..4570	UCCAUAAGGUUGGCACCUAU
HYB_14	5114..5133	UGAGCUCCAUGGAUUCUUCC

Fig. 10 (2)

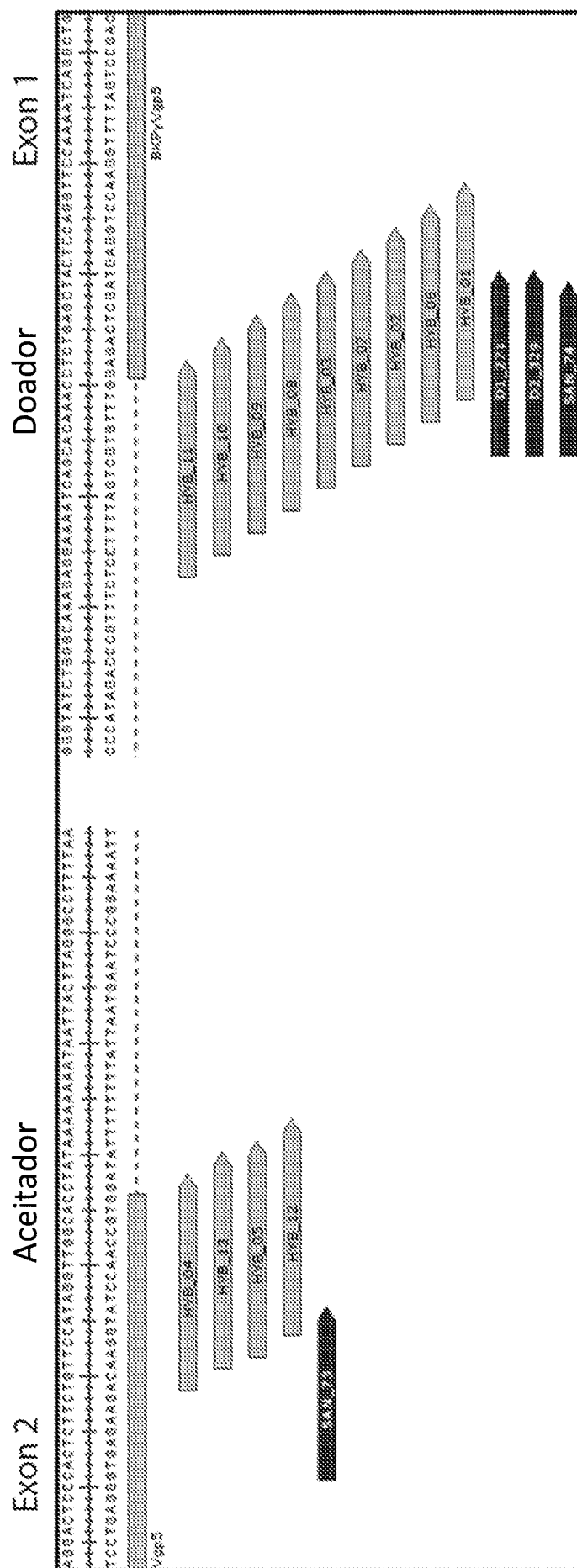


Fig. 10 (3)

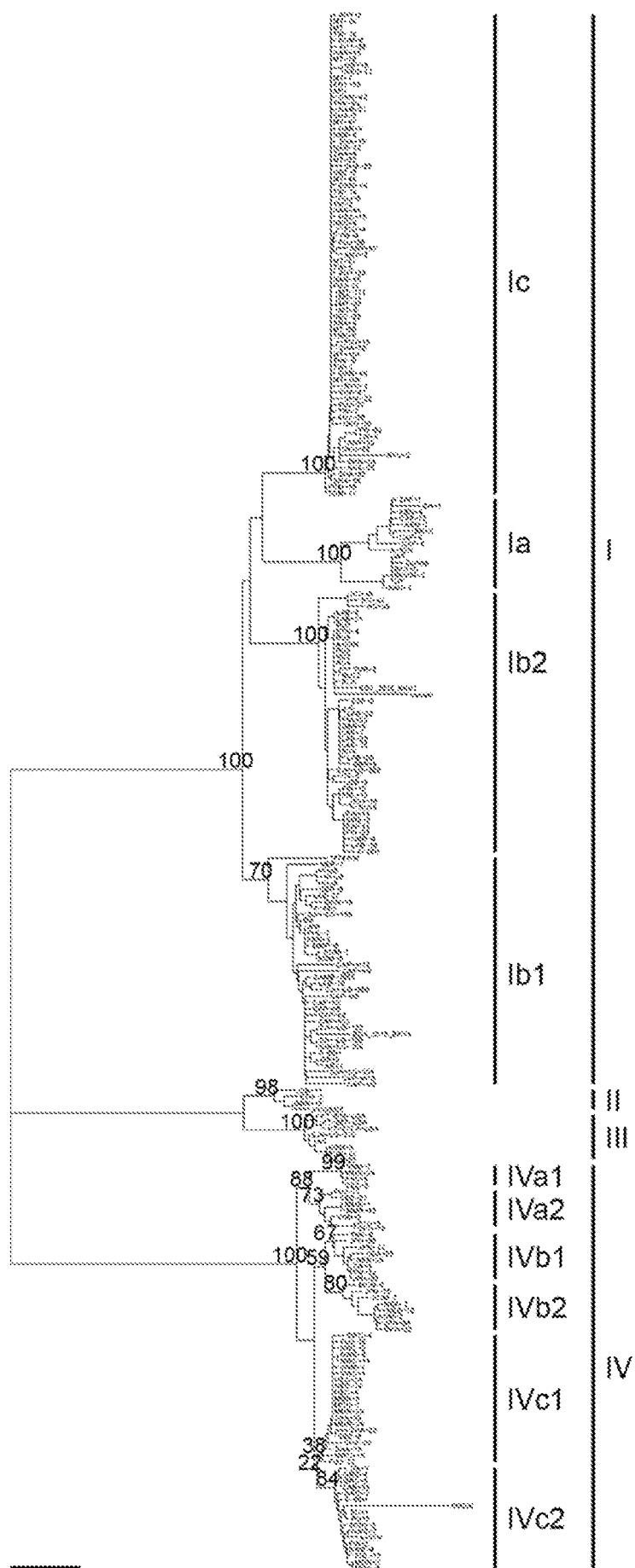


Fig. 11 (1)

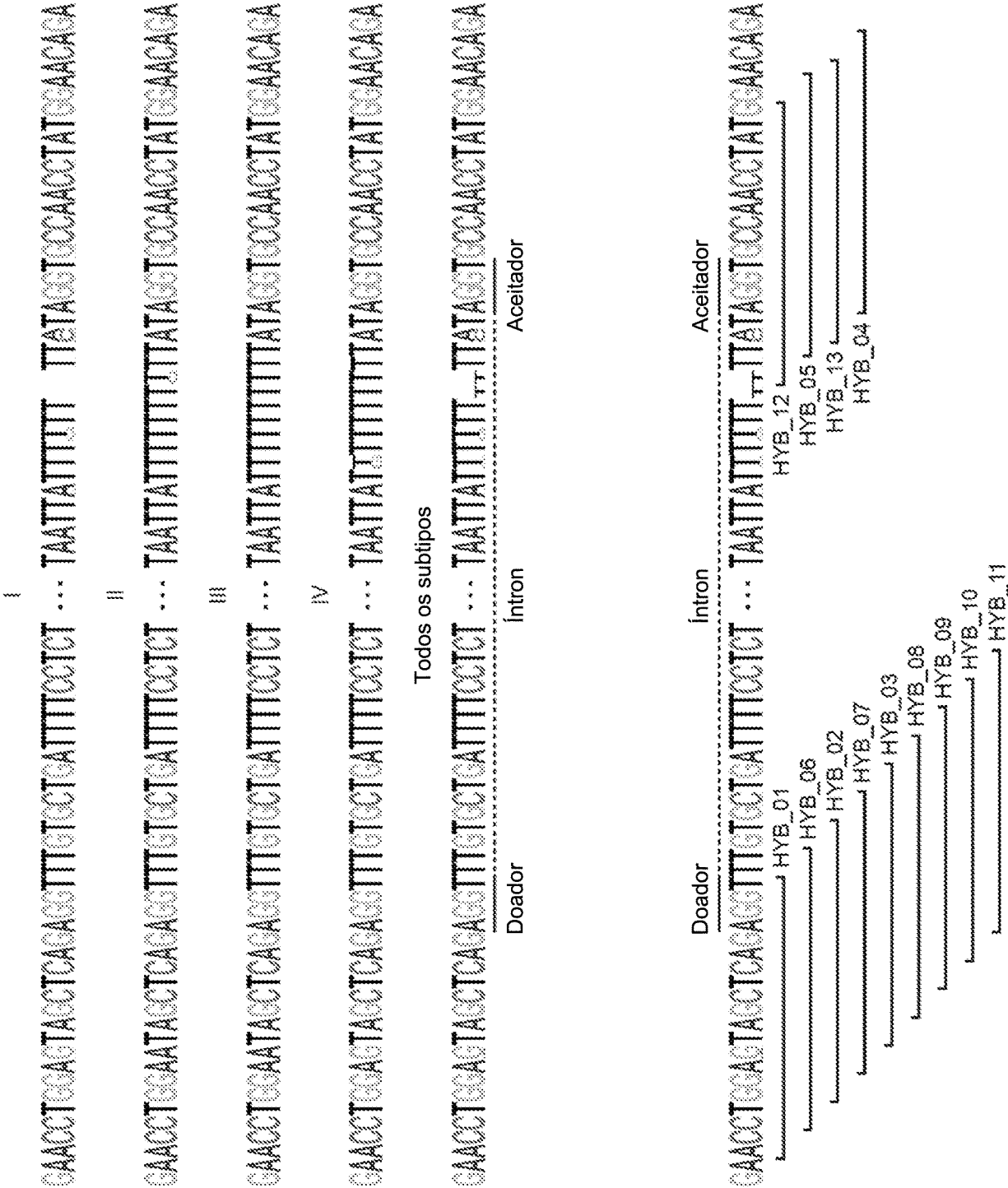


Fig. 11 (2)

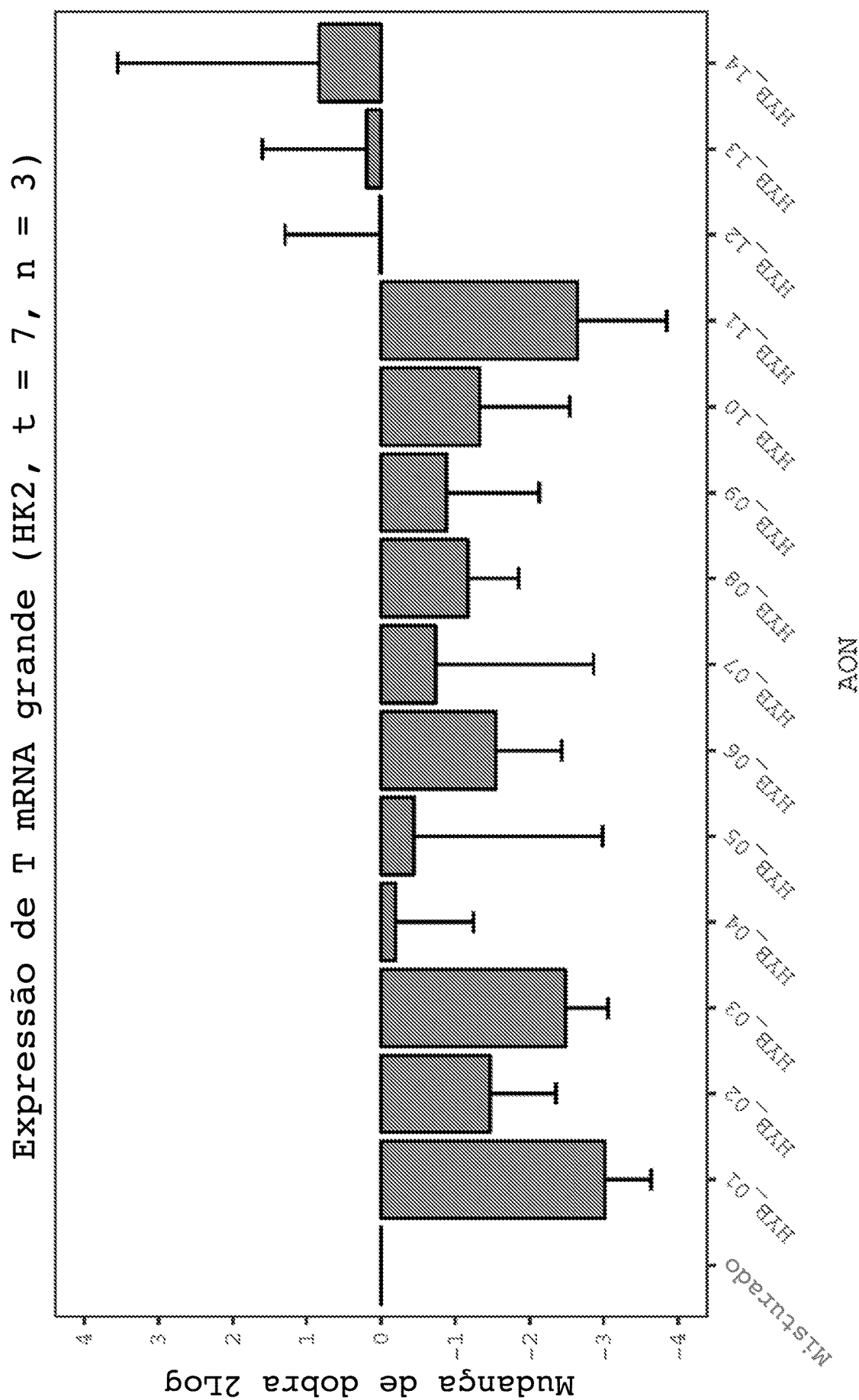


Fig. 12

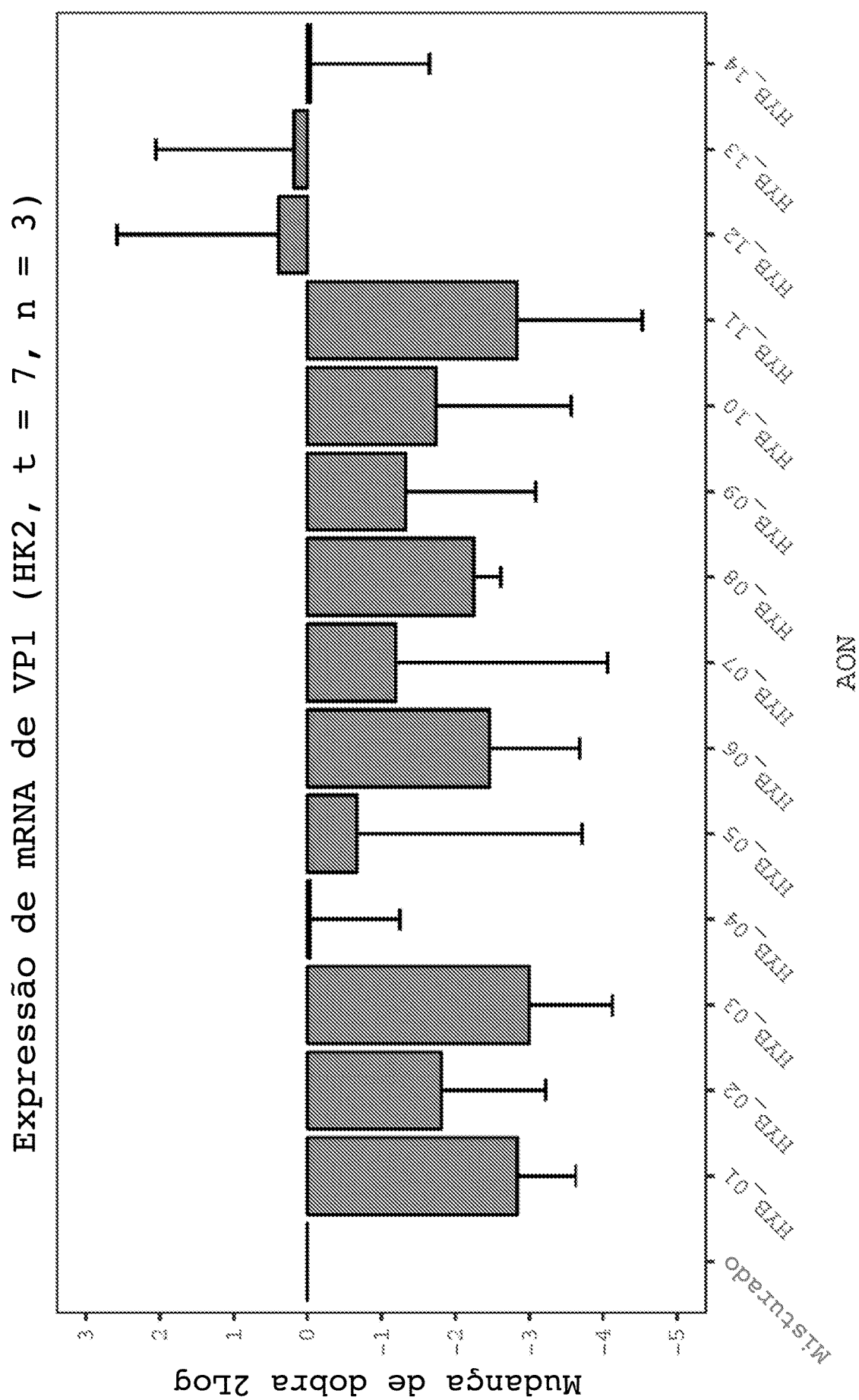


Fig. 13

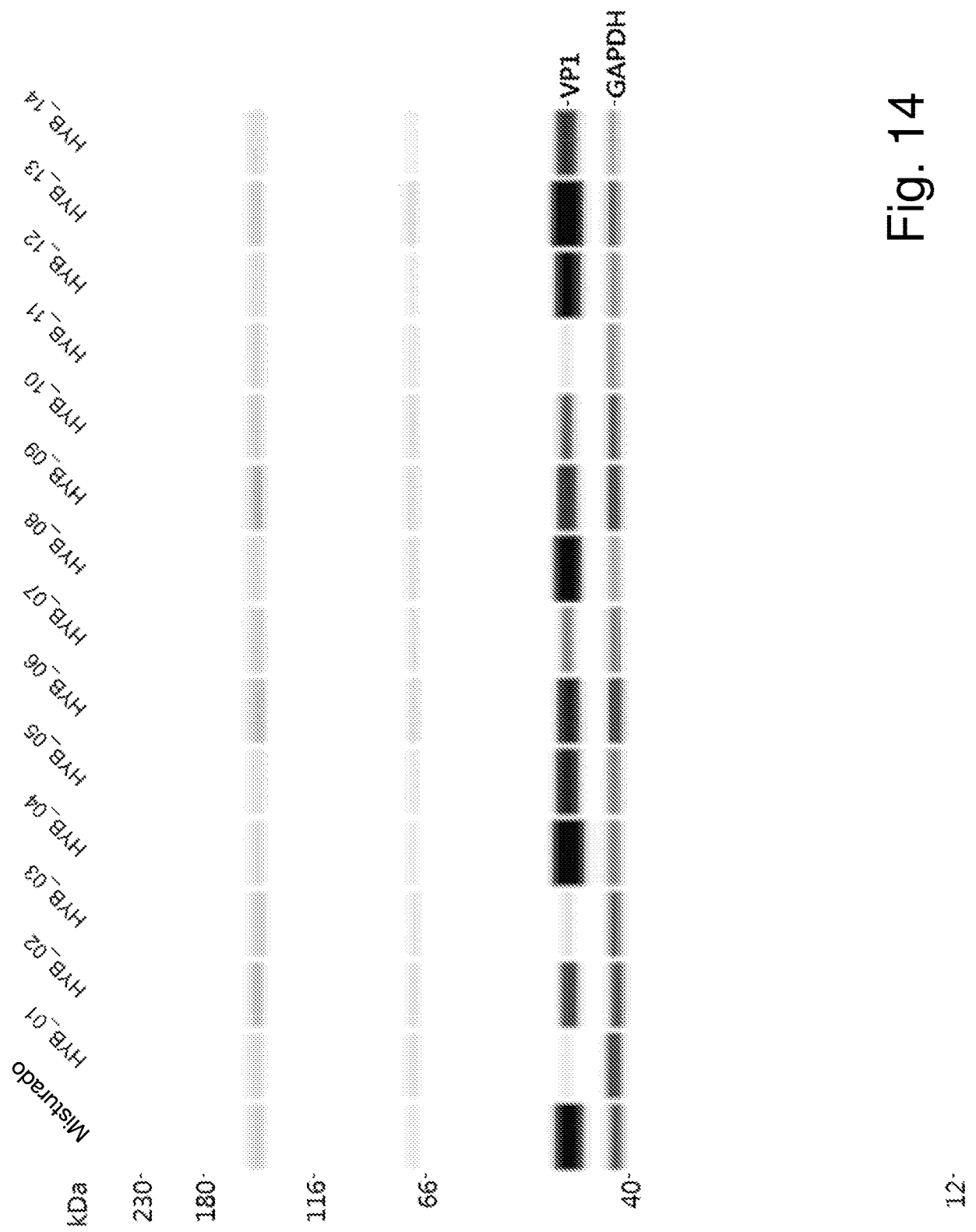


Fig. 14

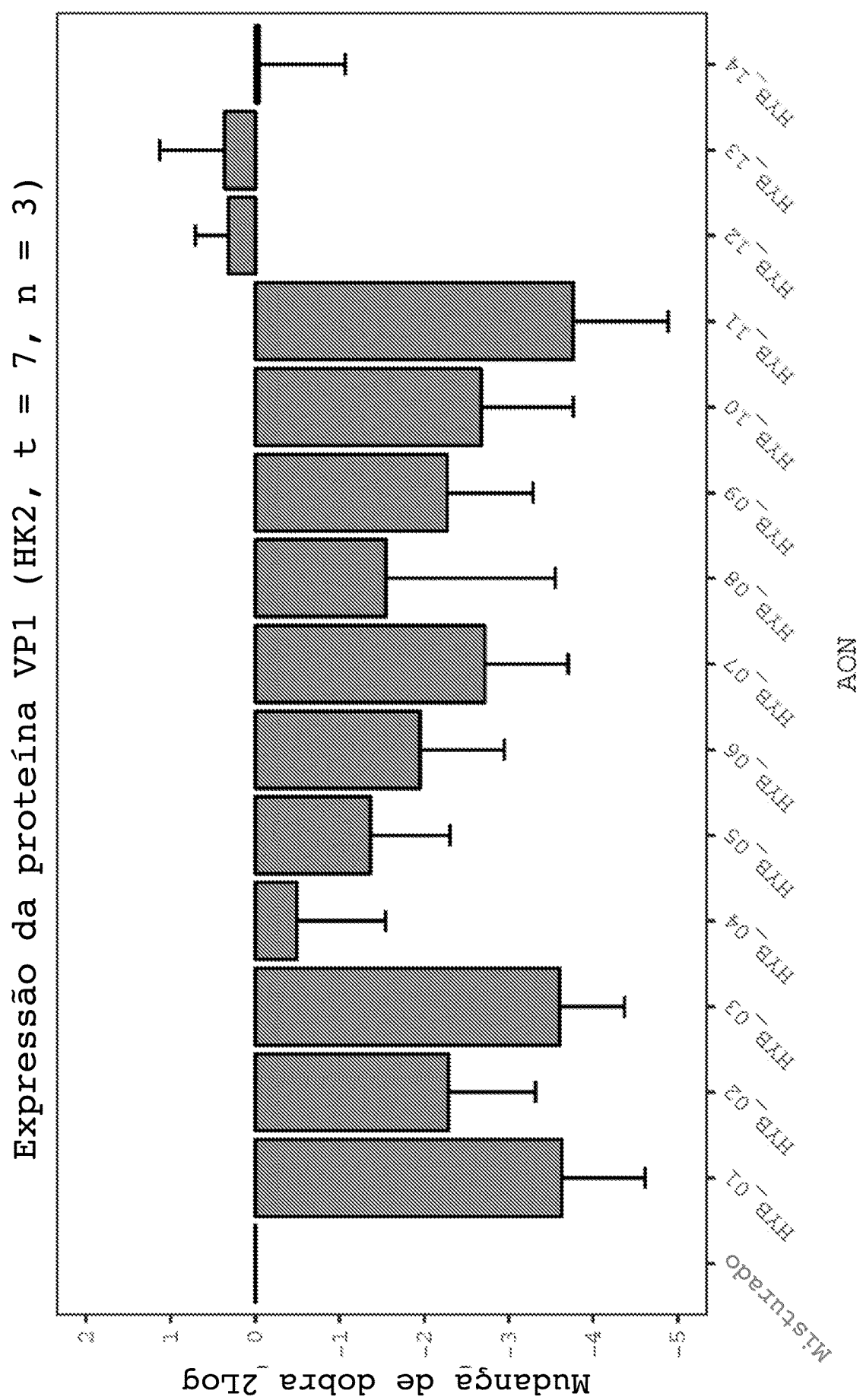


Fig. 15

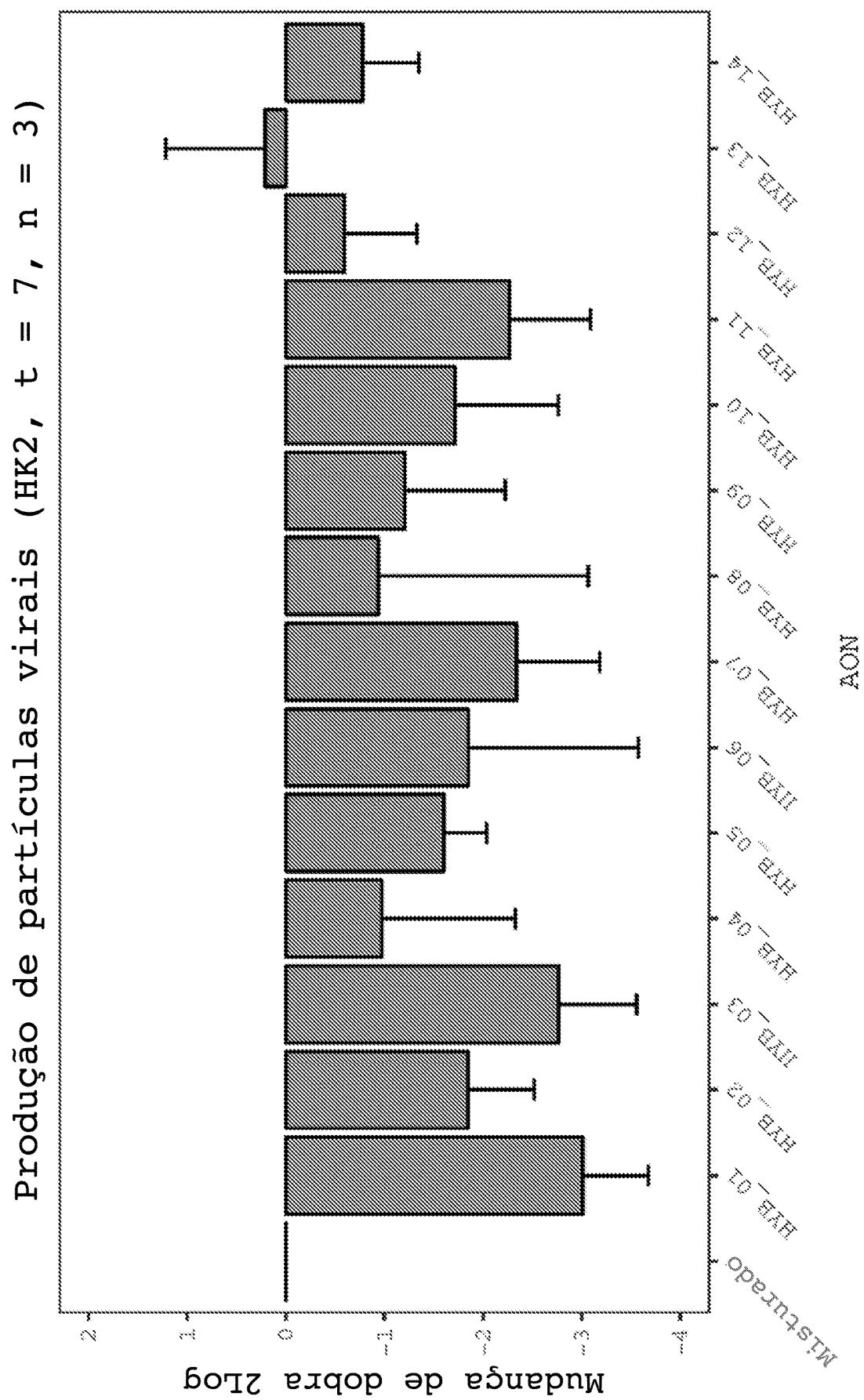


Fig. 16

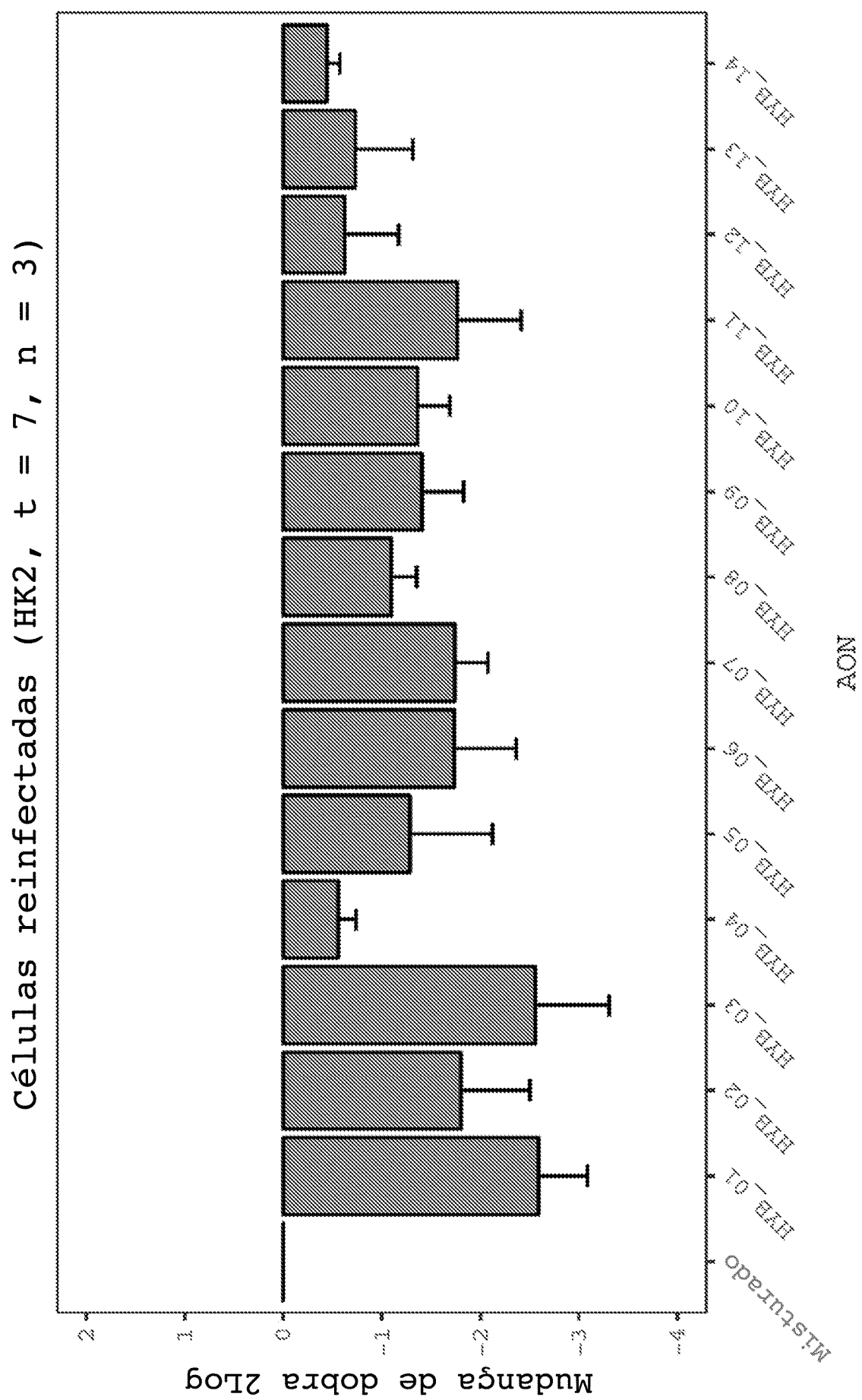


Fig. 17

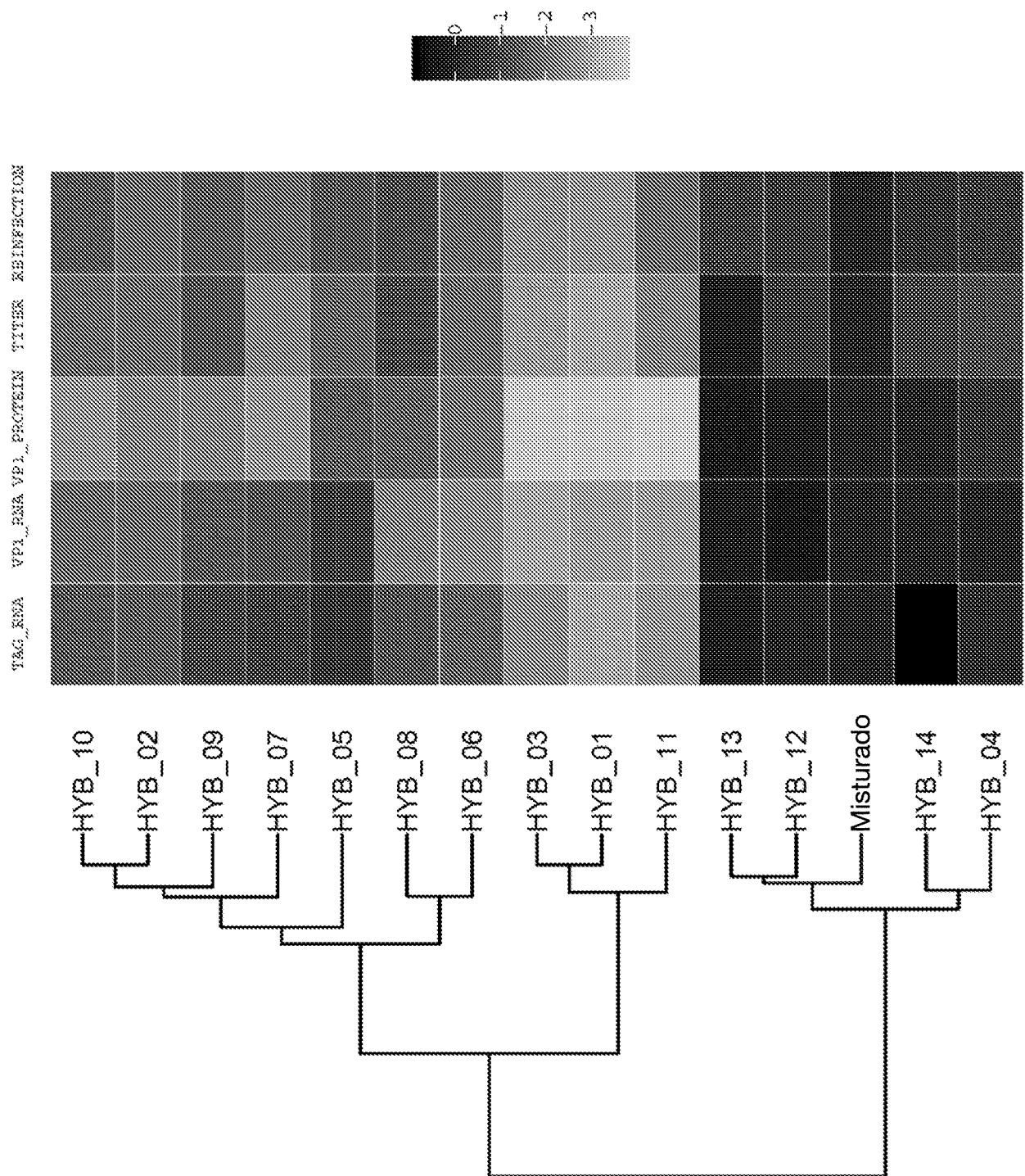


Fig. 18

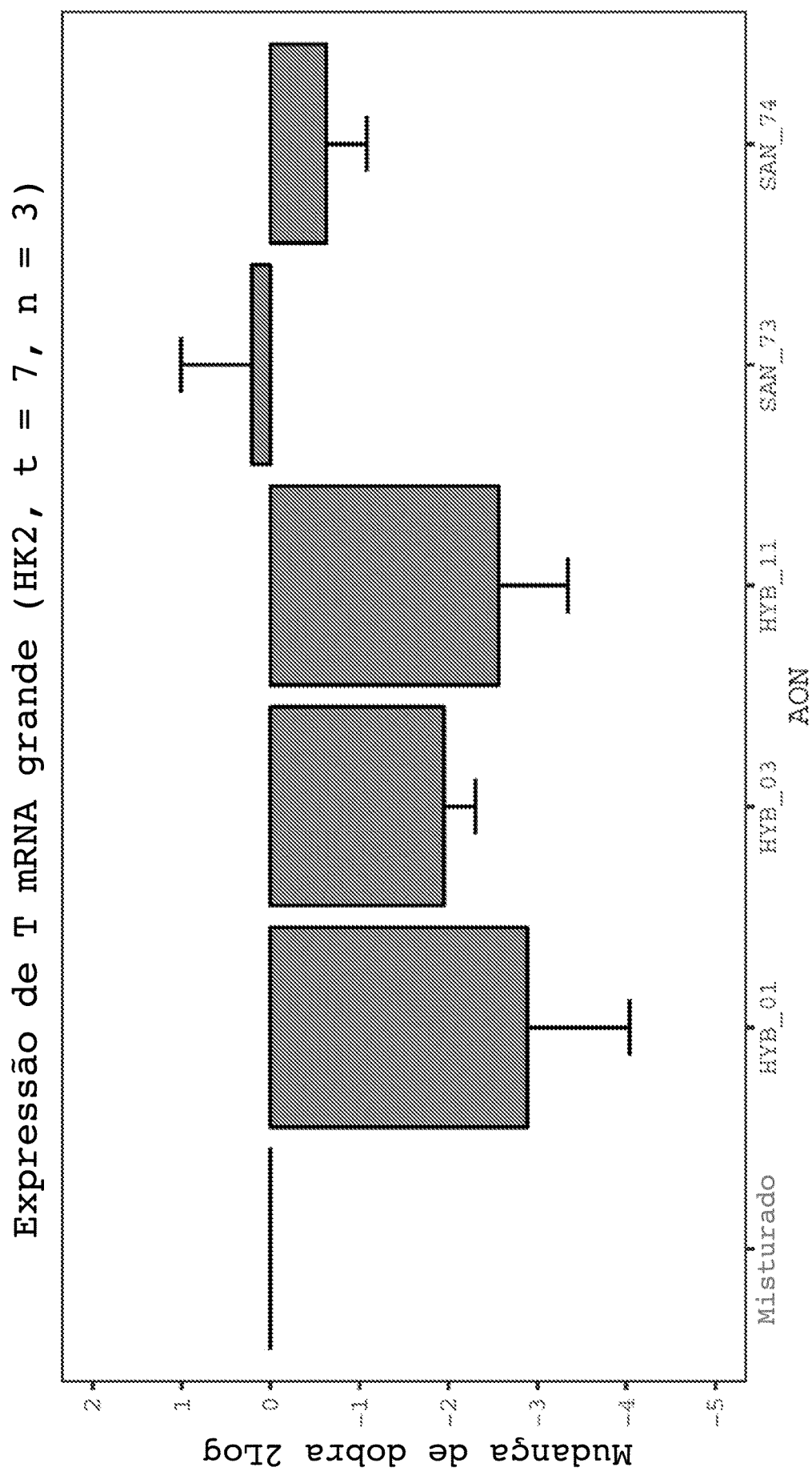


Fig. 19

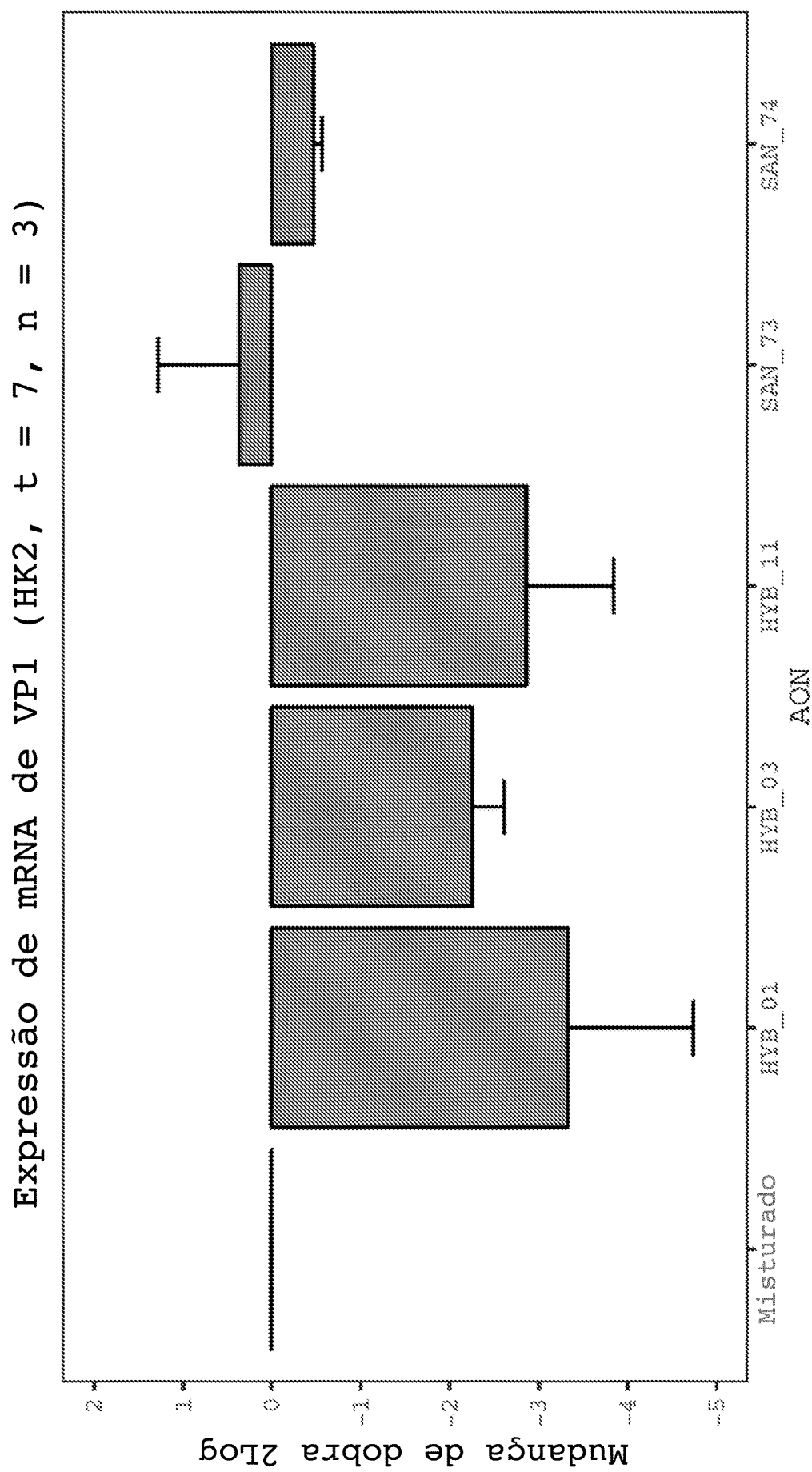


Fig. 20

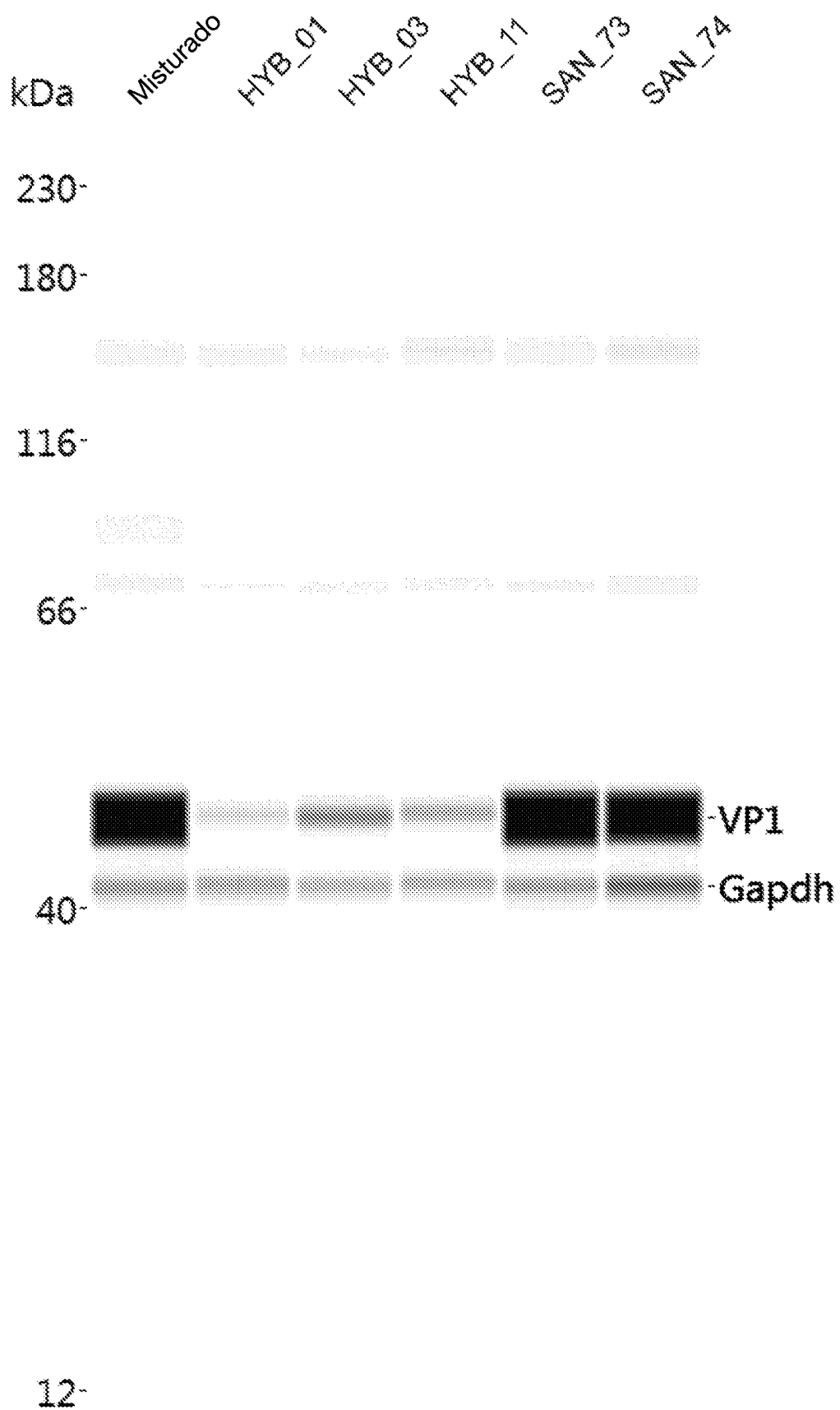


Fig. 21

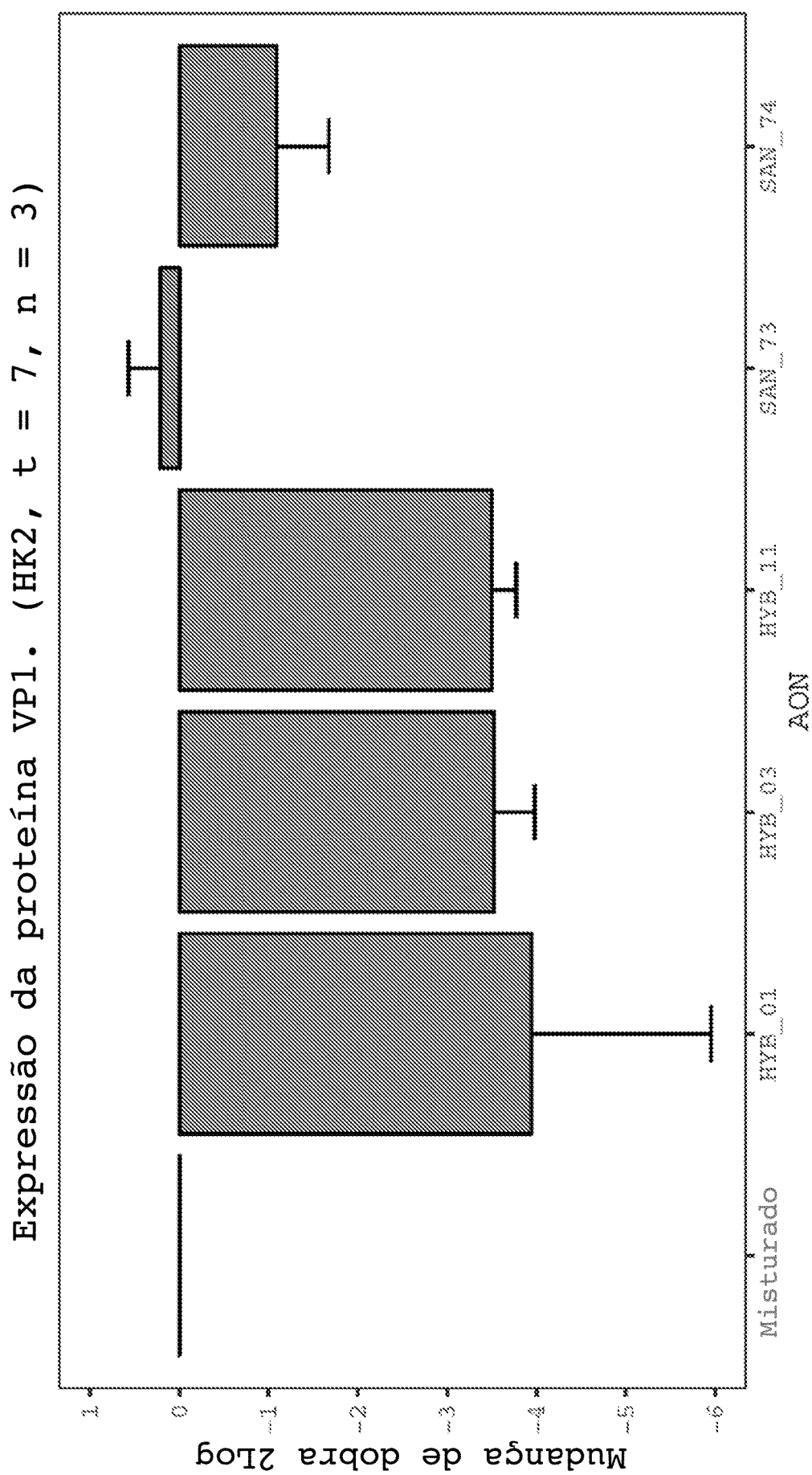


Fig. 22

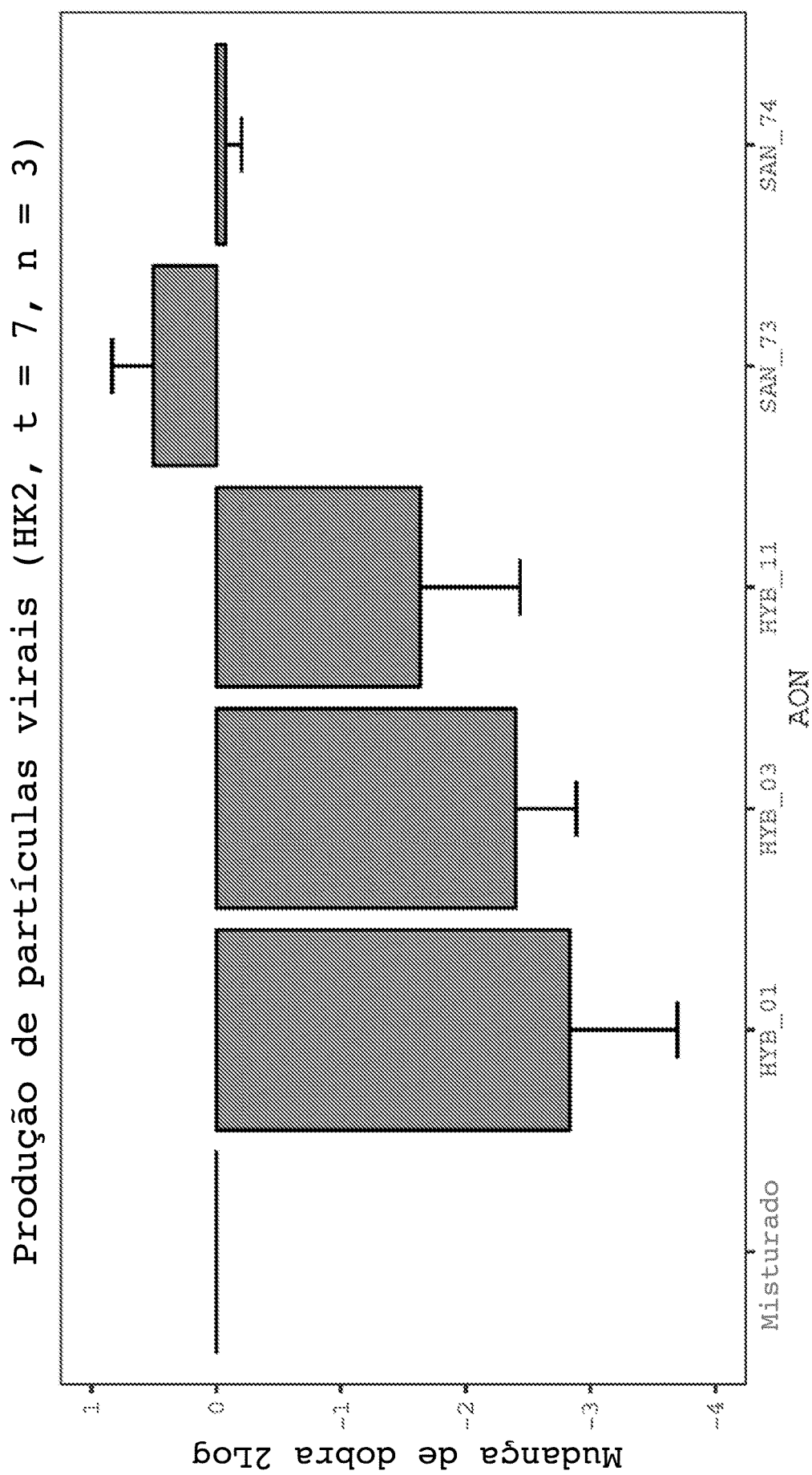


Fig. 23

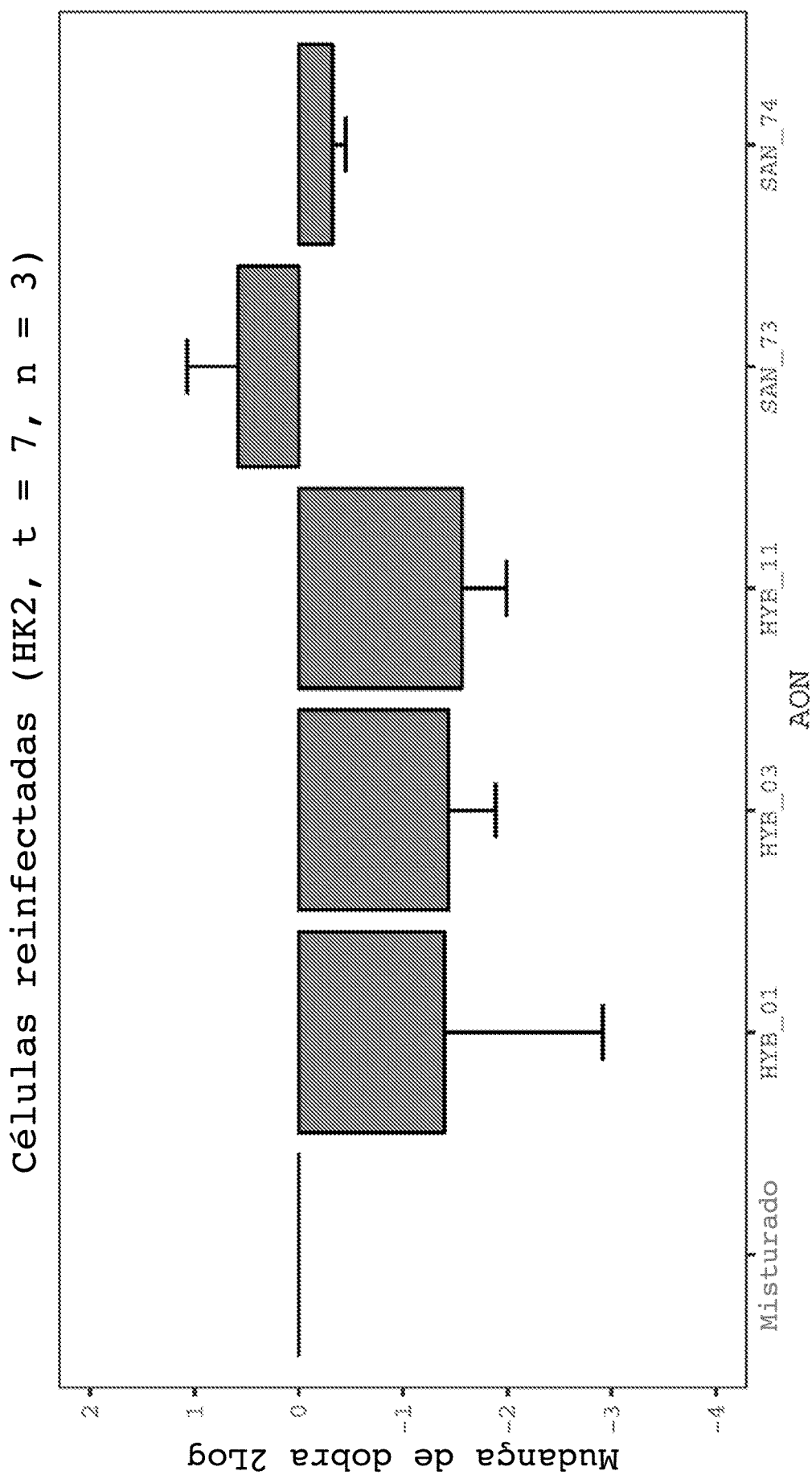


Fig. 24

TAG_RNA REINFECCÃO DO TÍTULO DA PROTEÍNA VP1_RNAVP1

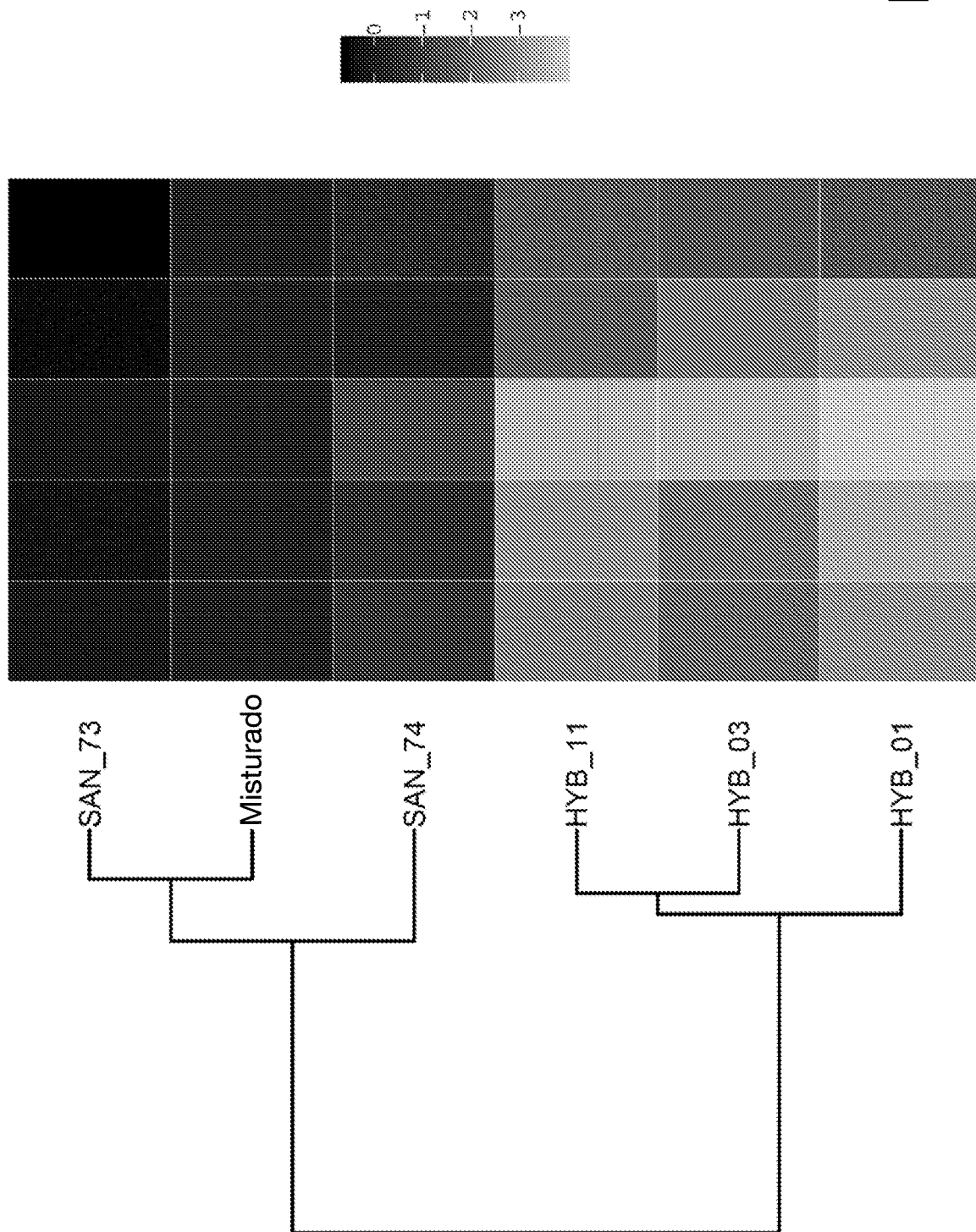


Fig. 25

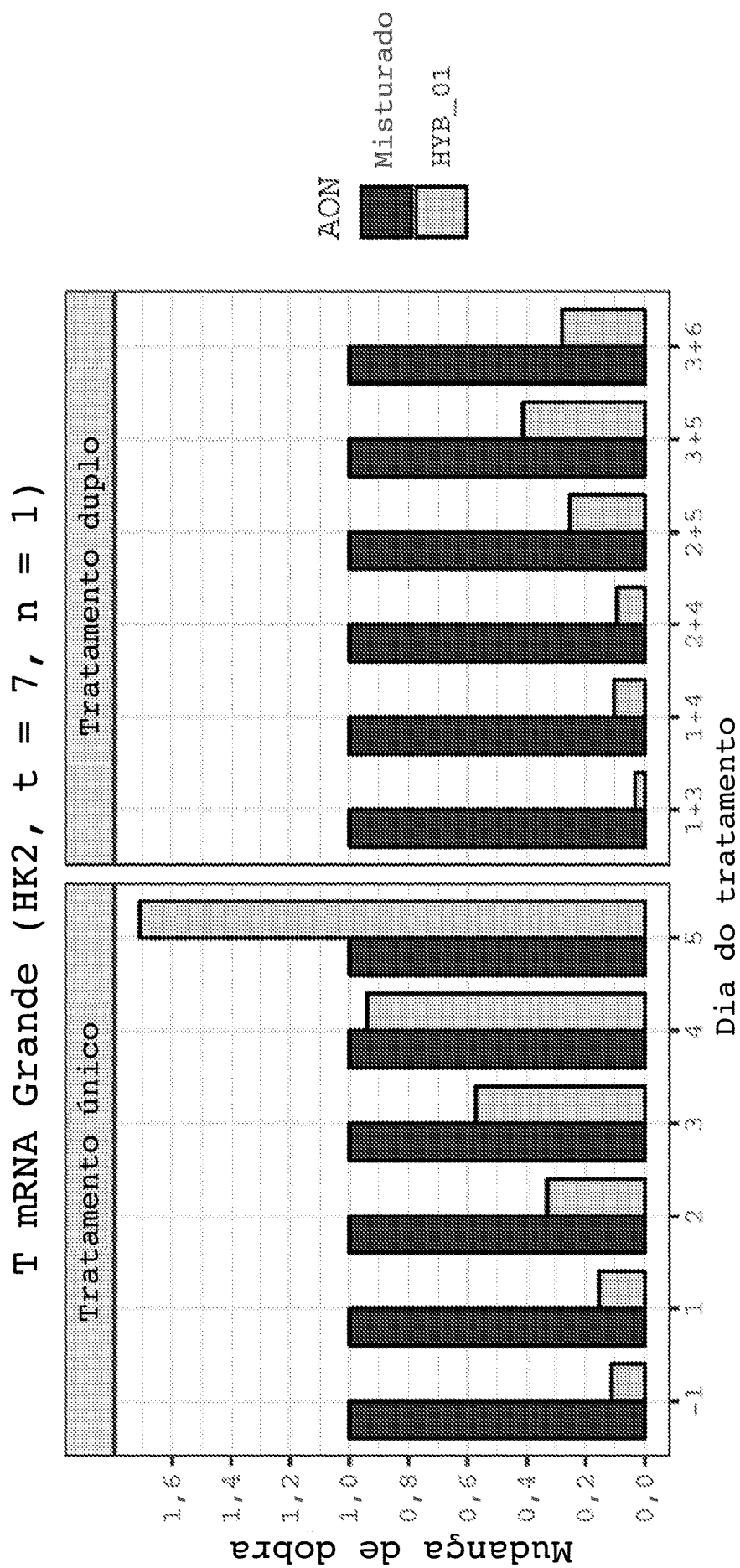


Fig. 26

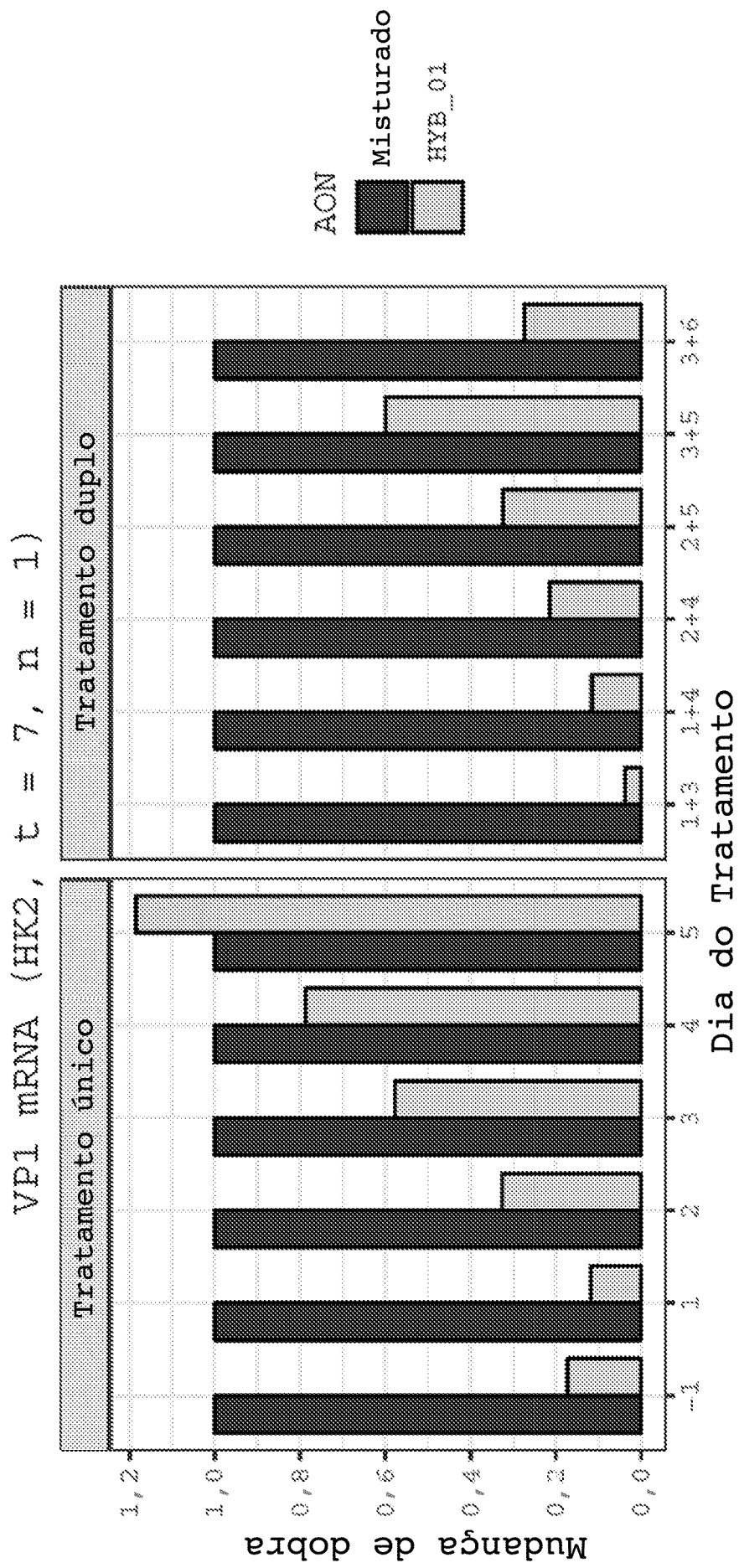


Fig. 27

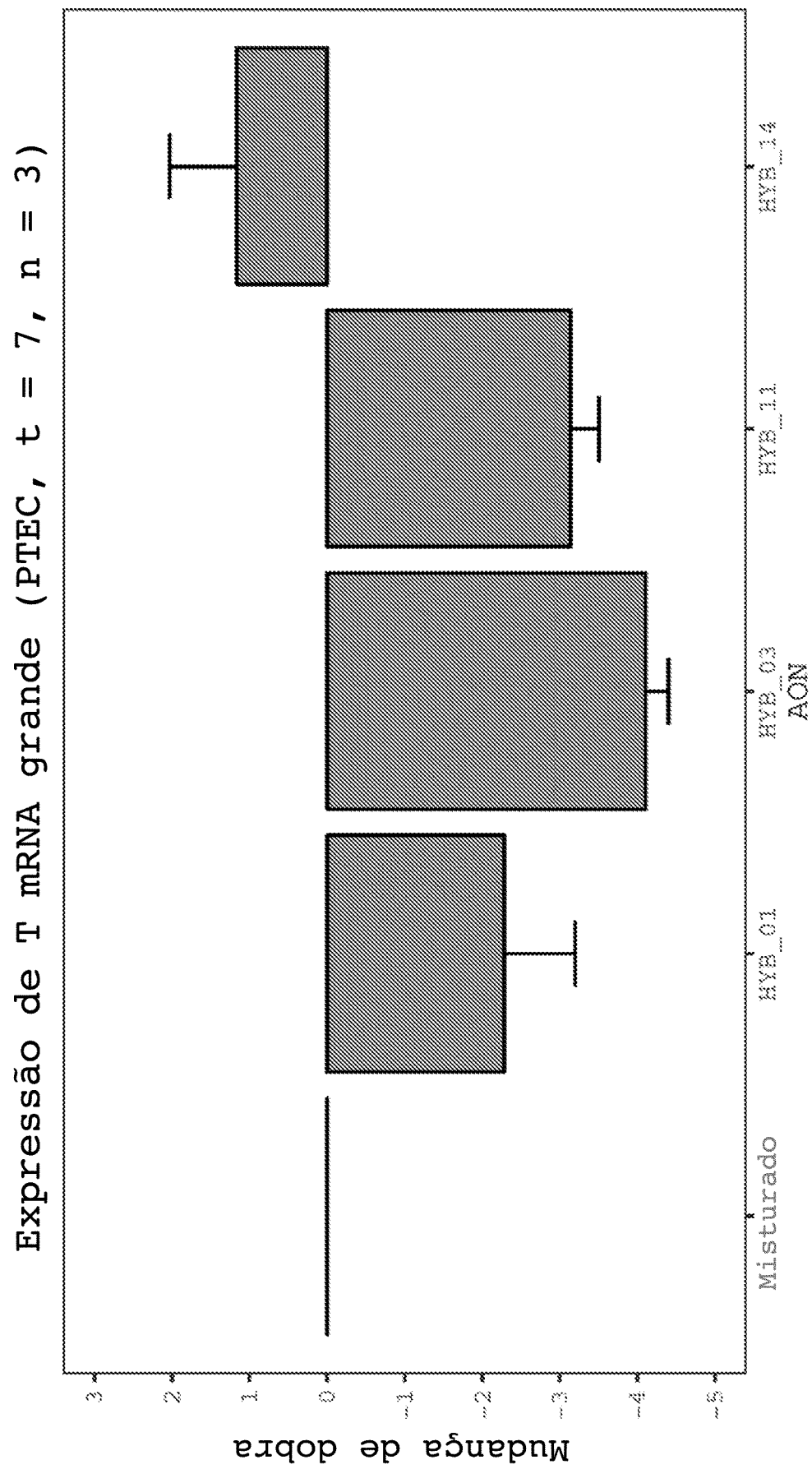


Fig. 28

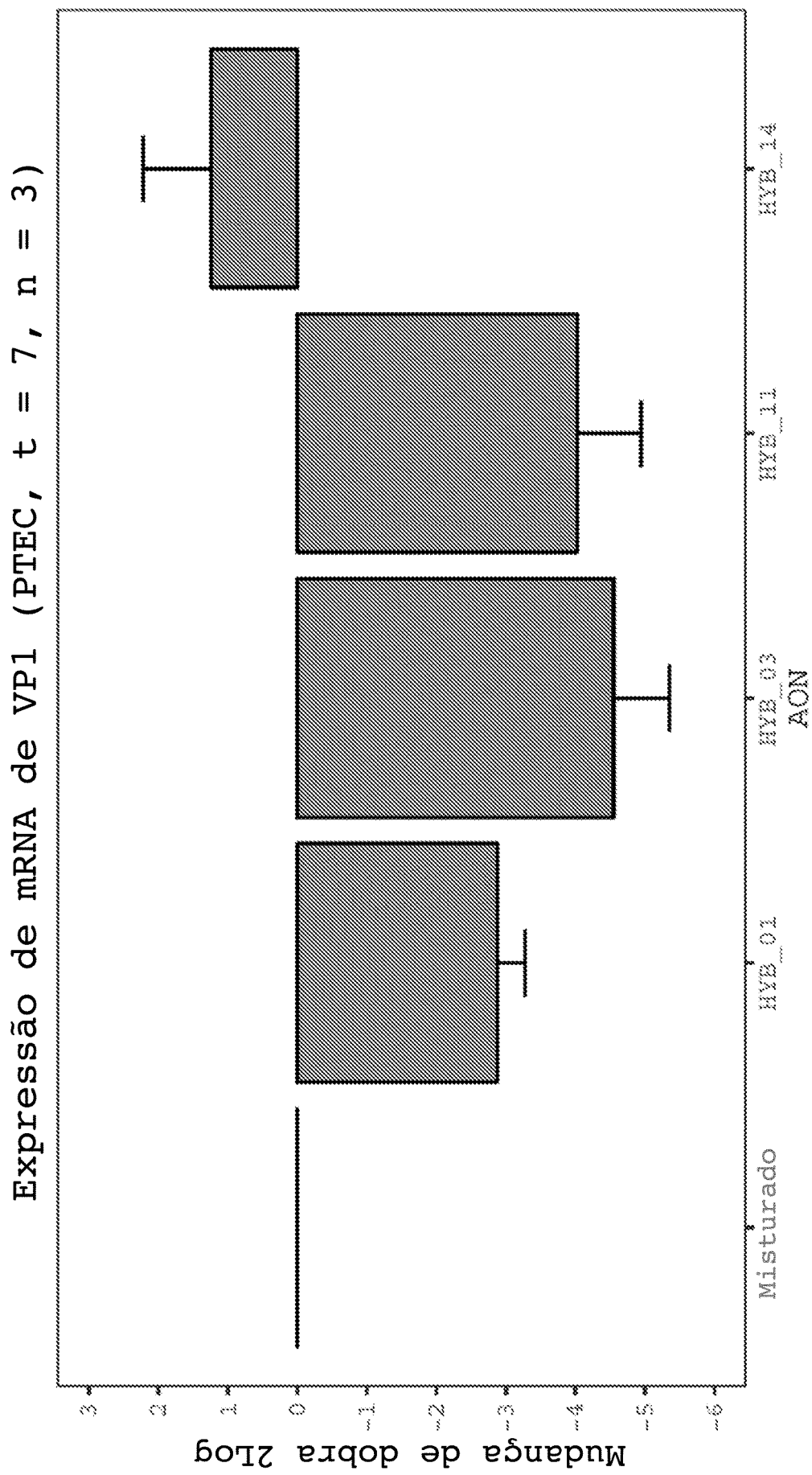


Fig. 29

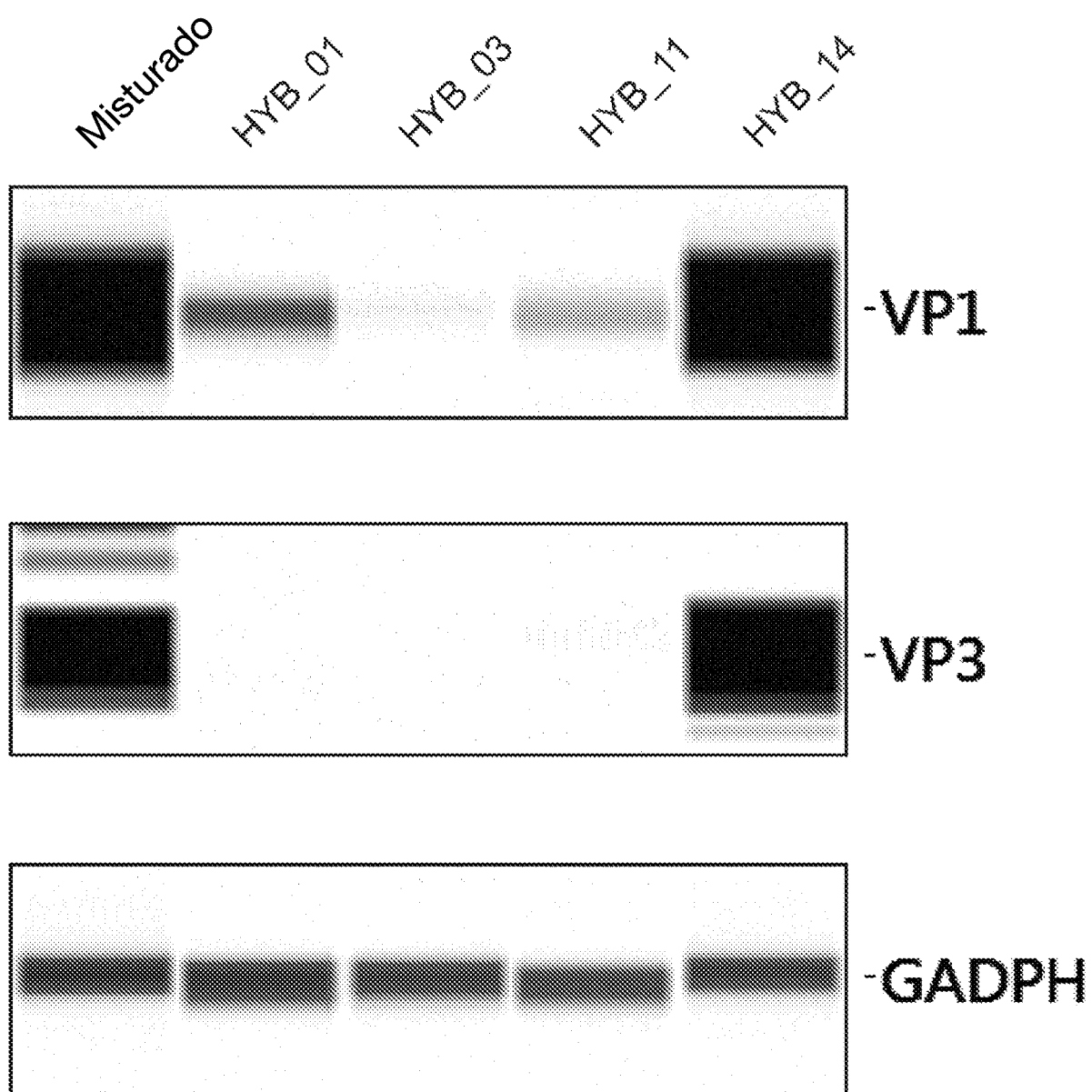


Fig. 30

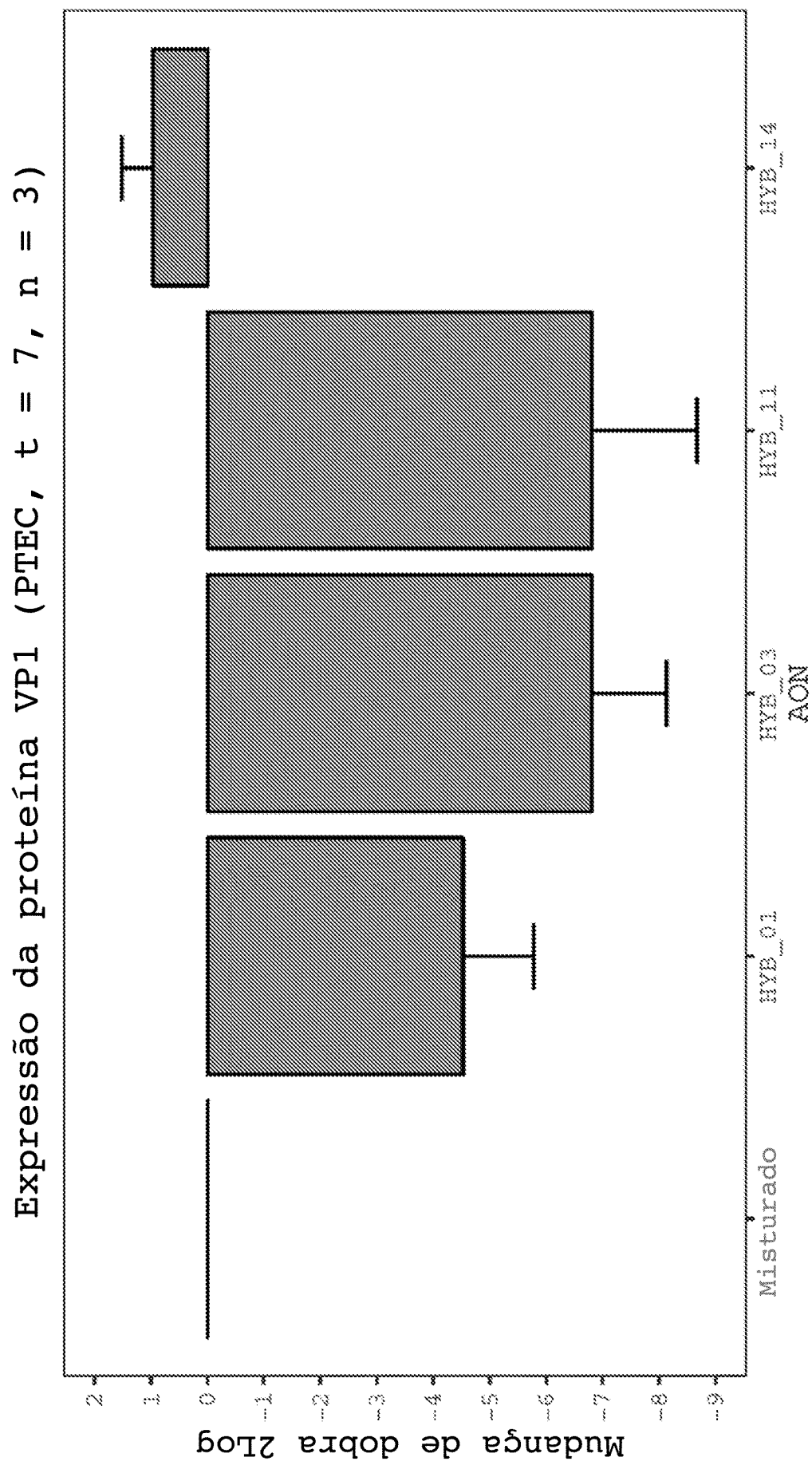


Fig. 31

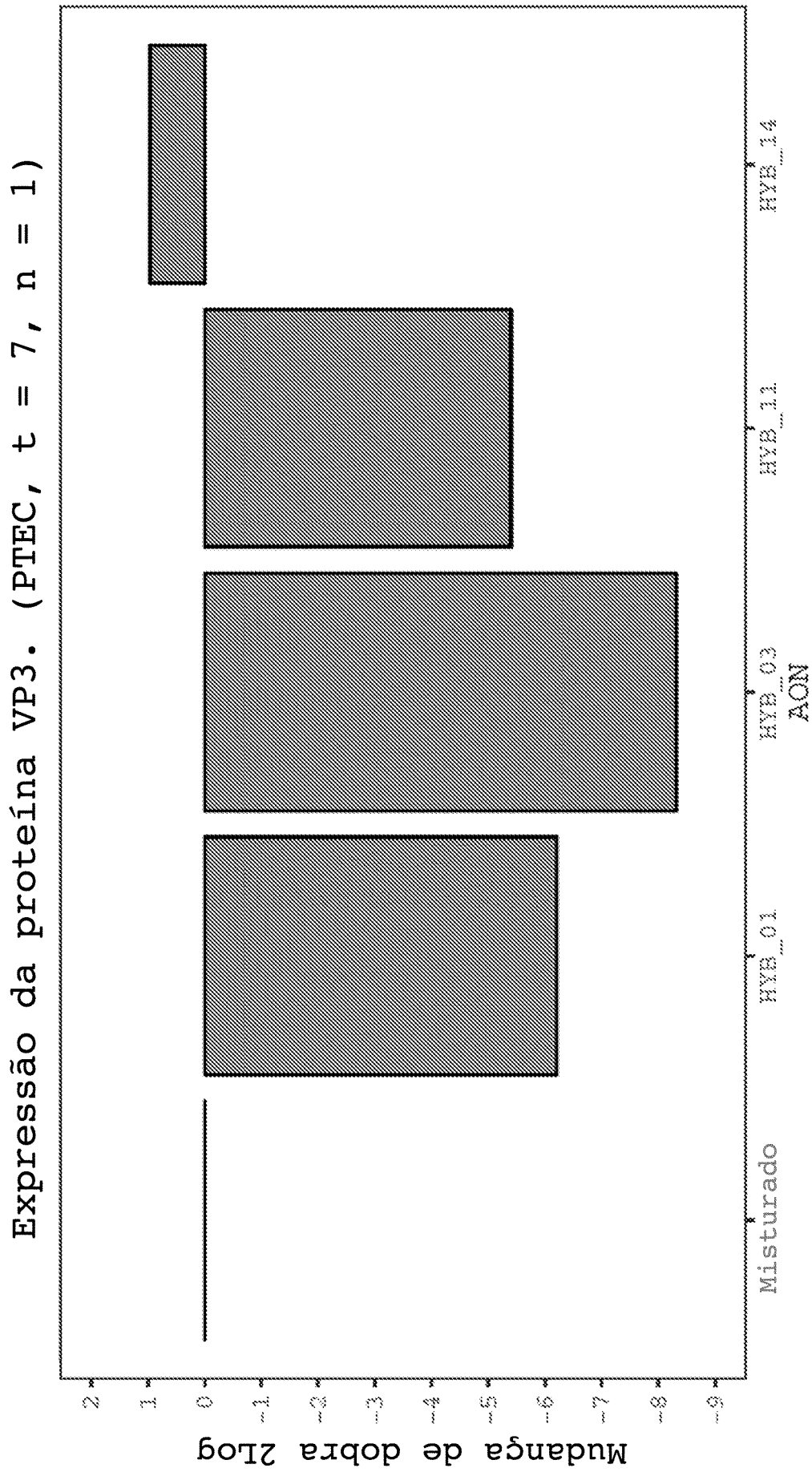


Fig. 32

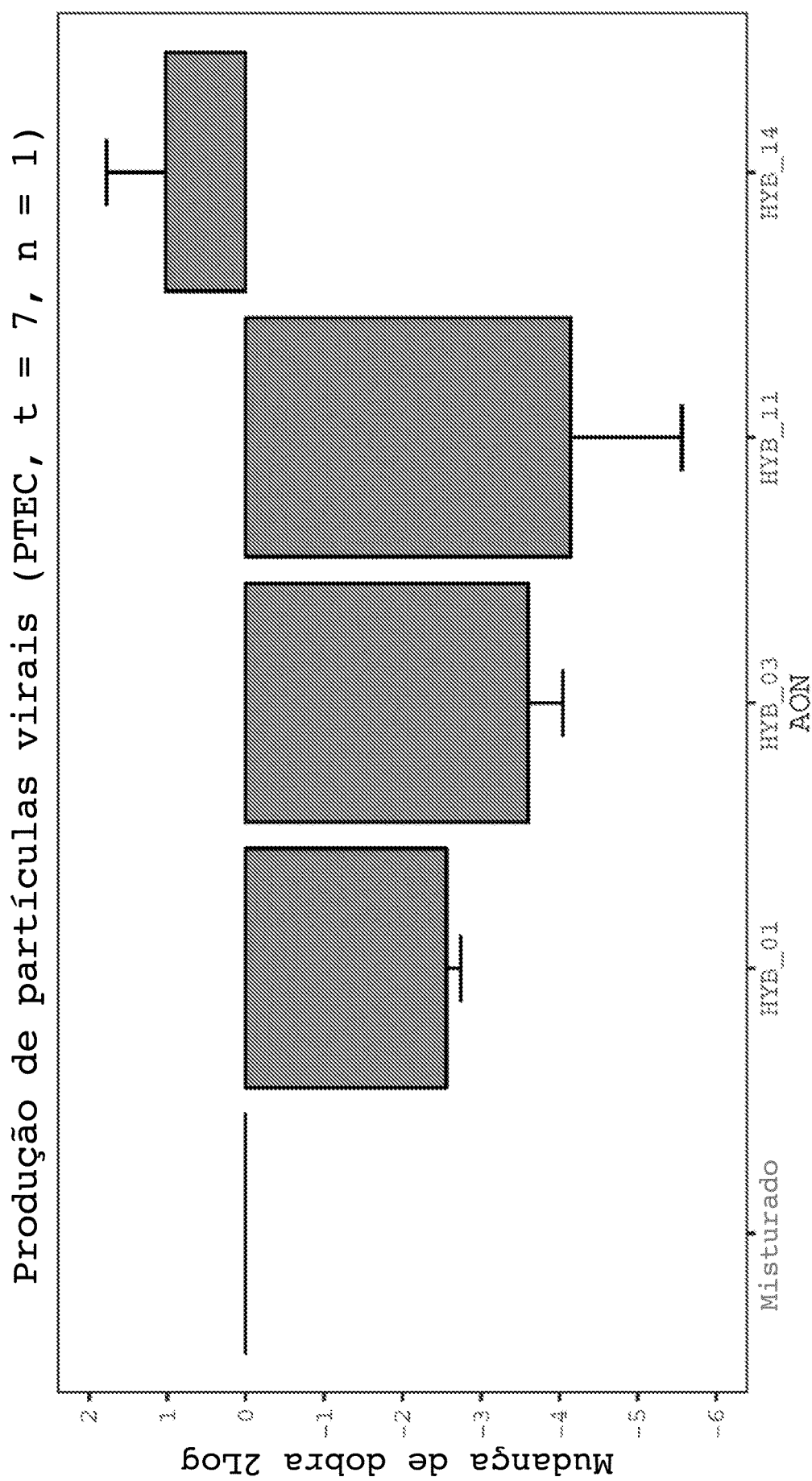


Fig. 33

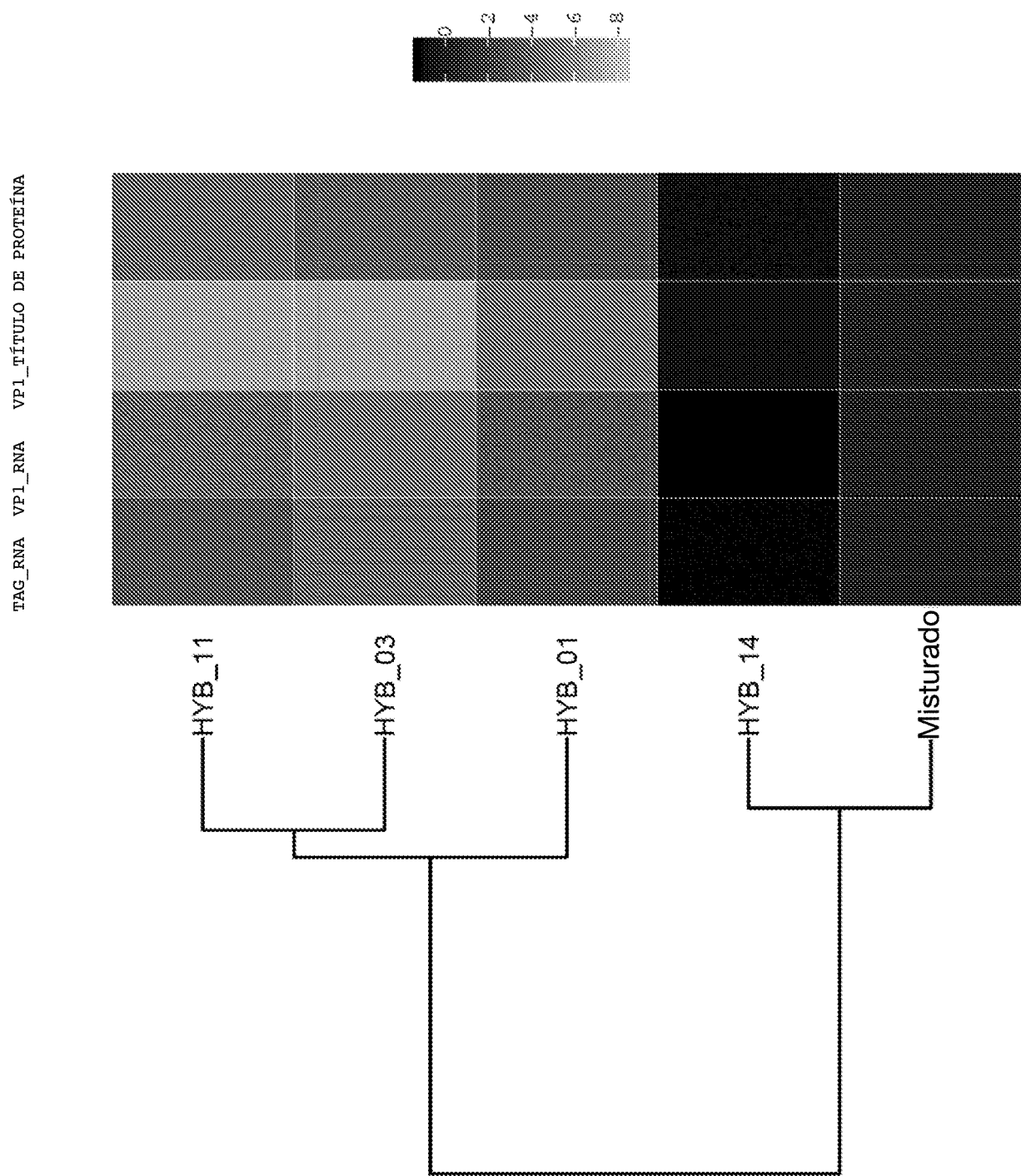


Fig. 34

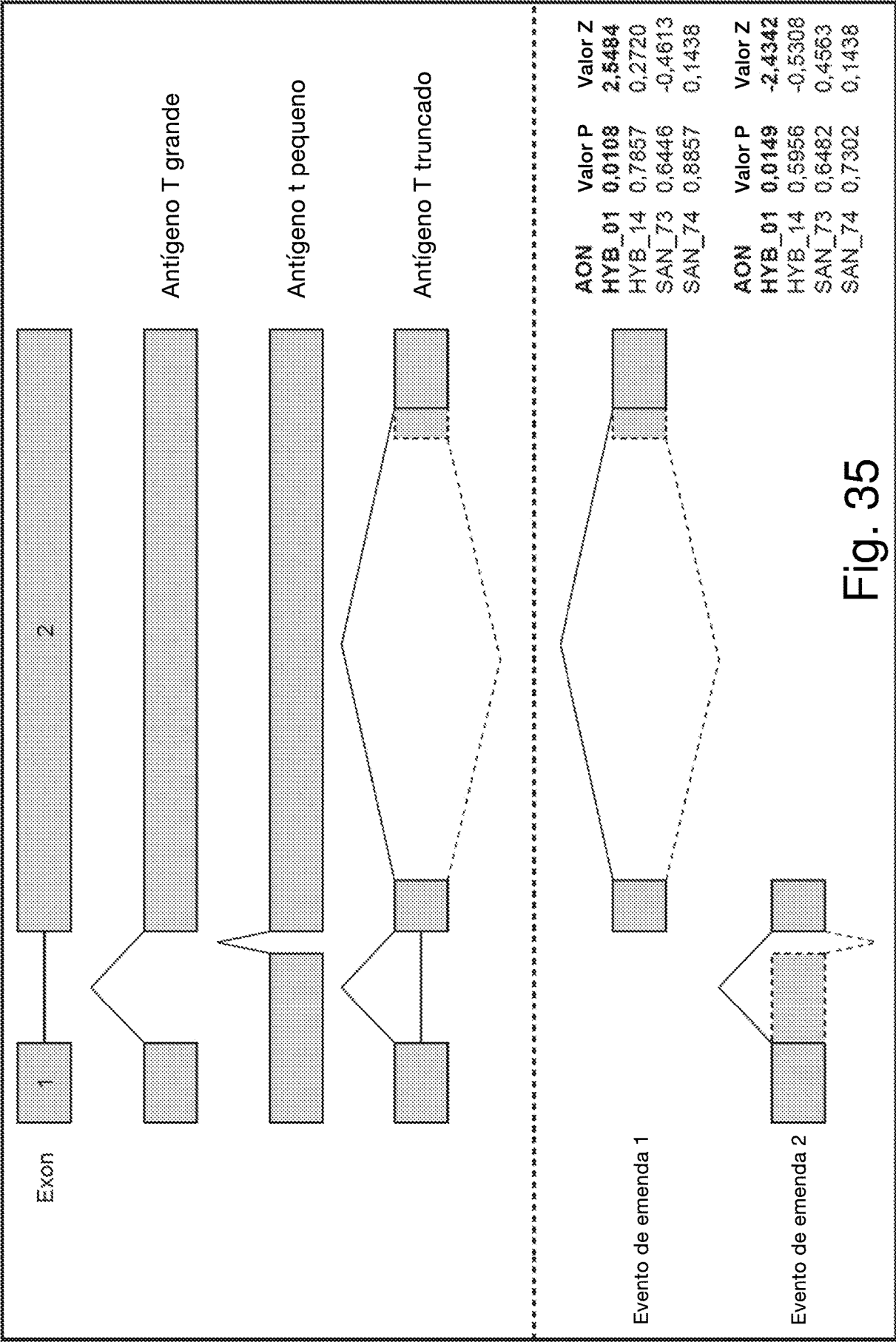


Fig. 35

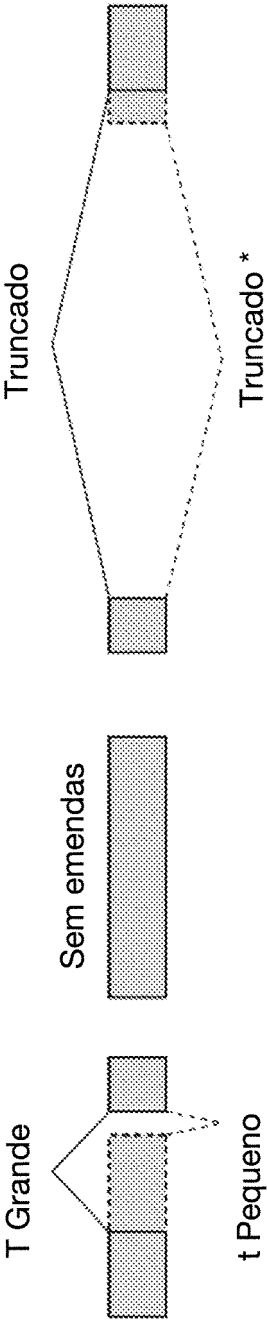
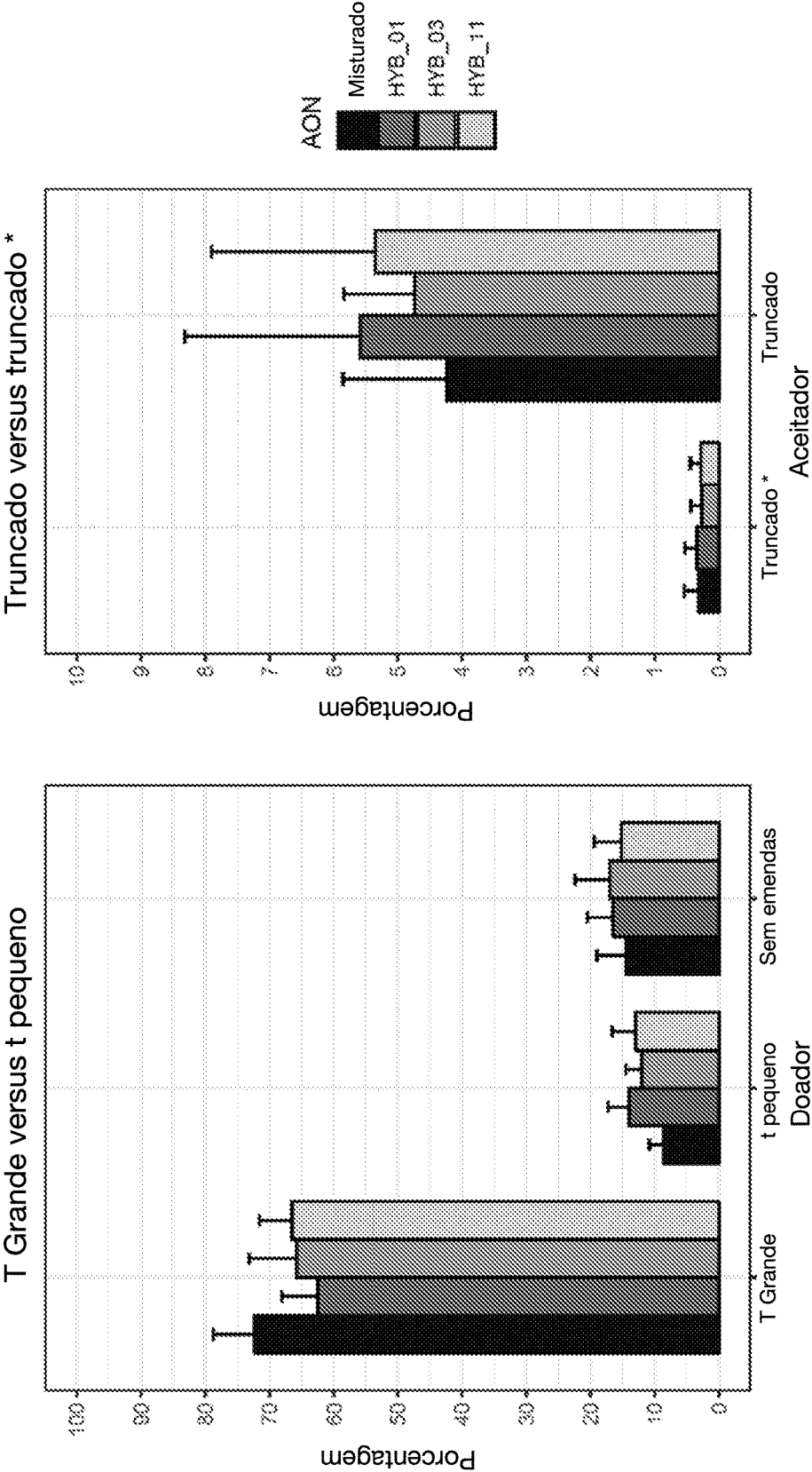
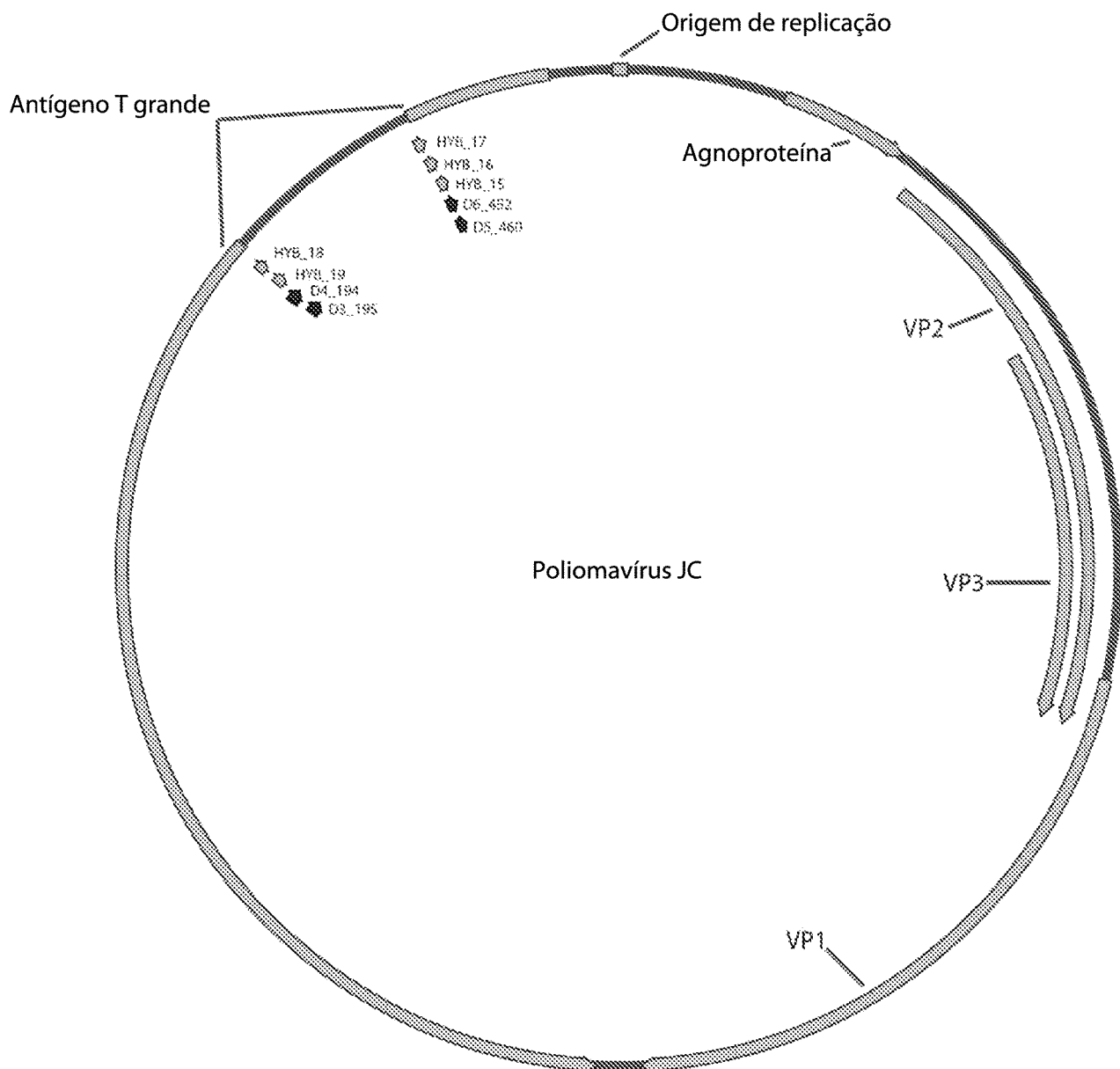


Fig. 36



AON	Localização	Sequência
HYB_15	4769..4788	ACCUCUGAACUAUUCCAUGU
HYB_16	4765..4784	ACCAACCUCUGAACUAUUCC
HYB_17	4761..4780	CACAACCAACCUCUGAACUA
HYB_18	4409..4428	UGUUCCAUAAGGUUGGCACCU
HYB_19	4412..4431	UCCAUAAGGUUGGCACCUAAA

Fig. 37 (1)

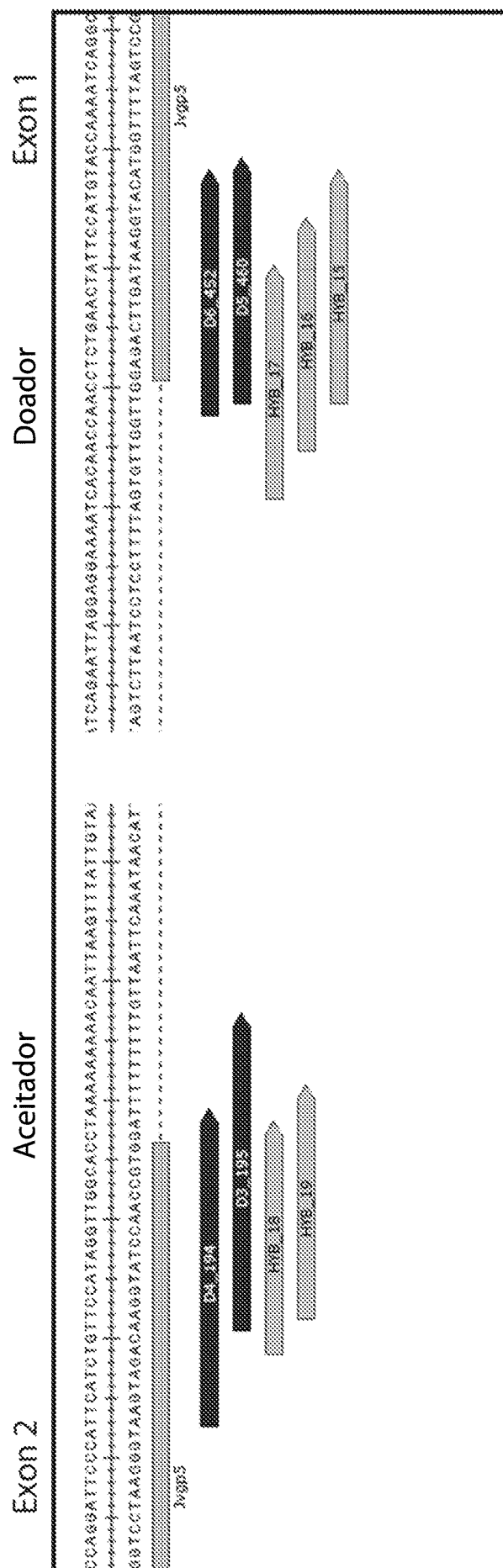


Fig. 37 (2)

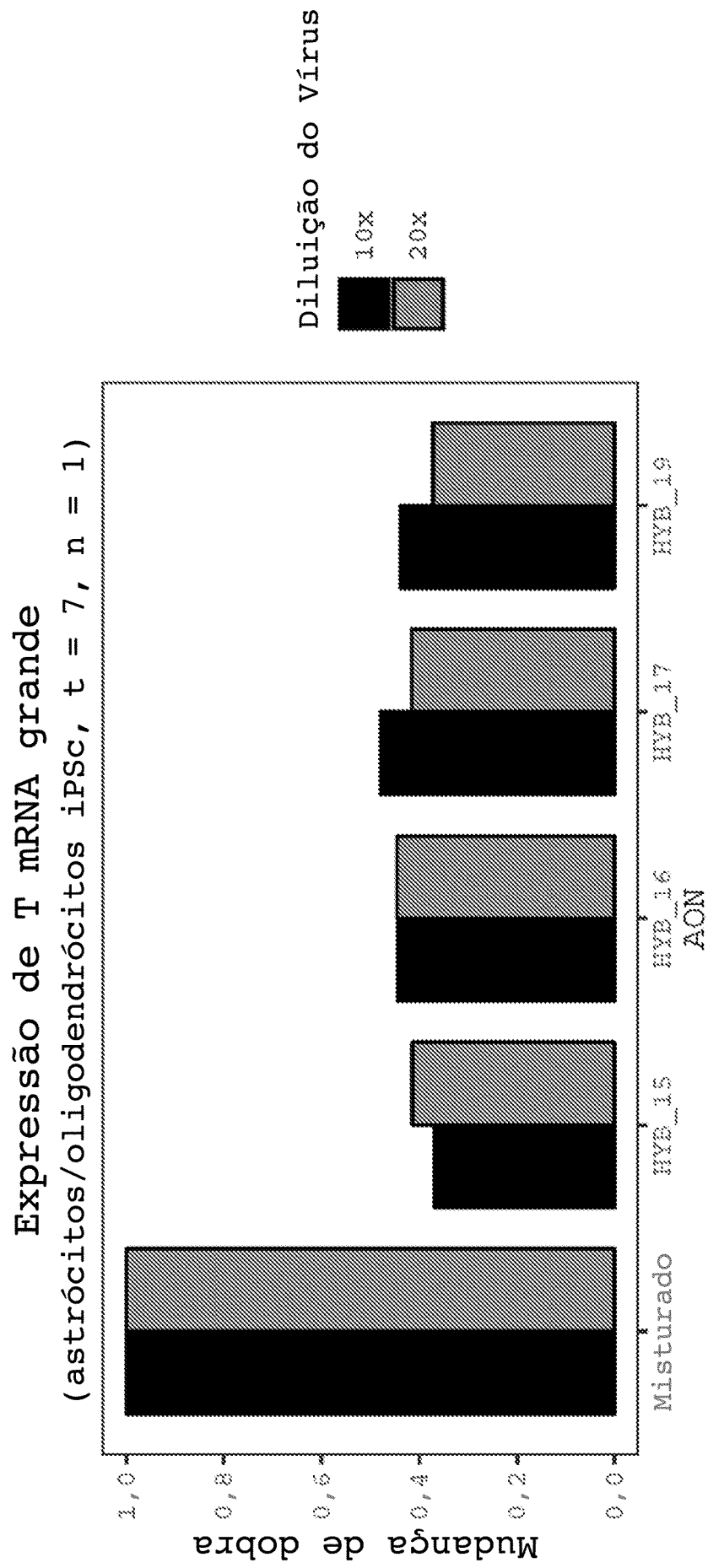


Fig. 38

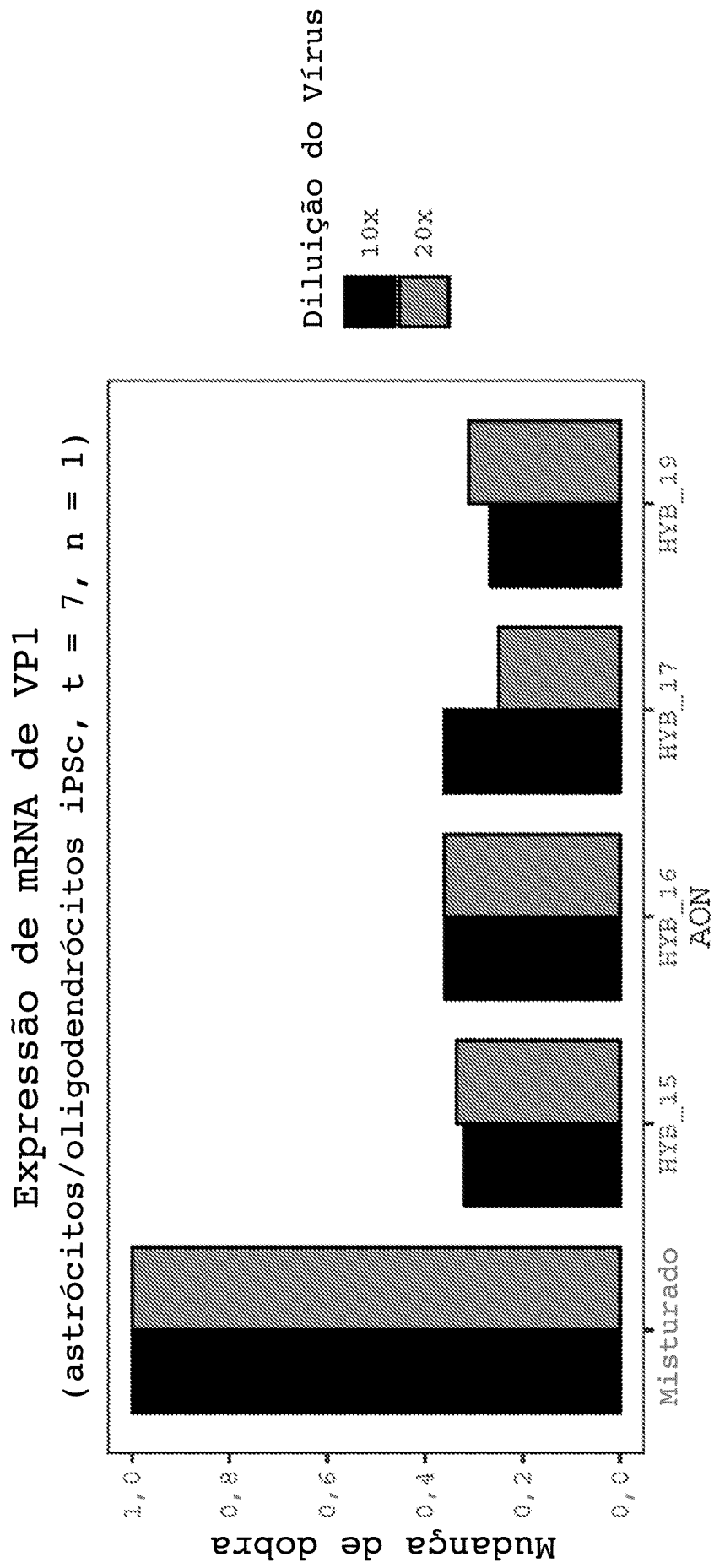


Fig. 39

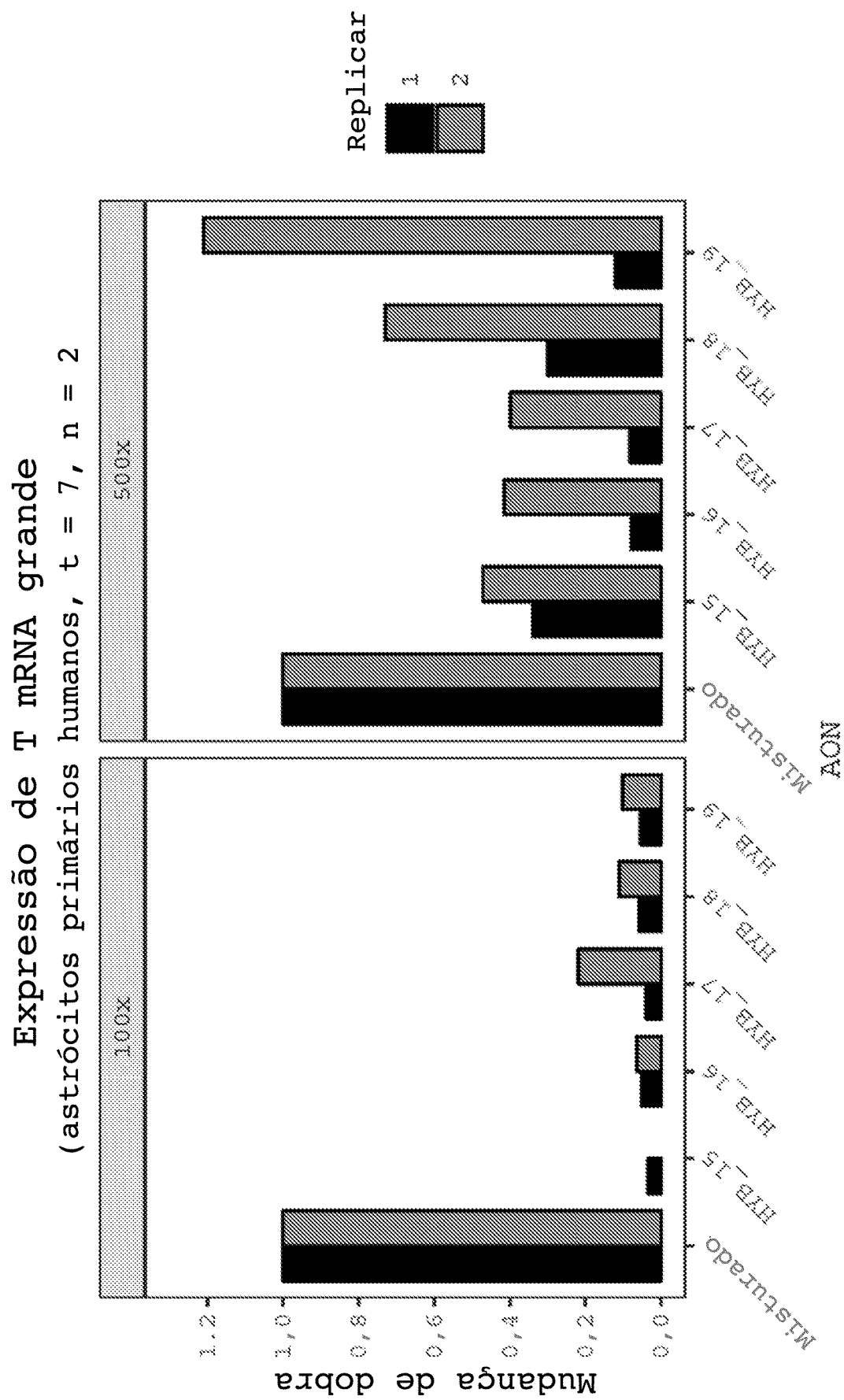


Fig. 40

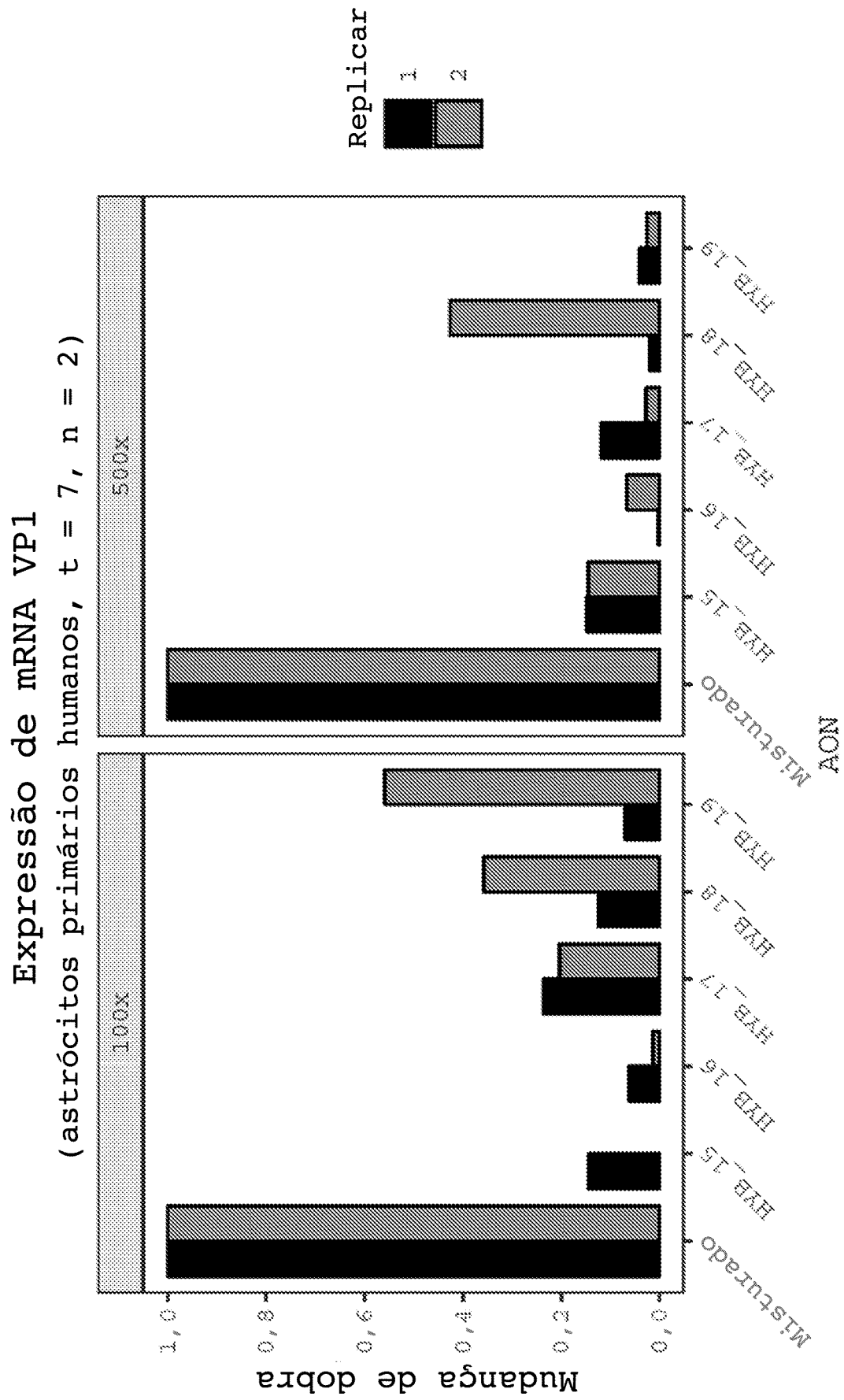


Fig. 41

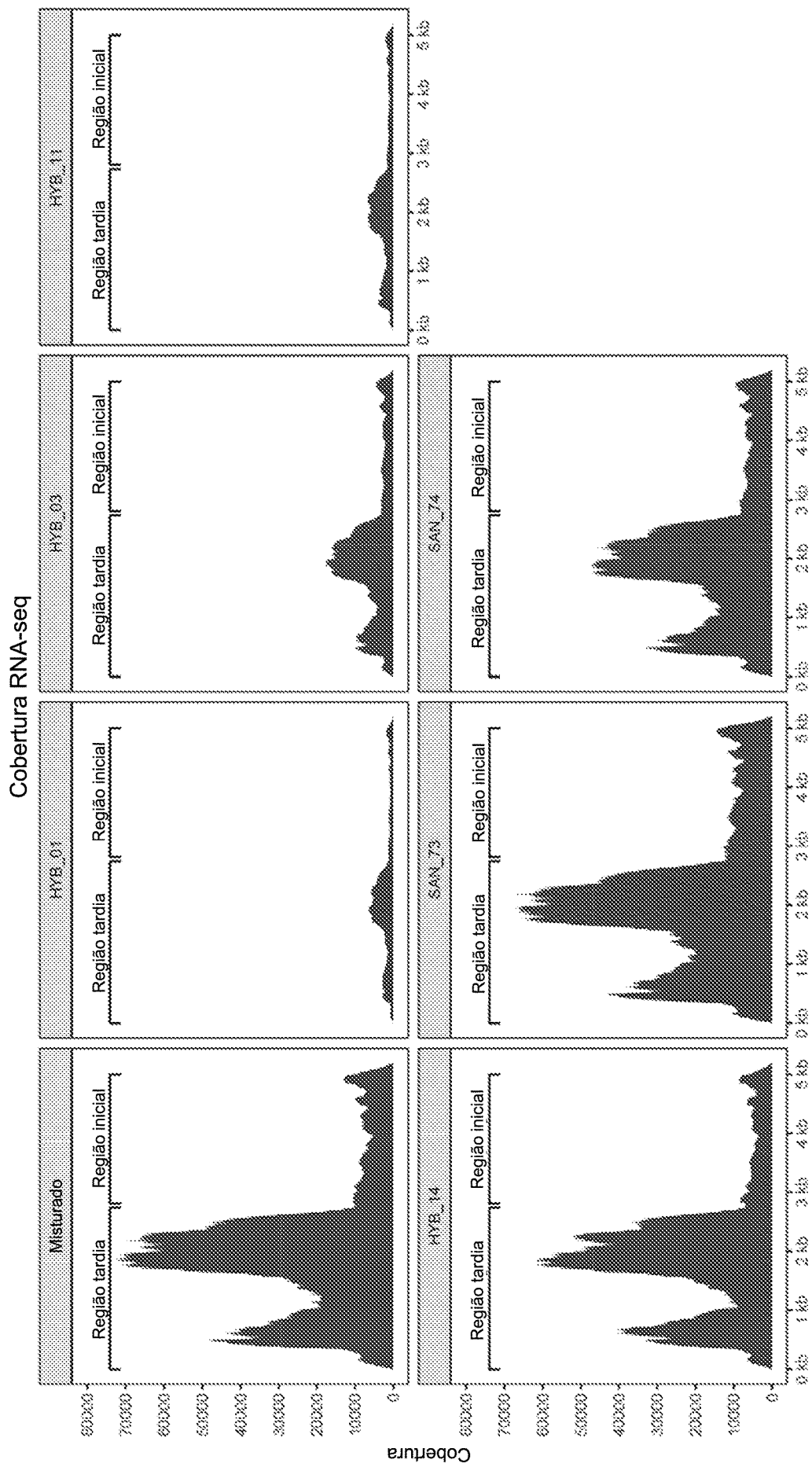


Fig. 42

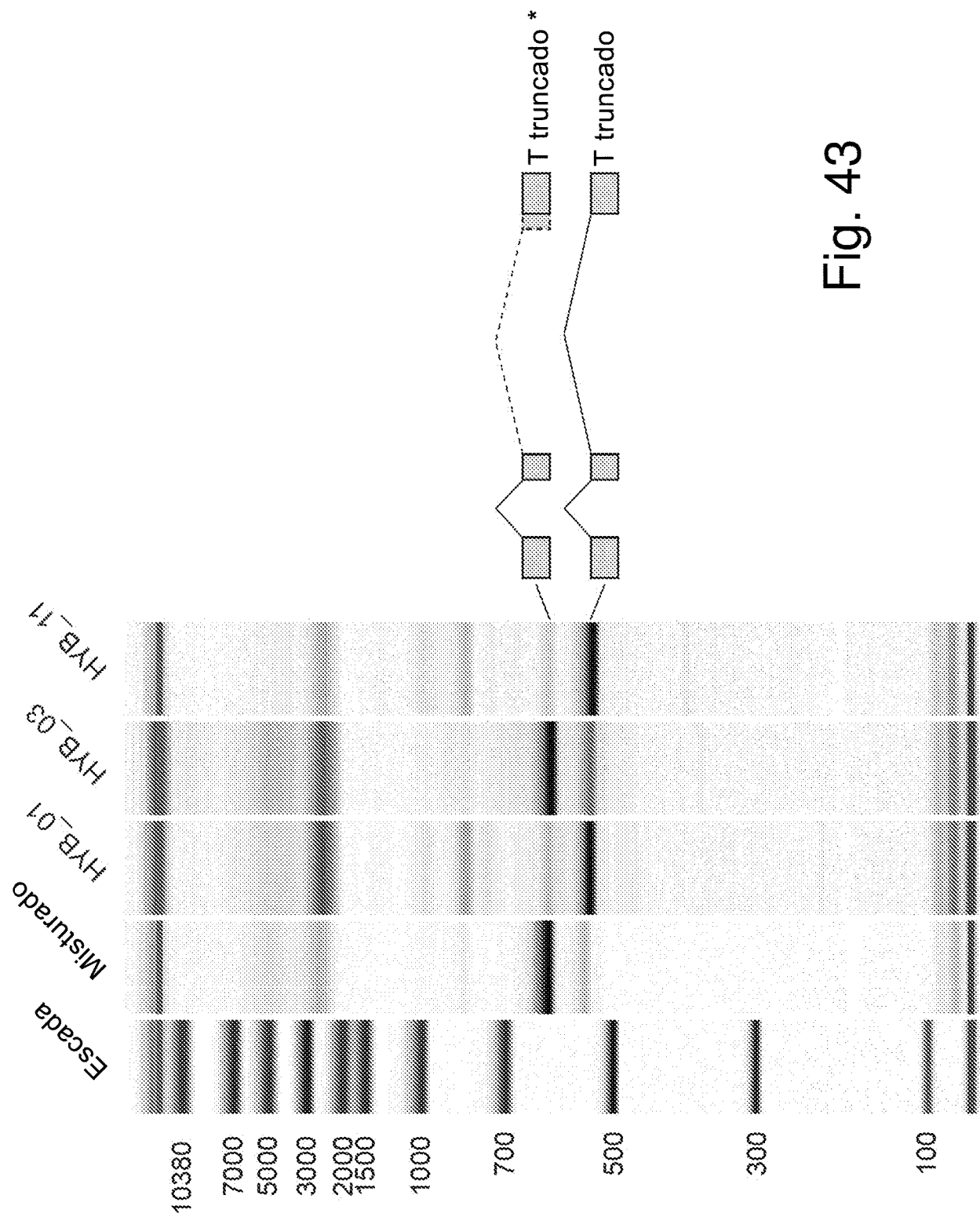


Fig. 43

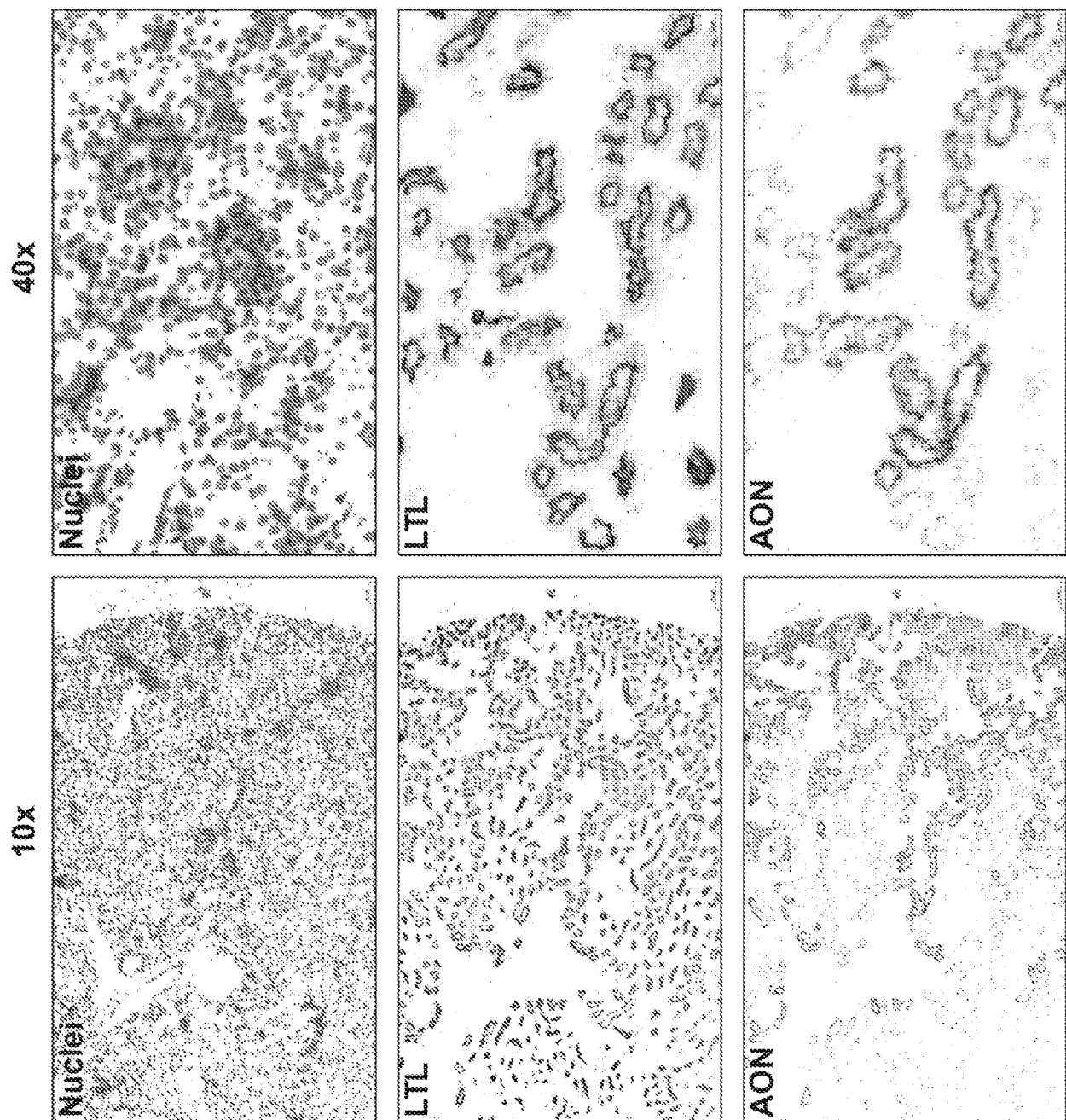


Fig. 44

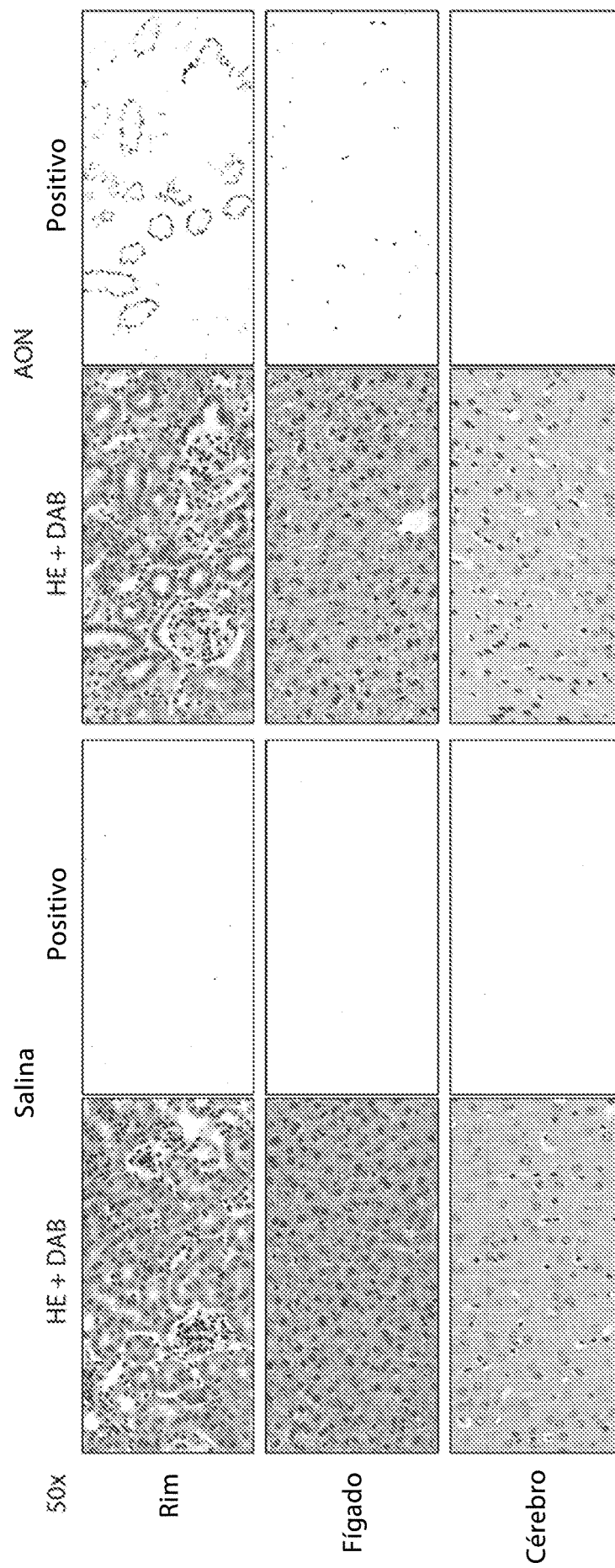


Fig. 45

Resumo da Patente de Invenção para: **"INIBIÇÃO DE REPLICAÇÃO DE POLIOMAVÍRUS"**

A invenção se refere a moléculas antissentido e métodos para modular o splicing do pré-mRNA do antígeno T de poliomavírus. Em um aspecto, a invenção se refere a um oligonucleotídeo antissentido com 12 a 30, de preferência 17, 18, 19 ou 20 a 30 nucleobases de comprimento que compreende uma sequência que é o complemento reverso de um trecho contíguo de pelo menos 12 nucleobases de um pré-mRNA de antígeno T do poliomavírus e cujo oligonucleotídeo antissentido pode modular o splicing do referido pré-mRNA do antígeno T em uma célula.

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

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: Listagem de Sequências H.01.041.PI-BR.txt
- Data de Geração do Código: 02/09/2020
- Hora de Geração do Código: 14:32:14
- Código de Controle:
 - Campo 1: A6C3F163765BE508
 - Campo 2: 5493DF39F3DC71B1