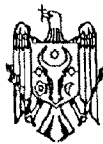




MD/EP 3519572 T2 2024.03.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3519572 (13) T2

(51) Int. Cl.:C12N 15/113 (2010.01.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

(21) Numărul de depozit: e 2019 0885 (22) Data de depozit: 2017.09.29 (96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 17857565.0, 2017.09.29 (97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european:3519572, 2019.08.07 (31) Numărul cererii prioritare: 201662401723 P; 201762450469 P (32) Data de depozit a cererii prioritare: 2016.09.29; 2017.01.25 (33) Țara cererii prioritare: US; US	(49) Data publicării traducerii fasciculului de brevet european validat: BOPI nr. 03/2024, 2024.03.31 (80) Data publicării mențiunii acordării de către OEB: EPB nr. 47/2023, 2023.11.22 (82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 09/2019, 2019.09.30
(71) Solicitant: BIOGEN MA INC., US (72) Inventator: KORDASIEWICZ Holly, US (73) Titular: BIOGEN MA INC., US (74) Mandatar autorizat: SOCOLOVA Sofia	

(54) Compuși și metode de reducere a expresiei Tau

(57) Rezumat:

1

Sunt furnizați compuși, metode și compoziții farmaceutice pentru reducerea cantității sau activității ARNm de Tau într-o celulă sau un animal și, în anumite cazuri, reducerea cantității de proteină Tau într-o celulă sau un animal. Astfel de compuși, metode și compoziții farmaceutice sunt utile pentru a ameliora cel puțin un simptom al unei boli neurodegenerative. Astfel de simptome includ pierderea memoriei, pierderea funcției

2

motorii și creșterea numărului și/sau volumului de incluziuni neurofibrilare. Astfel de boli neurodegenerative pot include tauopatii, boala Alzheimer, demență fronto-temporală (FTD), FTDP-17 paralizie supranucleară progresivă (PSP), encefalopatie traumatică cronică (CTE), degenerare ganglionară corticobazală (CBD), epilepsie și sindromul Dravet.

Revendicări: 20

MD/EP 3519572 T2 2024.03.31

(54) Compounds and methods for reducing Tau expression**(57) Abstract:**

1

Provided are compounds, methods, and pharmaceutical compositions for reducing the amount or activity of Tau mRNA in a cell or animal, and in certain instances reducing the amount of Tau protein in a cell or animal. Such compounds, methods, and pharmaceutical compositions are useful to ameliorate at least one symptom of a neurodegenerative disease. Such symptoms include loss of memory, loss of motor function, and increase in the number

2

and/or volume of neurofibrillary inclusions. Such neurodegenerative diseases include tauopathies, Alzheimer's Disease, Frontotemporal Dementia (FTD), FTDP-17 Progressive Supranuclear Palsy (PSP), Chronic Traumatic Encephalopathy (CTE), Corticobasal Ganglionic Degeneration (CBD), Epilepsy, and Dravet's Syndrome.

Claims: 20

Descriere:**(Descrierea se publică în varianta redactată de solicitant)****Domeniu**

Sunt furnizați compuși, inclusiv pentru utilizare în metode, și compoziții farmaceutice pentru reducerea cantității sau activității ARNm de Tau într-o celulă sau un animal și, în anumite cazuri, reducerea cantității de proteină Tau într-o celulă sau un animal. Astfel de compuși, metode și compoziții farmaceutice sunt utile pentru a ameliora cel puțin un simptom al unei boli neurodegenerative. Astfel de simptome includ pierderea memoriei, pierderea funcției motorii și creșterea numărului și/sau volumului de incluziuni neurofibrilare. Astfel de boli neurodegenerative pot include tauopatii, boala Alzheimer, demență fronto-temporală (FTD), FTDP-17, paralizie supranucleară progresivă (PSP), encefalopatie traumatică cronică (CTE), degenerare ganglionară corticobazală (CBD), epilepsie și sindromul Dravet.

Baze

Funcția primară a Tau este de a se lega la și de a stabiliza microtubulii, care sunt componente structurale importante ale citoscheletului implicate în mitoză, citokineză și transportul vezicular. Tau se găsește în multiple țesuturi, dar este extrem de abundentă în axonii neuronilor. La om, există șase izoforme de Tau care sunt generate de matisarea alternativă a exonilor 2, 3 și 10. Matisarea exonilor 2 și 3 la capătul N-terminal al proteinei conduce la includerea a zero, unu sau două domenii acide de 29 aminoacizi și este denumită Tau 0N, 1N sau respectiv 2N. Influența acestor domenii asupra funcției Tau nu este pe deplin clară, deși poate juca un rol în interacțiunile cu membrana plasmatică. Includerea exonului 10 la capătul C-terminal conduce la includerea domeniului de legare a microtubulilor codificat de exonul 10. Deoarece există 3 domenii de legare a microtubulilor în altă parte în Tau, această izoformă de Tau (cu exonul 10 inclus) este denumită Tau 4R, unde 'R' se referă la numărul de repetări ale domeniilor de legare a microtubulilor. Tau fără exonul 10 este denumită Tau 3R. Deoarece mai multe domenii de legare a microtubulilor (4R comparativ cu 3R) cresc legarea la microtubuli, 4R Tau probabil crește în mod semnificativ legarea la și asamblarea microtubulilor. Raportul dintre 3R/4R Tau este reglat din punct de vedere al dezvoltării, cu țesuturi fetale care exprimă exclusiv 3R Tau și țesuturi umane adulte care exprimă niveluri aproximativ egale de 3R/4R Tau. Abateri de la raportul normal dintre 3R/4R Tau sunt caracteristice tauopatiilor neurodegenerative FTD. Nu se cunoaște modalitatea în care modificarea raportului Tau 3R/4R la o etapă ulterioară la animalul adult va afecta patogeneza Tau.

Fosforilarea direcționată cu serin-treonină reglează capacitatea Tau de legare a microtubulilor. Hiperfosforilarea favorizează detașarea Tau de microtubuli. Au fost descrise alte modificări post-translaționale ale Tau; cu toate acestea, semnificația acestora nu este clară. Fosforilarea Tau este, de asemenea, reglată din punct de vedere al dezvoltării, fosforilarea fiind mai crescută în țesuturile fetale și fosforilarea fiind mult mai scăzută la adulți. O caracteristică a tulburărilor neurodegenerative este fosforilarea crescută aberant a Tau. Rețeaua de microtubuli este implicată în multe procese importante din interiorul celulei, inclusiv integritatea structurală necesară pentru menținerea morfologiei celulare și operarea mașinăriei de transport. Deoarece legarea Tau la microtubuli stabilizează microtubulii, Tau este probabil un mediator cheie al unora dintre aceste procese și perturbarea Tau normală în bolile neurodegenerative poate perturba unele dintre aceste procese celulare cheie. Unul dintre indicatorii timpurii ai faptului că Tau poate fi importantă în sindroamele neurodegenerative a fost recunoașterea faptului că Tau este o componentă cheie a incluziunilor neurofibrilare în boala Alzheimer. De fapt, incluziunile neurofibrilare sunt agregate ale proteinei Tau hiperfosforilate. Împreună cu plăcile care conțin beta amiloid, incluziunile neurofibrilare reprezintă un semn distinctiv al bolii Alzheimer și se corelează semnificativ cu afectarea cognitivă. 95% dintre acumulările de Tau în AD se găsesc în procesele neuronale și este denumită distrofie neuritică. Procesul (procesele) prin care această proteină asociată cu microtubulii se decuplează de microtubuli și formează acumulări de proteine și modalitatea în care aceasta se leagă de toxicitatea neuronală nu sunt bine înțelese.

Incluziunile neuronale de Tau reprezintă o caracteristică patologică nu numai a bolii Alzheimer, ci și a unui subset de demență frontotemporală (FTD), PSP și CBD. Legătura dintre Tau și neurodegenerare a fost solidificată prin descoperirea faptului că mutațiile genei Tau provoacă un subset de FTD. Aceste date genetice au evidențiat, de asemenea, importanța raportului 3R:4R al Tau. Multe dintre mutațiile Tau care cauzează FTD conduc la o modificare a matisării Tau, ceea ce conduce la includerea preferențială a exonului 10 și, astfel, la creșterea 4R Tau. Nivelurile generale ale Tau sunt normale. Rămâne necunoscut dacă modificarea izoformei Tau sau modificarea aminoacizilor sau ambele cauzează neurodegenerare. Datele recente sugerează faptul că PSP poate fi asociată, de asemenea, cu o creștere a raportului 4R:3R al Tau.

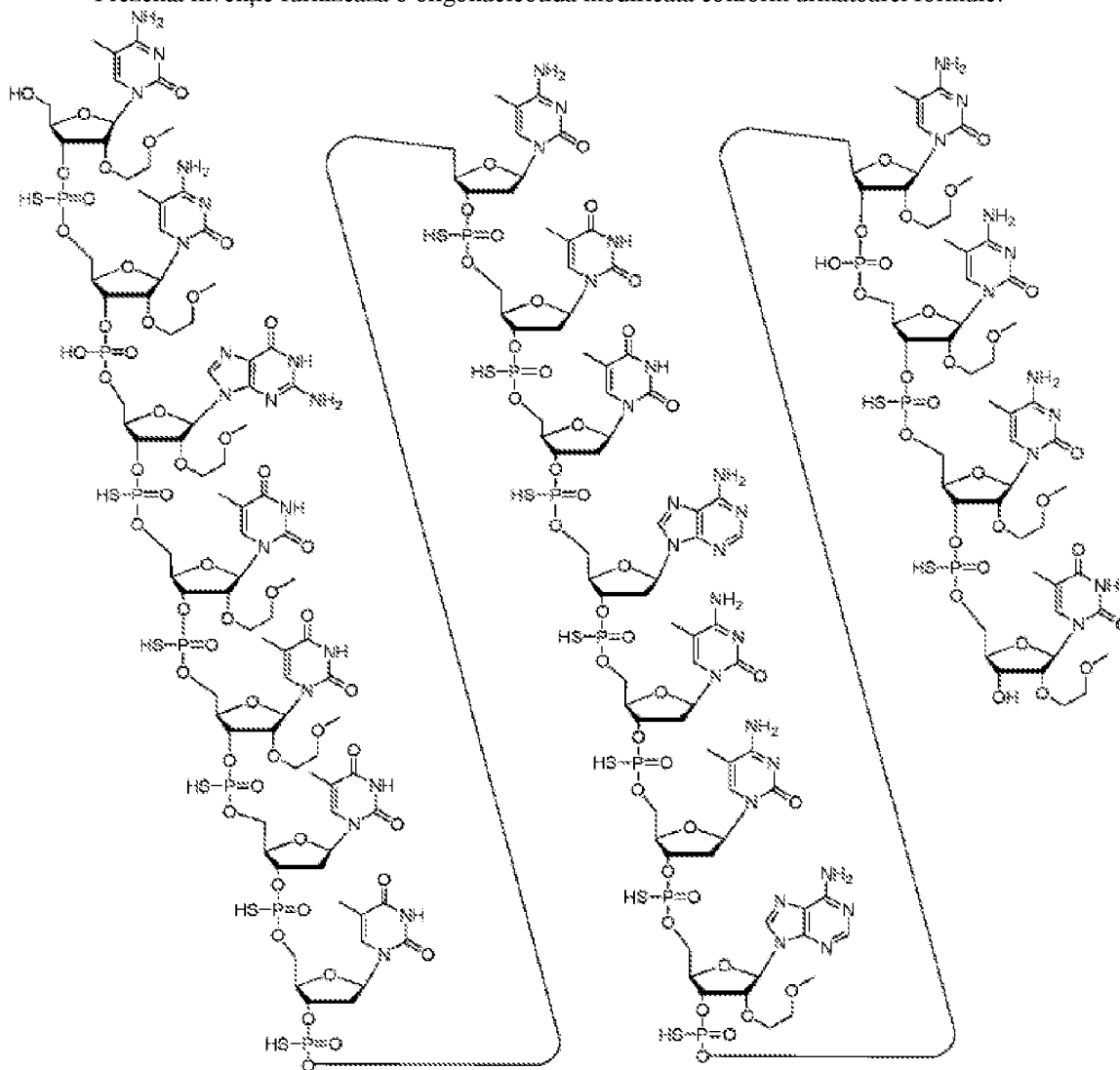
Pentru a ajuta la înțelegerea influenței raporturilor Tau asupra neurodegenerării, a fost generat un model de șoarece bazat pe una dintre mutațiile matisării Tau (N279K) utilizând o minigenă care include promotorul Tau și secvențele intronice de flancare ale exonului 10. La fel ca și la oameni, acești șoareci demonstrează niveluri crescute ale Tau 4R în comparație cu cei transgenici care exprimă Tau WT și dezvoltă anomalii comportamentale și motorii, precum și acumulări ale Tau agregată în creier și măduva spinării.

Proteina Tau a fost asociată cu multiple boli ale creierului, inclusiv boala Alzheimer, FTD, PSP, CBD, demență pugilistică, parkinsonism legat de cromozom, boala Lytico-Bodig, demență predominantă de încurcături, gangliogliom, gangliocitom, meningioangiomatoză, panencefalită sclerozantă subacută, encefalopatie saturnină, scleroză tuberoasă, boala Hallervorden-Spatz, boala Pick, boala fibrelor argirofile, degenerare corticobazală sau degenerare lobară frontotemporală și altele. Tulburările asociate cu Tau, cum ar fi AD, reprezintă cea mai frecventă cauză a demenței la vârstnici. AD afectează aproximativ 15 milioane de oameni din întreaga lume și 40% din populația cu vârsta peste 85 de ani. AD se caracterizează prin două caracteristici patologice: incluziunile neurofibrilare Tau (NFT) și plăcile de amiloid- β (A β).

În prezent, lipsesc opțiuni acceptabile pentru tratarea unor astfel de boli neurodegenerative. Prin urmare, un obiectiv al prezentei document este de a furniza oligonucleotide modificate, săruri, compuși și produse farmaceutice compoziții pentru utilizare în tratarea unor astfel de boli.

Descrierea pe scurt a invenției

Prezenta invenție furnizează o oligonucleotidă modificată conform următoarei formule:



(SECV ID NR: 8)

sau o sare a acesteia.

Invenția furnizează, de asemenea, un compus care cuprinde o oligonucleotidă modificată, în care oligonucleotida modificată este un gapmer constând dintr-un segment de aripă 5', un segment de gap central și un segment de aripă 3', în care:

- 5 segmentul de aripă 5' constă din cinci nucleozide 2'-MOE,
segmentul de gap central constă din opt 2'-deoxinucleozide, și
segmentul de aripă 3' constă din cinci nucleozide 2'-MOE;
în care oligonucleotida modificată are secvența de nucleobază 5'-CCGTTTCTTACCACCCT-3' (SECV
ID NR: 8), în care fiecare citozină este o 5-metilcitozină; și în care legăturile internucleozidice ale
10 oligonucleotidei modificate sunt, de la 5' la 3', sosssssssssoss, în care fiecare s este o legătură de
fosforotioat și fiecare o este o legătură de fosfodiester.

Invenția furnizează, de asemenea, o oligonucleotidă modificată, în care oligonucleotida modificată este un gapmer constând din un segment de aripă 5', un segment de gap central, și un segment de aripă 3', în care:

- 15 segmentul de aripă 5' constă din cinci nucleozide 2'-MOE,
segmentul de gap central constă din opt 2'-deoxinucleozide, și
segmentul de aripă 3' constă din cinci nucleozide 2'-MOE;
în care oligonucleotida modificată are secvența de nucleobază 5'-CCGTTTCTTACCACCCT-3' (SECV
ID NR: 8), în care fiecare citozină este o 5-metilcitozină; și în care legăturile internucleozidice ale
20 polinucleotidei modificate sunt, de la 5' la 3', sosssssssssoss, în care fiecare s este o legătură de
fosforotioat și fiecare o este o legătură de fosfodiester.

Invenția furnizează, de asemenea, o oligonucleotidă modificată sau o sare a acesteia, un compus sau o compoziție farmaceutică, astfel cum sunt definite în revendicările anexate, pentru utilizare în
25 terapie, inclusiv pentru utilizare în tratarea unei boli asociate cu tau, de exemplu o boală
neurodegenerativă, incluzând o tauopatie, boala Alzheimer, demență frontotemporală (FTD), FTDP-17,
paralizie supranucleară progresivă (PSP), encefalopatie cronică traumatică (CTE), degenerescență
ganglionară corticobazală (CBD), epilepsie sau sindromul Dravet.

Alte variante de realizare ale invenției sunt definite în revendicări. Prin urmare, în prezenta sunt
furnizați compuși și utilizarea lor în metode de reducere a cantității sau activității de ARNm Tau și, În
30 anumite variante de realizare, reducerea cantității de proteină Tau într-o celulă sau animal. În anumite
variante de realizare, animalul are o boală neurodegenerativă. În anumite variante de realizare, prezintă o
tauopatie, boala Alzheimer, demență fronto-temporală (FTD), FTDP-17, paralizie supranucleară
progresivă (PSP), encefalopatie traumatică cronică (CTE), degenerescență ganglionară corticobazală
(CBD), epilepsie sau sindromul Dravet. În anumite variante de realizare, compușii utili pentru reducerea
35 expresiei ARNm Tau sunt compuși oligomerici. În anumite variante de realizare, Compusul nr. 814907
este util pentru reducerea expresiei ARNm Tau și/sau proteinei Tau.

De asemenea, în prezenta sunt dezvăluite metode utile pentru prevenirea sau ameliorarea a cel puțin unui simptom al unei boli neurodegenerative. În anumite cazuri, aceste simptome sunt pierderea de
40 memorie, pierderea funcției motorii, și creșterea numărului și/sau volumului de incluziuni neurofibrilare.
În anumite cazuri, prevenirea sau ameliorarea are ca rezultat menținerea sau îmbunătățirea memoriei,
menținerea sau îmbunătățirea funcției motorii și/sau menținerea sau reducerea numărului și/sau volumului
de incluziuni neurofibrilare. În anumite cazuri, o astfel de prevenire sau ameliorare a simptomelor este
scăderea vitezei de evoluție sau întârzierea debutului unor astfel de simptome.

Descrierea detaliată a invenției

- 45 Trebuie să se înțeleagă faptul că, atât descrierea generală anterioară, cât și următoarea descriere
detaliată sunt doar exemplificative și explicative și nu sunt limitative. În prezenta invenție, utilizarea
singularului include pluralul, cu excepția cazului în care se specifică altfel. Astfel cum se utilizează în
prezenta, utilizarea lui "sau" semnifică "și/sau" cu excepția cazului în care nu este specificat altfel. Mai
mult, utilizarea termenului "incluzând" precum și a altor forme, cum ar fi "include" și "inclus(ă)", este
50 nelimitativă. De asemenea, termeni cum ar fi "element" sau "componentă" cuprind atât elemente cât și
componente care cuprind o unitate și elemente și componente care cuprind mai mult de o subunitate, cu
excepția cazului în care se specifică altfel.

Titlurile secțiunilor utilizate în prezenta invenție sunt destinate doar unor scopuri de organizare și nu trebuie interpretate ca limitând subiectul descris.

- 55 *Definiții*

Cu excepția cazului în care sunt furnizate definiții specifice, nomenclatura utilizată în legătură cu, și procedurile și tehnicile de, chimie analitică, chimie organică de sinteză și chimie medicală și farmaceutică, descrise în prezenta, sunt cele bine cunoscute și utilizate în mod obișnuit în domeniu.

Cu excepția cazului în care este indicat altfel, următorii termeni au următoarele semnificații:

DEFINIȚII

Astfel cum se utilizează în prezenta, "2'-deoxinucleozidă" semnifică o nucleozidă care cuprinde o fracțiune de zahar 2'-H(H) furanozil, astfel cum se găsește în acizii deoxiribonucleici (ADN) care apar în stare naturală. În anumite variante de realizare, o 2'-deoxinucleozidă poate cuprinde o nucleobază modificată sau poate cuprinde o nucleobază de ARN (de exemplu, uracil).

Astfel cum se utilizează în prezenta, "nucleozidă 2'-substituită" semnifică o nucleozidă care cuprinde o fracțiune de zahar substituit în 2'. Astfel cum se utilizează în prezenta, "2'-substituit" cu referire la o fracțiune de zahar semnifică o fracțiune de zahar care cuprinde cel puțin o grupare substituentă în 2', alta decât H sau OH.

Astfel cum se utilizează în prezenta, „administrare” semnifică furnizarea unui agent farmaceutic unui animal.

Astfel cum se utilizează în prezenta, „animal” semnifică un animal uman sau non-uman.

Astfel cum se utilizează în prezenta, "activitate antisens" semnifică orice modificare detectabilă și/sau măsurabilă care poate fi atribuită hibridizării unui compus antisens la acidul său nucleic țintă. În anumite variante de realizare, activitatea antisens reprezintă o scădere a cantității sau expresiei unui acid nucleic țintă sau a unei proteine codificate de un astfel de acid nucleic țintă, comparativ cu nivelurile de acid nucleic țintă sau nivelurile de proteină țintă în absența compusului antisens.

Astfel cum se utilizează în prezenta, „compus antisens” semnifică un compus oligomeric sau duplex oligomeric capabil să realizeze cel puțin o activitate antisens.

Astfel cum se utilizează în prezenta, „ameliorare” cu referire la un tratament semnifică îmbunătățirea a cel puțin unui simptom în raport cu același simptom în absența tratamentului. În anumite variante de realizare, ameliorarea este reducerea severității sau frecvenței unui simptom sau debutul întârziat sau încetinirea evoluției severității sau frecvenței unui simptom. În anumite variante de realizare, simptomul este pierderea memoriei, pierderea funcției motorii sau creșterea numărului și/sau volumului de incluziuni neurofibrilare. În anumite variante de realizare, ameliorarea acestor simptome are ca rezultat menținerea sau îmbunătățirea memoriei, menținerea sau îmbunătățirea funcției motorii, și/sau menținerea sau reducerea numărului și/sau volumului de incluziuni neurofibrilare.

Astfel cum se utilizează în prezenta, „cel puțin un simptom al unei boli neurodegenerative” include pierderea memoriei, pierderea funcției motorii sau creșterea numărului și/sau volumului de incluziuni neurofibrilare.

Astfel cum se utilizează în prezenta, "nucleozidă biciclică" sau "BNA" se referă la o nucleozidă modificată care cuprinde o fracțiune de zahar biciclic. Astfel cum se utilizează în prezenta, „zahar biciclic” sau „fracțiune de zahar biciclic” semnifică o fracțiune de zahar modificat care cuprinde două inele, în care al doilea inel este format printr-o punte care leagă doi dintre atomii din primul inel, formând astfel o structură biciclică. În anumite variante de realizare, primul inel al fracțiunii de zahar biciclic este o fracțiune de furanozil. În anumite variante de realizare, fracțiunea de zahar biciclic nu cuprinde o fracțiune furanozil.

Astfel cum se utilizează în prezenta, „populație îmbogățită chiral” semnifică o multitudine de molecule cu formulă moleculară identică, la care numărul sau procentul de molecule din cadrul populației care conține o anumită configurație stereochemică la un anumit centru chiral este mai mare decât numărul sau procentul de molecule preconizate să conțină aceeași configurație stereochemică particulară în același centru chiral particular în cadrul populației dacă centrul chiral particular ar fi stereoaleatoriu. Populațiile îmbogățite chiral de molecule având mai mulți centri chirali în cadrul fiecărei molecule pot conține unul sau mai mulți centri chirali stereoaleatorii. În anumite variante de realizare, moleculele sunt oligonucleotide modificate. În anumite variante de realizare, moleculele sunt compuși care cuprind oligonucleotide modificate

Astfel cum se utilizează în prezenta, „fracțiune scindabilă” semnifică o legătură sau o grupare de atomi care este scindată în condiții fiziologice, de exemplu, în interiorul unei celule, un animal sau un om.

Astfel cum se utilizează în prezenta, „complementar” cu referire la o oligonucleotidă semnifică că cel puțin 70% din nucleobazele oligonucleotidei sau una sau mai multe regiuni ale acesteia și nucleobazele altui acid nucleic sau una sau mai multe regiuni ale acestuia sunt capabile să se lege între ele prin legături de hidrogen atunci când secvența de nucleobaze a oligonucleotidei și celălalt acid nucleic sunt aliniate în direcții opuse. Nucleobaze complementare semnifică nucleobaze care sunt capabile să formeze legături de hidrogen între ele. Perechile de nucleobaze complementare includ adenină (A) și timină (T), adenină (A) și uracil (U), citozină (C) și guanină (G), 5-metilcitozină (mC) și guanină (G). Oligonucleotidele și/sau acizii nucleici complementare nu trebuie să aibă complementaritate de nucleobaze la fiecare nucleozidă. Mai degrabă, sunt tolerate unele nepotriviri. Astfel cum se utilizează în prezenta, „complet complementar” sau „100% complementar” cu referire la oligonucleotide semnifică

faptul că oligonucleotidele sunt complementare cu o altă oligonucleotidă sau acid nucleic la fiecare nucleozidă a oligonucleotidei.

Astfel cum se utilizează în prezenta, „grupare conjugată” semnifică o grupare de atomi care este atașată direct sau indirect la o oligonucleotidă. Grupările conjugate includ o fracțiune conjugată și un linker conjugat care leagă fracțiunea conjugată la oligonucleotidă.

Astfel cum se utilizează în prezenta, „linker conjugat” semnifică o grupare de atomi care cuprinde cel puțin o legătură care conectează o fracțiune conjugată la o oligonucleotidă.

Astfel cum se utilizează în prezenta, „fracțiune conjugată” semnifică o grupare de atomi care este atașată la o oligonucleotidă prin intermediul unui linker conjugat.

Astfel cum se utilizează în prezenta, „contiguă” în contextul unei oligonucleotide se referă la nucleozide, nucleobaze, fracțiuni de zahar sau legături internucleozidice care sunt imediat adiacente unele cu altele. De exemplu, „nucleobaze contigue” semnifică nucleobaze care sunt imediat adiacente una cu cealaltă într-o secvență.

Astfel cum se utilizează în prezenta, „gapmer” semnifică o oligonucleotidă modificată cuprinzând o regiune internă care are o pluralitate de nucleozide care susțin clivajul RNazei H poziționată între regiunile externe care au una sau mai multe nucleozide, în care nucleozidele care cuprind regiunea internă sunt distincte din punct de vedere chimic de nucleozida sau nucleozidele care cuprind regiunile externe. Regiunea internă poate fi denumită „gap” și regiunile externe pot fi denumite „aripi.” Cu excepția cazului în care se indică altfel, „gapmer” se referă la un motiv de zahar. Cu excepția cazului în care se indică altfel, fracțiunile de zahar ale nucleozidelor gapului unui gapmer sunt 2'-deoxifuranozil nemodificat. Astfel, termenul „gapmer MOE” indică un gapmer având un motiv de zahar de nucleozide 2'-MOE în ambele aripi și un gap de 2'-deoxinucleozide. Cu excepția cazului în care se indică altfel, un gapmer MOE poate cuprinde una sau mai multe legături internucleozidice modificate și/sau nucleobaze modificate și astfel de modificări nu urmează neapărat modelul din gapmer al modificărilor de zahar.

Astfel cum se utilizează în prezenta, „hibridizare” semnifică împerecherea sau anelare a oligonucleotidelor și/sau acizilor nucleici complementari. Deși nu se limitează la un anumit mecanism, cel mai uzual mecanism de hibridizare implică formarea de legături de hidrogen, care pot fi legături de hidrogen Watson-Crick, Hoogsteen sau Hoogsteen inversă, între nucleobaze complementare.

Astfel cum se utilizează în prezenta, termenul „legătură internucleozidică” este legătura covalentă între nucleozidele adiacente dintr-o oligonucleotidă. Astfel cum se utilizează în prezenta, „legătură internucleozidică modificată” semnifică orice legătură internucleozidică, alta decât o legătură internucleozidică de fosfodiester. „Legătură de fosforotioat” este o legătură internucleozidică modificată în care unul dintre atomii de oxigen fără punte ai unei legături internucleozidice de fosfodiester este înlocuit cu un atom de sulf.

Astfel cum se utilizează în prezenta, „nucleozidă de legătură” semnifică o nucleozidă care leagă, fie direct, fie indirect, o oligonucleotidă la o fracțiune conjugată. Nucleozidele de legătură sunt localizate în linkerul conjugat al unui compus oligomeric. Nucleozidele de legătură nu sunt considerate parte a porțiunii oligonucleotidice a unui compus oligomeric chiar dacă sunt contigue cu oligonucleotida.

Astfel cum se utilizează în prezenta, „fracțiune de zahar modificat non-biciclic” semnifică o fracțiune de zahar modificat care cuprinde o modificare, cum ar fi un substituent, care nu formează o punte între doi atomi ai zaharului pentru a forma un al doilea ciclu.

Astfel cum se utilizează în prezenta, „nepotrivire” sau „necomplementaritate” semnifică o nucleobază a unei prime oligonucleotide care nu este complementară cu nucleobaza corespunzătoare a unei a doua oligonucleotide sau a unui acid nucleic ținând atunci când primul și al doilea compus oligomeric sunt aliniați.

Astfel cum se utilizează în prezenta, „MOE” semnifică metoxi etil. „2'-MOE” semnifică o grupare $-OCH_2CH_2OCH_3$ în poziția 2' a unui inel furanozil.

Astfel cum se utilizează în prezenta, „motiv” semnifică modelul fracțiunilor, nucleobazelor și/sau legăturilor internucleozidice de zahar nemodificat și/sau modificat, dintr-o oligonucleotidă.

Astfel cum se utilizează în prezenta, „ARNm” semnifică o transcriere de ARN care codifică o proteină și include pre-ARNm și ARNm matur, cu excepția cazului în care se specifică altfel.

Astfel cum se utilizează în prezenta, „nucleobază” semnifică o nucleobază nemodificată sau o nucleobază modificată. Astfel cum este utilizată în prezenta, o „nucleobază nemodificată” este adenină (A), timină (T), citozină (C), uracil (U) și guanină (G). Astfel cum se utilizează în prezenta, o „nucleobază modificată” este o grupare de atomi, alții decât A, T, C, U sau G nemodificat(ă), capabili să se împerecheze cu cel puțin o nucleobază nemodificată. O „5-metilcitozină” este o nucleobază modificată. O bază universală este o nucleobază modificată care se poate împerechea cu oricare dintre cele cinci nucleobaze nemodificate. Astfel cum se utilizează în prezenta, „secvență de nucleobaze” semnifică

ordinea nucleobazelor contigue dintr-un acid nucleic sau o oligonucleotidă, independent de orice modificare de zahar sau legătură internucleozidică.

Astfel cum se utilizează în prezenta, „nucleozidă” semnifică un compus care cuprinde o nucleobază și o fracțiune de zahar. Nucleobaza și fracțiunea de zahar sunt fiecare, în mod independent, nemodificată sau modificată. Astfel cum se utilizează în prezenta, „nucleozidă modificată” semnifică o nucleozidă care cuprinde o nucleobază modificată și/sau o fracțiune de zahar modificat. Nucleozidele modificate includ nucleozide abazice, cărora le lipsește o nucleobază. „Nucleozide legate” sunt nucleozide care sunt conectate într-o secvență continuă (adică, nu sunt prezentate nucleozide suplimentare între cele care sunt legate).

Astfel cum se utilizează în prezenta, „compus oligomeric” semnifică o oligonucleotidă și opțional una sau mai multe caracteristici suplimentare, cum ar fi o grupare conjugată sau o grupare terminală. Un compus oligomeric poate fi împerecheat cu un al doilea compus oligomeric care este complementar cu primul compus oligomeric sau poate fi neîmperecheat. Un „compus oligomeric monocatenar” este un compus oligomeric neîmperecheat. Termenul „duplex oligomeric” semnifică un duplex format din doi compuși oligomerici având secvențe de nucleobaze complementare. Fiecare compus oligomeric al unui duplex oligomeric poate fi denumit „compus oligomeric duplex”.

Astfel cum se utilizează în prezenta, „oligonucleotidă” semnifică o catenă de nucleozide legate conectate prin legături internucleozidice, în care fiecare nucleozidă și legătură internucleozidică poate fi modificată sau nemodificată. Cu excepția cazului în care se indică altfel, oligonucleotidele constau din 8-50 de nucleozide legate. Astfel cum se utilizează în prezenta, „oligonucleotidă modificată” semnifică o oligonucleotidă, în care cel puțin o nucleozidă sau legătură internucleozidică este modificată. Astfel cum se utilizează în prezenta, „oligonucleotidă nemodificată” semnifică o oligonucleotidă care nu cuprinde modificări de nucleozide sau modificări internucleozidice.

Astfel cum se utilizează în prezenta, „purător sau diluant acceptabil farmaceutic” semnifică orice substanță adecvată pentru utilizare în administrarea la un animal. Anumiți astfel de purtători permit formularea compozițiilor farmaceutice ca, de exemplu, tablete, pilule, drajeuri, capsule, lichide, geluri, siropuri, șlamuri, suspensii și pastile pentru ingerarea orală de către un subiect. În anumite variante de realizare, un purtător sau diluant acceptabil farmaceutic este apă sterilă; ser fiziologic steril; sau soluție tampon sterilă.

Astfel cum se utilizează în prezenta, „săruri acceptabile farmaceutic” semnifică săruri acceptabile fiziologic și farmaceutic ale compușilor, cum ar fi compuși oligomerici, adică săruri care păstrează activitatea biologică dorită a compusului părinte și nu îi contribuie la acestea cu efecte toxicologice nedorite.

Astfel cum se utilizează în prezenta, „compoziție farmaceutică” semnifică un amestec de substanțe adecvate pentru administrare la un subiect. De exemplu, o compoziție farmaceutică poate cuprinde o oligonucleotidă antisens și o soluție apoasă sterilă. În anumite variante de realizare, o compoziție farmaceutică prezintă activitate în testul de absorbție liberă în anumite linii celulare.

Astfel cum se utilizează în prezenta, „fracțiune de fosfor” semnifică o grupare de atomi care cuprinde un atom de fosfor. În anumite variante de realizare, o fracțiune de fosfor cuprinde un mono-, di- sau tri-fosfat, sau fosforotioat.

Astfel cum se utilizează în prezenta, „promedicament” semnifică un agent terapeutic având o formă în afara corpului care este convertită într-o formă diferită în interiorul unui animal sau celulelor acestuia. De obicei, conversia unui promedicament în interiorul animalului este favorizată de acțiunea unei enzime (de exemplu, enzimă endogenă sau virală) sau a substanțelor chimice prezente în celule sau țesuturi și/sau de condiții fiziologice.

Astfel cum se utilizează în prezenta, „reducerea sau inhibarea cantității sau activității” se referă la o reducere sau blocare a expresiei sau activității transcripționale în raport cu expresia sau activitatea transcripțională într-o probă netratată sau martor și nu indică neapărat o eliminare totală a expresiei sau activității transcripționale.

Astfel cum se utilizează în prezenta, „compus ARNi” semnifică un compus antisens care acționează, cel puțin parțial, prin RISC sau Ago2 pentru a modula un acid nucleic țintă și/sau o proteină codificată de un acid nucleic țintă. Compușii ARNi includ, dar nu se limitează la, siARN dublu catenar, ARN monocatenar (ssARN) și microARN, incluzând mimetice de microARN. În anumite variante de realizare, un compus ARNi modulează cantitatea, activitatea și/sau matisarea unui acid nucleic țintă. Termenul de compus ARNi exclude compușii antisens care acționează prin RNaza H.

Astfel cum se utilizează în prezenta, „autocomplementară” cu referire la o oligonucleotidă semnifică o oligonucleotidă care hibridizează cel puțin parțial cu ea însăși.

Astfel cum se utilizează în prezenta, „testul celular standard” semnifică testul descris în Exemplul 1 și variațiile rezonabile ale acestuia.

Astfel cum se utilizează în prezenta, „centru chiral stereoaleatoriu” în contextul unei populații de molecule cu formulă moleculară identică semnifică un centru chiral având o configurație stereochemică aleatorie. De exemplu, într-o populație de molecule care cuprinde un centru chiral stereoaleatoriu, numărul de molecule având configurația (*S*) a centrului chiral stereoaleatoriu poate fi, dar nu este neapărat același cu numărul de molecule având configurația (*R*) a centrului chiral stereoaleatoriu. Configurația stereochemică a unui centru chiral este considerată aleatorie atunci când este rezultatul unei metode sintetice care nu este concepută pentru a controla configurația stereochemică. În anumite variante de realizare, un centru chiral stereoaleatoriu este o legătură internucleozidică de fosforitoat stereoaleatorie.

Astfel cum se utilizează în prezenta, „fracțiune de zahar” semnifică o fracțiune de zahar nemodificat sau o fracțiune de zahar modificat. Astfel cum se utilizează în prezenta, „fracțiune de zahar nemodificat” semnifică o fracțiune de 2'-OH(H) furanozil, astfel cum se găsește în ARN (o „fracțiune de zahar de ARN nemodificat”), sau o fracțiune 2'-H(H), astfel cum se găsește în ADN (o „fracțiune de zahar de ADN nemodificat”). Fracțiunile de zahar nemodificat au câte un hidrogen în fiecare dintre pozițiile 1', 3' și 4', un oxigen în poziția 3' și doi hidrogeni în poziția 5'. Astfel cum se utilizează în prezenta, „fracțiune de zahar modificat” sau „zahar modificat” semnifică o fracțiune de zahar furanozil modificat sau un surogat de zahar. Astfel cum se utilizează în prezenta, fracțiune de zahar furanozil modificat semnifică un zahar furanozil care cuprinde un substituent non-hidrogen în locul cel puțin unui hidrogen dintr-o fracțiune de zahar nemodificat. În anumite variante de realizare, o fracțiune de zahar furanozil modificat este o fracțiune de zahar 2'-substituit. Astfel de fracțiuni de zahar furanozil modificat includ zaharuri biciclice și zaharuri nebiciclice.

Astfel cum se utilizează în prezenta, „surogat de zahar” semnifică o fracțiune de zahar modificat având alta decât o fracțiune furanozil care poate lega o nucleobază la o altă grupare, cum ar fi o legătură internucleozidică, o grupare conjugată sau o grupare terminală într-o oligonucleotidă. Nucleozidele modificate cuprinzând surogate de zahar pot fi încorporate într-una sau mai multe poziții în cadrul unei oligonucleotide și astfel de oligonucleotide sunt capabile să se hibridizeze cu compuși oligomerici sau acizi nucleici complementari.

Astfel cum se utilizează în prezenta, „acid nucleic țintă” și „ARN țintă” semnifică un acid nucleic pe care un compus antisens este proiectat să-l afecteze.

Astfel cum se utilizează în prezenta, „regiune țintă” semnifică o porțiune dintr-un acid nucleic țintă la care este proiectat să se hibridizeze un compus oligomeric.

Astfel cum se utilizează în prezenta, „grupare terminală” semnifică o grupare chimică sau o grupare de atomi care este legată covalent la un capăt terminal al unei oligonucleotide.

Astfel cum se utilizează în prezenta, „cantitate eficientă terapeutică” semnifică o cantitate dintr-un agent farmaceutic care furnizează un beneficiu terapeutic unui animal. De exemplu, o cantitate eficientă terapeutică îmbunătățește un simptom al unei boli.

I. Anumite oligonucleotide

În anumite variante de realizare, în prezenta sunt furnizate oligonucleotide care constau din nucleozide legate. Oligonucleotidele pot fi oligonucleotide nemodificate (ARN sau ADN) sau pot fi oligonucleotide modificate. Oligonucleotidele modificate cuprind cel puțin o modificare comparativ cu ARN sau ADN nemodificat. Adică, oligonucleotidele modificate cuprind cel puțin o nucleozidă modificată (cuprinzând o fracțiune de zahar modificat și/sau o nucleobază modificată) și/sau cel puțin o legătură internucleozidică modificată.

A. Anumite nucleozide modificate

Nucleozidele modificate cuprind o fracțiune de zahar modificat sau o nucleobază modificată sau atât o fracțiune de zahar modificat, cât și o nucleobază modificată.

1. Anumite fracțiuni de zahar

În anumite variante de realizare, fracțiunile de zahar modificat sunt fracțiuni de zahar modificat nebiciclice. În anumite cazuri, fracțiunile de zahar modificate sunt fracțiuni de zahar biciclice sau triciclice. În anumite cazuri, fracțiunile de zahar modificate sunt surogate de zahar. Astfel de surogate de zahar pot cuprinde una sau mai multe substituții corespunzătoare celor ale altor tipuri de fracțiuni de zahar modificat.

În anumite variante de realizare, fracțiunile de zahar modificat sunt fracțiuni de zahar modificat nebiciclice care cuprind un inel furanozil cu una sau mai multe grupări substituente, dintre care niciuna nu unește doi atomi ai inelului furanozil pentru a forma o structură biciclică. Astfel de substituenți fără punte pot fi în orice poziție a furanozilului, incluzând, dar fără a se limita la, substituenți în pozițiile 2', 4' și/sau 5'. În anumite cazuri, unul sau mai mulți substituenți fără punte ai fracțiunilor de zahar modificat nebiciclice sunt ramificați. Exemple de grupări 2'-substituente adecvate pentru fracțiunile de zahar modificat nebiciclice includ, dar nu se limitează la: 2'-F, 2'-OCH₃ ("OMe" sau "O-metil") și 2'-O(CH₂)₂OCH₃ ("MOE"). În anumite cazuri, grupările 2'-substituente sunt selectate dintre: halo, alil,

amino, azido, SH, CN, OCN, CF₃, OCF₃, O-C₁-C₁₀ alcoxi, O-C₁-C₁₀ alcoxi substituit, O-C₁-C₁₀ alchil, C₁-C₁₀ alchil substituit, S-alchil, N(R_m)-alchil, O-alchenil, S-alchenil, N(R_m)-alchenil, O-alchinil, S-alchinil, N(R_m)-alchinil, O-alchilenil-O-alchil, alchinil, alcaril, aralchil, O-alcaril, O-aralchil, O(CH₂)₂SCH₃, O(CH₂)₂ON(R_m)(R_n) sau OCH₂C(=O)-N(R_m)(R_n), în care fiecare R_m și R_n este, în mod independent, H, o grupare protectoare amino sau C₁-C₁₀ alchil substituit sau nesubstituit și grupările 2'-substituente descrise în Cook și colab., U.S. 6.531.584; Cook și colab., U.S. 5.859.221; și Cook și colab., U.S. 6.005.087. Anumite cazuri ale acestor grupări 2'-substituente pot fi substituite suplimentar cu una sau mai multe grupări substituente selectate independent dintre: hidroxil, amino, alcoxi, carboxi, benzii, fenil, nitro (NO₂), tiol, tioalcoxi, tioalchil, halogen, alchil, arii, alchenil și alchinil. Exemple de grupări 4'-substituente adecvate pentru fracțiunile de zahar modificat nebiciclice includ, dar nu se limitează la, alcoxi (de exemplu, metoxi), alchil și cele descrise în Manoharan și colab., WO 2015/106128. Exemple de grupări 5'-substituente adecvate pentru fracțiunile de zahar modificat nebiciclice includ, dar nu se limitează la: 5'-metil (R sau S), 5'-vinil și 5'-metoxi. În anumite cazuri, fracțiunile de zahar modificat nebiciclice cuprind mai mult de un substituent de zahar fără punte, de exemplu, fracțiuni de zahar 2'-F-5'-metil și fracțiunile de zahar modificat și nucleozidele modificate descrise în Migawa și colab., WO 2008/101157 și Rajeev și colab., US2013/0203836.).

În anumite cazuri, o nucleozidă modificată nebiciclică 2'-substituită cuprinde o fracțiune de zahar care cuprinde o grupare 2'-substituentă fără punte selectată dintre: F, NH₂, N₃, OCF₃, OCH₃, O(CH₂)₃NH₂, CH₂CH=CH₂, OCH₂CH=CH₂, OCH₂CH₂OCH₃, O(CH₂)₂SCH₃, O(CH₂)₂ON(R_m)(R_n), O(CH₂)₂O(CH₂)₂N(CH₃)₂ și acetamidă N-substituită (OCH₂C(=O)-N(R_m)(R_n)), în care fiecare R_m și R_n este, în mod independent, H, o grupare amino protectoare sau C₁-C₁₀ alchil substituit sau nesubstituit.

În anumite cazuri, o nucleozidă nebiciclică modificată cu nucleozidă 2'-substituită cuprinde o fracțiune de zahar care cuprinde o grupare 2'-substituentă fără punte selectată dintre: F, OCF₃, OCH₃, OCH₂CH₂OCH₃, O(CH₂)₂SCH₃, O(CH₂)₂ON(CH₃)₂, O(CH₂)₂O(CH₂)₂N(CH₃)₂ și OCH₂C(=O)-N(H)CH₃ ("NMA").

În anumite cazuri, o nucleozidă modificată nebiciclică 2'-substituită cuprinde o fracțiune de zahar care cuprinde o grupare 2'-substituentă fără punte selectată dintre: F, OCH₃ și OCH₂CH₂OCH₃.

Anumite fracțiuni de zahar modificat cuprind un substituent care formează punte între doi atomi ai inelului furanozil pentru a forma un al doilea inel, rezultând o fracțiune de zahar biciclică. În anumite astfel de cazuri, fracțiunea de zahar biciclică cuprinde o punte între atomii 4' și 2' din inelul de furanoză. Exemple de astfel de substituenți de zahar de formare de punți de la 4' la 2' includ, dar nu se limitează la: 4'-CH₂-2', 4'-(CH₂)₂-2', 4'-(CH₂)₃-2', 4'-CH₂-O-2' ("LNA"), 4'-CH₂-S-2', 4'-(CH₂)₂-O-2' ("ENA"), 4'-CH(CH₃)-O-2' (denumit „etil constrâns” sau „cEt”), 4'-CH₂-O-CH₂-2', 4'-CH₂-N(R)-2', 4'-CH(CH₂OCH₃)-O-2' („MOE constrâns” sau „cMOE”) și analogi ai acestora (*a se vedea, de exemplu*, Seth și colab., U.S. 7.399.845, Bhat și colab., U.S. 7.569.686, Swayze și colab., U.S. 7.741.457, și Swayze și colab., U.S. 8.022.193), 4'-C(CH₃)(CH₃)-O-2' și analogi ai acestuia (*a se vedea, de exemplu*, Seth și colab., U.S. 8.278.283), 4'-CH₂-N(OCH₃)-2' și analogi ai acestuia (*a se vedea, de exemplu*, Prakash și colab., U.S. 8.278.425), 4'-CH₂-O-N(CH₃)-2' (*a se vedea, de exemplu*, Allerson și colab., U.S. 7.696.345 și Allerson și colab., U.S. 8.124.745), 4'-CH₂-C(H)(CH₃)-2' (*a se vedea, de exemplu*, Zhou, și colab., *J. Org. Chem.*, 2009, 74, 118-134), 4'-CH₂-C(=CH₂)-2' și analogi ai acestuia (*a se vedea, de exemplu*, Seth și colab., U.S. 8.278.426), 4'-C(R_aR_b)-N(R)-O-2', 4'-C(R_aR_b)-O-N(R)-2', 4'-CH₂-O-N(R)-2', și 4'-CH₂-N(R)-O-2', în care fiecare R, R_a și R_b este, în mod independent, H, o grupare protectoare sau C₁-C₁₂ alchil (*a se vedea, de exemplu* Imanishi și colab., U.S. 7.427.672).

În anumite cazuri, astfel de punți 4' la 2' cuprind în mod independent de la 1 până la 4 grupări legate în mod independent selectate dintre: -[C(R_a)(R_b)]_n-, -[C(R_a)(R_b)]_n-O-, -C(R_a)=C(R_b)-, -C(R_a)=N-, -C(=NR_a)-, -C(=O)-, -C(=S)-, -O-, -Si(R_a)₂-, -S(=O)_x- și -N(R_a)-;

în care:

x este 0, 1 sau 2;

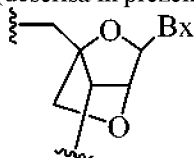
n este 1, 2, 3 sau 4;

fiecare R_a și R_b este, în mod independent, H, o grupare protectoare, hidroxil, alchil C₁-C₁₂, alchil C₁-C₁₂ substituit, alchenil C₂-C₁₂, alchenil C₂-C₁₂ substituit, alchinil C₂-C₁₂, alchinil C₂-C₁₂ substituit, aril C₅-C₂₀, aril C₅-C₂₀ substituit, radical heterociclic, radical heterociclic substituit, heteroaril, heteroaril substituit, radical aliciclic C₅-C₇, radical aliciclic C₅-C₇ substituit, halogen, OJ₁, NJ₁J₂, SJ₁, N₃, COOJ₁, acil (C(=O)-H), acil substituit, CN, sulfonil (S(=O)₂-J₁) sau sulfoxil (S(=O)-J₁); și

fiecare J₁ și J₂ este, în mod independent, H, alchil C₁-C₁₂, alchil C₁-C₁₂ substituit, alchenil C₂-C₁₂, alchenil C₂-C₁₂ substituit, alchinil C₂-C₁₂, alchinil C₂-C₁₂ substituit, aril C₅-C₂₀, aril C₅-C₂₀ substituit, acil (C(=O)-H), acil substituit, un radical heterociclic, un radical heterociclic substituit, aminoalchil C₁-C₁₂, aminoalchil C₁-C₁₂ substituit sau o grupare protectoare.

Fracțiuni de zahar biciclice suplimentare sunt cunoscute în domeniu, a se vedea, de exemplu: Freier și colab., *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(22), 4429-4443, Albaek și colab., *J. Org. Chem.*, 2006, 71, 7731-7740, Singh și colab., *Chem. Commun.*, 1998, 4, 455-456; Koshkin și colab., *Tetrahedron*, 1998, 54, 3607-3630; Kumar și colab., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1998, 8, 2219-2222; Singh și colab., *J. Org. Chem.*, 1998, 63, 10035-10039; Srivastava și colab., *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, 123, 8362-8379; Wengel și colab., U.S. 7.053.207; Imanishi și colab., U.S. 6.268.490; Imanishi și colab., U.S. 6.770.748; Imanishi și colab., U.S. RE44.779; Wengel și colab., U.S. 6.794.499; Wengel și colab., U.S. 6.670.461; Wengel și colab., U.S. 7.034.133; Wengel și colab., U.S. 8.080.644; Wengel și colab., U.S. 8.034.909; Wengel și colab., U.S. 8.153.365; Wengel și colab., U.S. 7.572.582; și Ramasamy și colab., U.S. 6.525.191; Torsten și colab., WO 2004/106356; Wengel și colab., WO 1999/014226; Seth și colab., WO 2007/134181; Seth și colab., U.S. 7.547.684; Seth și colab., U.S. 7.666.854; Seth și colab., U.S. 8.088.746; Seth și colab., U.S. 7.750.131; Seth și colab., U.S. 8.030.467; Seth și colab., U.S. 8.268.980; Seth și colab., U.S. 8.546.556; Seth și colab., U.S. 8.530.640; Migawa și colab., U.S. 9.012.421; Seth și colab., U.S. 8.501.805; și publicările de brevet U.S. nr. Allerson și colab., US2008/0039618 și Migawa și colab., US2015/0191727.

În anumite cazuri, fracțiunile de zahar biciclice și nucleozidele care încorporează un astfel de fracțiuni de zahar biciclice sunt în plus definite prin configurația izomerică. De exemplu, o nucleozidă LNA (descrisă în prezenta) poate fi în configurația α -L sau în configurația β -D.



LNA (configurație β -D)

punte = 4'-CH₂-O-2'



α -L-LNA (configurație α -L)

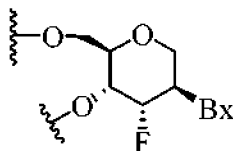
punte = 4'-CH₂-O-2'

Nucleozidele biciclice α -L-metilenoxi (4'-CH₂-O-2') sau α -L-LNA au fost încorporate în oligonucleotide antisens care au prezentat activitate antisens (Frieden și colab., *Nucleic Acids Research*, 2003, 31, 6365-6372). În prezenta, descrierile generale ale nucleozidelor biciclice includ ambele configurații izomerice. Atunci când pozițiile nucleozidelor biciclice specifice (de exemplu, LNA sau cEt) sunt identificate în cazuri exemplificate în prezenta, acestea sunt în configurația β -D, dacă nu se specifică altfel.

În anumite cazuri, fracțiunile de zahar modificate cuprind unul sau mai mulți substituenți de zahar care nu formează punte și unul sau mai mulți substituenți de zahăr care formează punte (de exemplu, zaharuri 5'-substituite și cu punte 4'-2').

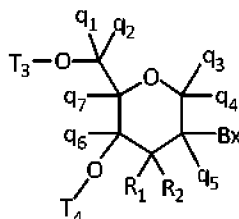
În anumite cazuri, fracțiunile de zahar modificat sunt surrogat de zahar. În anumite astfel de cazuri, atomul de oxigen al fracțiunii de zahar este înlocuit, de exemplu, cu un atom de sulf, carbon sau azot. În anumite astfel de cazuri, astfel de fracțiuni de zahar modificat cuprind, de asemenea, substituenți care formează punte și/sau care nu formează punte astfel cum sunt descriși în prezenta. De exemplu, anumite surrogat de zahar cuprind un atom de sulf în poziția 4' și o substituție în poziția 2' (a se vedea, de exemplu, Bhat și colab., U.S. 7.875.733 și Bhat și colab., U.S. 7.939.677) și/sau în poziția 5'.

În anumite cazuri, surrogatele de zahar cuprind inele având un număr de atomi diferit de 5. De exemplu, în anumite cazuri, un surrogat de zahar cuprinde un tetrahidropiran cu șase membri („THP”). Astfel de tetrahidropirani pot fi în plus modificați sau substituiți. Nucleozidele care cuprind astfel de tetrahidropirani modificați includ, dar nu se limitează la, acid nucleic hexitol („HNA”), acid nucleic anitol („ANA”), acid nucleic manitol („MNA”) (a se vedea, de exemplu, Leumann, *CJ. Bioorg. & Med. Chem.* 2002, 10, 841-854), fluoro HNA:



F-HNA

(„F-HNA”, a se vedea, de exemplu Swayze și colab., U.S. 8.088.904; Swayze și colab., U.S. 8.440.803; Swayze și colab., U.S. 8.796.437; și Swayze și colab., U.S. 9.005.906; F-HNA poate fi denumit și F-THP sau 3'-fluoro tetrahidropiran) și nucleozidele cuprinzând compuși THP modificați suplimentari având formula:



în care, în mod independent, pentru fiecare dintre respectivele nucleozide THP modificate:

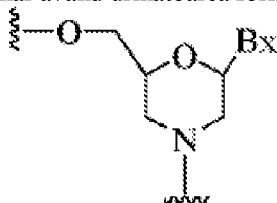
Bx este o fracțiune de nucleobază;

T₃ și T₄ sunt fiecare, în mod independent, o grupare de legătură internucleozidică care leagă nucleozida THP modificată la partea rămasă dintr-o oligonucleotidă sau unul dintre T₃ și T₄ este o grupare de legătură internucleozidică care leagă nucleozida THP modificată la partea rămasă dintr-o oligonucleotidă și celălalt dintre T₃ și T₄ este H, o grupare protectoare hidroxil, o grupare conjugată legată sau o grupare 5' sau 3' terminală; q₁, q₂, q₃, q₄, q₅, q₆ și q₇ sunt fiecare, în mod independent, H, alchil C₁-C₆, alchil C₁-C₆ substituit, alchenil C₂-C₆, alchenil C₂-C₆ substituit, alchinil C₂-C₆ sau alchinil C₂-C₆ substituit; și

fiecare dintre R₁ și R₂ este, în mod independent, selectat dintre: hidrogen, halogen, alcoxi substituit sau nesubstituit, NJ₁J₂, SJ₁, N₃, OC(=X)J₁, OC(=X)NJ₁J₂, NJ₃C(=X)NJ₁J₂, și CN, în care X este O, S sau NJ₁ și fiecare J₁, J₂ și J₃ este, în mod independent, H sau alchil C₁-C₆.

În anumite cazuri, sunt furnizate nucleotide THP modificate în care q₁, q₂, q₃, q₄, q₅, q₆ și q₇ sunt fiecare H. În anumite cazuri, cel puțin unul dintre q₁, q₂, q₃, q₄, q₅, q₆ și q₇ este diferit de H. În anumite cazuri, cel puțin unul dintre q₁, q₂, q₃, q₄, q₅, q₆ și q₇ este metil. În anumite cazuri, sunt furnizate nucleozide THP modificate în care unul dintre R₁ și R₂ este F. În anumite cazuri, R₁ este F și R₂ este H; în anumite cazuri, R₁ este metoxi și R₂ este H, iar în anumite cazuri, R₁ este metoxietoxi și R₂ este H.

În anumite cazuri, surrogatele de zahăr cuprind inele având mai mult de 5 atomi și mai mult de un heteroatom. De exemplu, au fost raportate nucleozide care cuprind fracțiuni de zahăr morfolino și utilizarea lor în oligonucleotide (*a se vedea, de exemplu*, Braasch și colab., *Biochemistry*, 2002, 41, 4503-4510 și Summerton și colab., U.S. 5.698.685; Summerton și colab., U.S. 5.166.315; Summerton și colab., U.S. 5.185.444; și Summerton și colab., U.S. 5.034.506). Astfel cum se utilizează în prezenta, termenul "morfolino" semnifică un surrogat de zahăr având următoarea formulă:



În anumite cazuri, grupările morfolino pot fi modificate, de exemplu prin adăugarea sau modificarea diferitelor grupări substituente din structura morfolino de mai sus. Astfel de surrogat de zahăr sunt denumite în prezenta ca "grupări morfolino modificate."

În anumite cazuri, surrogatele de zahăr cuprind fracțiuni aciclice. Exemple de nucleozide și oligonucleotide care cuprind astfel de surrogat de zahăr aciclice includ, dar nu se limitează la: acid nucleic peptidic („PNA”), acid nucleic butil aciclic (*a se vedea, de exemplu*, Kumar și colab., *Org. Biomol. Chem.*, 2013, 11, 5853-5865), și nucleozidele și oligonucleotidele descrise în Manoharan și colab., WO2011/133876.

În domeniu sunt cunoscute multe alte sisteme inelare de zahăr și surrogat de zahăr biciclice și triciclice care pot fi utilizate în nucleozidele modificate).

2. Anumite nucleobaze modificate

În anumite variante de realizare, oligonucleotidele modificate cuprind una sau mai multe nucleozide cuprinzând o nucleobază nemodificată. În anumite variante de realizare, oligonucleotidele modificate cuprind una sau mai multe nucleozide cuprinzând o nucleobază modificată. În anumite cazuri, oligonucleotidele modificate cuprind una sau mai multe nucleozide care nu conțin o nucleobază, denumite nucleozide abazice.

În anumite cazuri, nucleobazele modificate sunt selectate dintre: pirimidine 5-substituite, 6-azapirimidine, pirimidine substituite cu alchil sau alchinil, purine substituite cu alchil și purine substituite cu N-2, N-6 și O-6. În anumite cazuri, nucleobazele modificate sunt selectate dintre: 2-aminopropiladenină, 5-hidroximetilcitozină, xantină, hipoxantină, 2-aminoadenină, 6-N-metilguanină, 6-N-metiladenină, 2-propiladenină, 2-tiouracil, 2-tiotimină și 2-tiocitozină, 5-propinil (-C≡C-CH₃) uracil, 5-propinilcitozină, 6-azouracil, 6-azocitozină, 6-azotimină, 5-riboziluracil (pseudouracil), 4-tiouracil, 8-

halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalchil, 8-hidroxil, 8-aza și alte purine 8-substituie, 5-halo, în special 5-brom, 5-trifluormetil, 5-halouracil și 5-halocitozină, 7-metilguanină, 7-metiladenină, 2-F-adenină, 2-aminoadenină, 7-deazaguanină, 7-deazaadenină, 3-deazaguanină, 3-deazaadenină, 6-N-benzoiladenină, 2-N-izobutirilguanină, 4-N-benzoilcitozină, 4-N-benzoiluracil, 5-metil 4-N-benzoilcitozină, 5-metil 4-N-benzoiluracil, baze universale, baze hidrofobe, baze promiscue, baze expandate în mărime și baze fluorurate. Alte nucleobaze modificate includ pirimidine triciclice, cum ar fi 1,3-diazafenoxazin-2-onă, 1,3-diazafenotiazin-2-onă și 9-(2-aminoetoxi)-1,3-diazafenoxazin-2-onă (clemă G). Nucleobazele modificate le pot include, de asemenea, pe cele în care baza purinică sau de pirimidină este înlocuită cu alți heterocicli, de exemplu 7-deaza-adenină, 7-deazaguanozină, 2-aminopiridină și 2-piridonă. Alte nucleobaze le includ pe cele descrise în Merigan și colab., U.S. 3.687.808, cele dezvăluite în *The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering*, Kroschwitz, J.I., Ed., John Wiley & Sons, 1990, 858-859; Englisch și colab., *Angewandte Chemie*, International Edition, 1991, 30, 613; Sanghvi, Y.S., capitolul 15, *Antisense Research and Applications*, Crooke, S.T. și Lebleu, B., Eds., CRC Press, 1993, 273-288; și cele dezvăluite în capitolele 6 și 15, *Antisense Drug Technology*, Crooke S.T., Ed., CRC Press, 2008, 163-166 și 442-443.

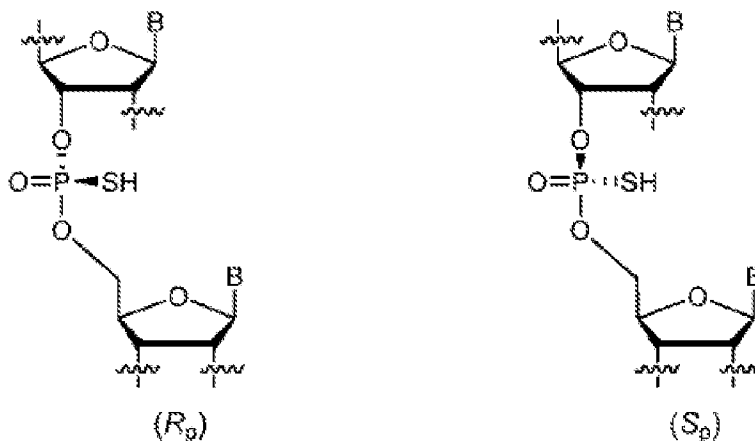
Publicațiile care învață prepararea anumitor nucleobaze modificate menționate mai sus, precum și a altor nucleobaze modificate includ, fără limitare, Manohara și colab., US2003/0158403; Manoharan și colab., US2003/0175906; Dinh și colab., U.S. 4.845.205; Spielvogel și colab., U.S. 5.130.302; Rogers și colab., U.S. 5.134.066; Bischofberger și colab., U.S. 5.175.273; Urdea și colab., U.S. 5.367.066; Benner și colab., U.S. 5.432.272; Matteucci și colab., U.S. 5.434.257; Gmeiner și colab., U.S. 5.457.187; Cook și colab., U.S. 5.459.255; Froehler și colab., U.S. 5.484.908; Matteucci și colab., U.S. 5.502.177; Hawkins și colab., U.S. 5.525.711; Haralambidis și colab., U.S. 5.552.540; Cook și colab., U.S. 5.587.469; Froehler și colab., U.S. 5.594.121; Switzer și colab., U.S. 5.596.091; Cook și colab., U.S. 5.614.617; Froehler și colab., U.S. 5.645.985; Cook și colab., U.S. 5.681.941; Cook și colab., U.S. 5.811.534; Cook și colab., U.S. 5.750.692; Cook și colab., U.S. 5.948.903; Cook și colab., U.S. 5.587.470; Cook și colab., U.S. 5.457.191; Matteucci și colab., U.S. 5.763.588; Froehler și colab., U.S. 5.830.653; Cook și colab., U.S. 5.808.027; Cook și colab., 6.166.199; și Matteucci și colab., U.S. 6.005.096.

3. Anumite legături internucleozidice modificate

Nucleozidele oligonucleotidelor modificate pot fi legate între ele folosind orice legătură internucleozidică. Cele două clase principale de grupări de legătură internucleozidice sunt definite de prezența sau absența unui atom de fosfor. Legăturile internucleozidice reprezentative care conțin fosfor includ, dar nu se limitează la, fosfați, care conțin o legătură de fosfodiester ("P=O") (denumite și legături nemodificate sau care apar în mod natural), fosfotriesteri, metilfosfonați, fosforamidați și fosforotioați ("P=S") și fosforoditioați ("HS-P=S"). Grupările de legătură internucleozidice reprezentative care nu conțin fosfor conțin includ, dar nu se limitează la, metilenmetilimino (-CH₂-N(CH₃)-O-CH₂-), tiodiester, tionocarbamat (-O-C(=O)(NH)-S-); siloxan (-O-SiH₂-O-); și N,N'-dimetilhidrazină (-CH₂-N(CH₃)-N(CH₃)-). Legăturile internucleozidice modificate, în comparație cu legăturile fosfat care apar în mod natural, pot fi utilizate pentru a modifica, de obicei pentru a crește rezistența la nuclează a oligonucleotidei. Pentru persoanele de specialitate în domeniu sunt bine cunoscute metodele de preparare a legăturilor internucleozidice care conțin fosfor și care nu conțin fosfor.

Legăturile internucleozidice reprezentative având un centru chiral includ, dar nu sunt limitate la alchilfosfonați și fosforotioați. Oligonucleotidele modificate cuprinzând legături internucleozidice având un centru chiral pot fi preparate ca populații de oligonucleotide modificate cuprinzând legături internucleozidice stereoaleatorii sau ca populații de oligonucleotide modificate cuprinzând legături fosforotioat în anumite configurații stereochemice. În anumite variante de realizare, populațiile de oligonucleotide modificate cuprind legături internucleozidice fosforotioat în care toate legăturile internucleozidice de fosforotioat sunt stereoaleatorii. Astfel de oligonucleotide modificate pot fi generate folosind metode sintetice care au ca rezultat selecția aleatorie a configurației stereochemice a fiecărei legături de fosforotioat. Cu toate acestea, astfel cum este bine înțeles de către persoanele de specialitate în domeniu, fiecare fosforotioat individual al fiecărei molecule individuale de oligonucleotidă are o stereoconfigurație definită. În anumite variante de realizare, populațiile de oligonucleotide modificate sunt îmbogățite cu oligonucleotide modificate cuprinzând una sau mai multe legături internucleozidice de fosforotioat particulare într-o anumită configurație stereochemică, selectată independent. În anumite variante de realizare, configurația particulară a legăturii de fosforotioat particulare este prezentă în cel puțin 65% din moleculele din populație. În anumite variante de realizare, configurația particulară a legăturii de fosforotioat particulare este prezentă în cel puțin 70% din moleculele din populație. În anumite variante de realizare, configurația particulară a legăturii de fosforotioat particulare este prezentă în cel puțin 80% din moleculele din populație. În anumite variante de realizare, configurația particulară a

legăturii de fosforotioat particulare este prezentă în cel puțin 90% din moleculele din populație. În anumite variante de realizare, configurația particulară a legăturii de fosforotioat particulare este prezentă în cel puțin 99% din moleculele din populație. Astfel de populații îmbogățite chiral de oligonucleotide modificate pot fi generate folosind metode sintetice cunoscute în domeniu, *de exemplu*, metodele descrise în Oka și colab., *JACS* 125, 8307 (2003), Wan și colab. *Nuc. Acid. Res.* 42, 13456 (2014) și WO 2017/015555. În anumite variante de realizare, o populație de oligonucleotide modificate este îmbogățită cu oligonucleotide modificate având cel puțin un fosforotioat indicat în configurația (*Sp*). În anumite variante de realizare, o populație de oligonucleotide modificate este îmbogățită cu oligonucleotide modificate având cel puțin un fosforotioat în configurația (*Rp*). În anumite variante de realizare, oligonucleotidele modificate care cuprind fosforotioați (*Rp*) și/sau (*Sp*) cuprind una sau, respectiv, mai multe dintre următoarele formule, în care „B” indică o nucleobază:



Cu excepția cazului în care se indică altfel, legăturile internucleozidice chirale ale oligonucleotidelor modificate descrise în prezenta pot fi stereoaleatorii sau într-o configurație stereochimică particulară.

Legăturile internucleozidice neutre includ, fără limitare, fosfortriesteri, metilfosfonați, MMI (3'-CH₂-N(CH₃)-O-5'), amida-3 (3'-CH₂-C(=O)-N(H)-5'), amidă-4 (3'-CH₂-N(H)-C(=O)-5'), formacetal (3'-O-CH₂-O-5'), metoxipropil, și tioformacetal (3'-S-CH₂-O-5'). Alte legături internucleozidice neutre includ legături neionice care cuprind siloxan (dialchilsiloxan), ester carboxilat, carboxamidă, sulfură, ester sulfonat și amide (a se vedea, de exemplu: *Carbohydrate Modifications in Antisense Research*; Y.S. Sanghvi și P.D. Cook, Eds., ACS Symposium Series 580; Capitolele 3 și 4, 40-65). Alte legături internucleozidice neutre includ legături neionice cuprinzând părți componente mixte de N, O, S și CH₂.

B. Anumite motive

În anumite variante de realizare, oligonucleotidele modificate cuprind una sau mai multe nucleozide modificate cuprinzând o fracțiune de zahar modificat. În anumite variante de realizare, oligonucleotidele modificate cuprind una sau mai multe nucleozide modificate cuprinzând o nucleobază modificată. În anumite variante de realizare, oligonucleotidele modificate cuprind una sau mai multe legături internucleozidice modificate. În astfel de variante de realizare, fracțiunile de zahar modificat, nemodificat și modificat diferit, nucleobazele și/sau legăturile internucleozidice ale unei oligonucleotide modificate definesc un model sau un motiv. În anumite variante de realizare, modelele de fracțiuni de zahar, nucleobaze și legături internucleozidice sunt fiecare independent unul de altul. Astfel, o oligonucleotidă modificată poate fi descrisă prin motivul său de zahar, motivul de nucleobază și/sau motivul de legături internucleozidice (astfel cum se utilizează în prezenta, un motiv de nucleobază descrie modificările asupra nucleobazelor independent de secvența de nucleobaze).

1. Anumite motive de zahar

În anumite variante de realizare, oligonucleotidele cuprind unul sau mai multe tipuri de zahar modificat și/sau fracțiune de zahar nemodificat dispuse de-a lungul oligonucleotidei sau al unei regiuni a acesteia într-un model definit sau motiv de zahar. În anumite cazuri, astfel de motive de zahar includ, dar nu se limitează la, oricare dintre modificările de zahar discutate în prezenta.

În anumite variante de realizare, oligonucleotidele modificate cuprind sau constau dintr-o regiune având un motiv de gapmer, care este definit de două regiuni externe sau „aripi” și o regiune centrală sau internă sau „gap”. Cele trei regiuni ale unui motiv gapmer (aripa 5', gapul și aripa 3') formează o secvență contiguă de nucleozide în care cel puțin unele dintre fracțiunile de zahar ale nucleozidelor fiecăreia dintre aripi diferă de cel puțin unele dintre fracțiunile de zahar ale nucleozidelor gapului. În mod specific, cel puțin fracțiunile de zahar ale nucleozidelor fiecăreia dintre aripi care sunt cel mai

aproape de gap (nucleozida cea mai apropiată de 3' din aripa 5' și nucleozida cea mai apropiată de 5' din aripa 3') diferă de fracțiunea de zahar a nucleozidelor gapului învecinat, definind astfel delimitarea dintre aripi și gap (adică, joncțiunea aripă/gap). În anumite variante de realizare, fracțiunile de zahar din interiorul gapului sunt aceleași unele cu altele. În anumite cazuri, gapul include una sau mai multe

5 nucleozide având o fracțiune de zahar care diferă de fracțiunea de zahar a uneia sau mai multor alte nucleozide ale gapului. În anumite variante de realizare, motivele de zahar ale celor două aripi sunt aceleași unul cu celălalt (gapmer simetric). În anumite cazuri, motivul de zahar al aripii 5' diferă de motivul de zahar al aripii 3' (gapmer asimetric).

În anumite variante de realizare, fiecare nucleozidă a fiecărei aripi a unui gapmer este o nucleozidă modificată.

În anumite variante de realizare, fiecare nucleozidă a gapului unui gapmer este o 2'-deoxi nucleozidă nemodificată.

În anumite variante de realizare, gapmerul este un deoxi gapmer. În variante de realizare, nucleozidele de pe partea cu gapul a fiecărei joncțiuni aripă/gap sunt 2'-deoxi nucleozide nemodificate, iar nucleozidele de pe partea cu aripa a fiecărei joncțiuni aripă/gap sunt nucleozide modificate. În anumite

15 variante de realizare, fiecare nucleozidă a gapului este o 2'-deoxi nucleozidă nemodificată. În anumite variante de realizare, fiecare nucleozidă a fiecărei aripi a unui gapmer este o nucleozidă modificată.

În anumite variante de realizare, oligonucleotidele modificate cuprind sau constau dintr-o regiune având un motiv de zahar complet modificat. În astfel de variante de realizare, fiecare nucleozidă a regiunii complet modificate a oligonucleotidei modificate cuprinde o fracțiune de zahar modificat. În anumite cazuri, fiecare nucleozidă a întregii oligonucleotide modificate cuprinde o fracțiune de zahar modificat. În anumite variante de realizare, oligonucleotidele modificate cuprind sau constau dintr-o regiune având un motiv de zahar complet modificat, în care fiecare nucleozidă din regiunea complet modificată cuprinde același fracțiune de zahar modificat, denumită în prezenta motiv de zahar modificat

20 uniform. În anumite cazuri, o oligonucleotidă complet modificată este o oligonucleotidă modificată uniform. În anumite cazuri, fiecare nucleozidă a unei modificări uniforme cuprinde aceeași modificare în 2'.

În prezenta, lungimile (numărul de nucleozide) ale celor trei regiuni ale unui gapmer pot fi furnizate folosind notația [# de nucleozide în aripa 5'] - [# de nucleozide în gap] - [# de nucleozide în aripa 3']. Astfel, un gapmer 5-8-5 constă din 5 nucleozide legate în fiecare aripă și 8 nucleozide legate în gap. Acolo unde o astfel de nomenclatură este urmată de o modificare specifică, acea modificare este modificarea în aripi, iar nucleozidele gapului cuprind zaharuri deoxinucleozidice nemodificate. Astfel, un gapmer MOE 5-8-5 constă din 5 nucleozide modificate MOE legate în aripa 5', 8 deoxinucleozide legate în gap și 5 nucleozide MOE legate în aripa 3'. În anumite variante de realizare, oligonucleotidele

30 modificate sunt gapmeri MOE 5-8-5.

2. Anumite motive ale nucleobazelor

În anumite variante de realizare, oligonucleotidele cuprind nucleobaze modificate și/sau nemodificate dispuse de-a lungul oligonucleotidei sau a unei regiuni a acesteia într-un model sau motiv definit. În anumite cazuri, fiecare nucleobază este modificată. În anumite cazuri, niciuna dintre

40 nucleobaze nu este modificată. În anumite cazuri, fiecare purină sau fiecare pirimidină este modificată. În anumite cazuri, fiecare adenină este modificată. În anumite cazuri, fiecare guanină este modificată. În anumite cazuri, fiecare timină este modificată. În anumite cazuri, fiecare uracil este modificat. În anumite variante de realizare, fiecare citozină este modificată. În anumite variante de realizare, unele sau toate nucleobazele de citozină dintr-o oligonucleotidă modificată sunt 5-metilcitozine. În anumite variante de realizare, toate nucleobazele de citozină sunt 5-metilcitozine și toate celelalte nucleobaze ale oligonucleotidei modificate sunt nucleobaze nemodificate.

45

În anumite variante de realizare, oligonucleotidele modificate cuprind un bloc de nucleobaze modificate. În anumite astfel de variante de realizare, blocul se află la capătul 3' al oligonucleotidei. În anumite variante de realizare, blocul se află în 3 nucleozide de la capătul 3' al oligonucleotidei. În anumite

50 variante de realizare, blocul se află la capătul 5' al oligonucleotidei. În anumite variante de realizare, blocul se află în 3 nucleozide de la capătul 5' al oligonucleotidei.

În anumite variante de realizare, oligonucleotidele având un motiv gapmer cuprind o nucleozidă care cuprinde o nucleobază modificată. În anumite astfel de variante de realizare, o nucleozidă care cuprinde o nucleobază modificată se află în gapul central al unei oligonucleotide având un motiv gapmer.

55 În anumite astfel de variante de realizare, fracțiunea de zahar a respectivei nucleozide este o fracțiune 2'-dezoxiribozil. În anumite cazuri, nucleobaza modificată este selectată dintre: o 2-tiopirimidină și o 5-propinpirimidină.

3. Anumite motive ale legăturilor internucleozidice

În anumite variante de realizare, oligonucleotidele cuprind legături internucleozidice modificate și/sau nemodificate dispuse de-a lungul oligonucleotidei sau a unei regiuni a acesteia într-un model sau motiv definit. În anumite cazuri, fiecare grupare de legătură internucleozidică este o legătură internucleozidică de fosfodiester ($P=O$). În anumite cazuri, fiecare legătură internucleozidică a unei oligonucleotide modificate este o legătură internucleozidică de fosforotioat ($P=S$). În anumite variante de realizare, fiecare legătură internucleozidică a unei oligonucleotide modificate este selectată în mod independent dintre o legătură internucleozidică de fosforotioat și o legătură internucleozidică de fosfodiester. În anumite variante de realizare, fiecare legătură internucleozidică de fosforotioat este selectată în mod independent dintre un fosforotioat stereoaleatoriu, un fosforotioat (Sp) și un fosforotioat (Rp). În anumite variante de realizare, motivul de zahar al unei oligonucleotide modificate este un gapmer și legăturile internucleozidice din interiorul gapului sunt toate modificate. În anumite astfel de variante de realizare, unele dintre legăturile internucleozidice din aripi sunt legături de fosfat nemodificat. În anumite variante de realizare, legăturile internucleozidice terminale sunt modificate. În anumite variante de realizare, motivul de zahar al unei oligonucleotide modificate este un gapmer, iar motivul de legături internucleozidice cuprinde cel puțin o legătură internucleozidică de fosfodiester în cel puțin o aripă, în care respectiva cel puțin o legătură de fosfodiester nu este o legătură internucleozidică terminală, iar legăturile internucleozidice rămase sunt legături internucleozidice de fosforotioat. În anumite astfel de variante de realizare, toate legăturile de fosforotioat sunt stereoaleatorii. În anumite variante de realizare, toate legăturile de fosforotioat din aripi sunt fosforotioați (Sp), iar gapul cuprinde cel puțin un motiv Sp , Sp , Rp . În anumite variante de realizare, populațiile de oligonucleotide modificate sunt îmbogățite cu oligonucleotide modificate cuprinzând astfel de motive de legături internucleozidice.

C. Anumite lungimi

Este posibil să se mărească sau să se scadă lungimea unei oligonucleotide fără a elimina din activitate. De exemplu, în Woolf și colab. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7305-7309, 1992), o serie de oligonucleotide cu lungimea de 13-25 nucleobaze au fost testate în ceea ce privește capacitatea lor de a induce clivarea unui ARN țintă într-un model de injecție cu ovocite. Oligonucleotide cu lungimea de 25 de nucleobaze cu 8 sau 11 baze nepotrivite în apropierea capetelor oligonucleotidelor au fost capabile să dirijeze clivajul specific al ARNm-ului țintă, deși într-o măsură mai mică decât oligonucleotidele care nu conțineau nepotriviri. În mod analog, clivajul specific țintei a fost realizat folosind oligonucleotide cu 13 nucleobaze, inclusiv cele cu 1 sau 3 nepotriviri.

Oligonucleotidele modificate conform invenției au o lungime de 18 nucleozide legate.

D. Anumite oligonucleotide modificate

În anumite variante de realizare, modificările de mai sus (zahar, nucleobază, legătură internucleozidică) sunt încorporate într-o oligonucleotidă modificată. În anumite variante de realizare, oligonucleotidele modificate sunt caracterizate prin motivele lor de modificare și lungimile totale. În anumite variante de realizare, astfel de parametri sunt fiecare independenți unii față de alții. Astfel, dacă nu se indică altfel, fiecare legătură internucleozidică a unei oligonucleotide având un motiv de zahar gapmer poate fi modificată sau nemodificată și poate să urmeze sau nu modelul de modificare al gapmerului în modificările zaharului. De exemplu, legăturile internucleozidice din regiunile aripilor unui gapmer de zahar pot fi aceleași sau diferite una de cealaltă și pot fi aceleași sau diferite de legăturile internucleozidice ale regiunii de gap a motivului de zahar. De asemenea, astfel de oligonucleotide cu gapmer de zahar pot cuprinde una sau mai multe nucleobaze modificate independent de modelul de gapmer al modificărilor zaharului. Dacă nu se indică altfel, toate modificările sunt independente de secvența de nucleobaze.

E. Anumite populații de oligonucleotide modificate

Populațiile de oligonucleotide modificate în care toate oligonucleotidele modificate ale populației au aceeași formulă moleculară pot fi populații stereoaleatorii sau populații îmbogățite chiral. Toți centrii chirali ai tuturor oligonucleotidelor modificate sunt stereoaleatorii într-o populație stereoaleatorie. Într-o populație îmbogățită chiral, cel puțin un anumit centru chiral nu este stereoaleatoriu în oligonucleotidele modificate ale populației. În anumite variante de realizare, oligonucleotidele modificate ale unei populații îmbogățite chiral sunt îmbogățite cu fracțiuni de zahar ribozil β -D, iar toate legăturile internucleozidice de fosforotioat sunt stereoaleatorii. În anumite variante de realizare, oligonucleotidele modificate ale unei populații îmbogățite chiral sunt îmbogățite atât cu fracțiuni de zahar ribozil β -D cât și cu cel puțin o legătură internucleozidică de fosforotioat particulară într-o configurație stereochimică particulară.

F. Secvența de nucleobaze

În anumite variante de realizare, oligonucleotidele (oligonucleotide nemodificate sau modificate) sunt descrise în continuare prin secvența lor de nucleobaze. În anumite variante de realizare,

oligonucleotidele au o secvență de nucleobaze care este complementară cu o a doua oligonucleotidă sau cu un acid nucleic de referință identificat, cum ar fi un acid nucleic țintă. În anumite variante de realizare, o regiune a unei oligonucleotide are o secvență de nucleobaze care este complementară cu o a doua oligonucleotidă sau un acid nucleic de referință identificat, cum ar fi un acid nucleic țintă. În anumite variante de realizare, secvența de nucleobaze a unei regiuni sau a întregii lungimi a unei oligonucleotide este de cel puțin 50%, cel puțin 60%, cel puțin 70%, cel puțin 80%, cel puțin 85%, cel puțin 90%, cel puțin 95%, sau 100% complementară cu a doua oligonucleotidă sau acid nucleic, cum ar fi un acid nucleic țintă.

II. Anumiți compuși oligomerici

În anumite variante de realizare, invenția furnizează compuși oligomerici, care constau dintr-o oligonucleotidă (modificată sau nemodificată) și opțional una sau mai multe grupări conjugate și/sau grupări terminale. Grupările conjugate constau din una sau mai multe fracțiuni conjugate și un linker conjugat care leagă fracțiunea conjugată la oligonucleotidă. Grupările conjugate pot fi atașate la unul sau ambele capete ale unei oligonucleotide și/sau la orice poziție internă. În anumite variante de realizare, grupările conjugate sunt atașate la poziția 2' a unei nucleozide a unei oligonucleotide modificate. În anumite variante de realizare, grupările conjugate care sunt atașate la unul sau ambele capete ale unei oligonucleotide sunt grupări terminale. În anumite astfel de variante de realizare, grupările conjugate sau grupările terminale sunt atașate la capătul 3' și/sau 5' al oligonucleotidelor. În anumite astfel de variante de realizare, grupările conjugate (sau grupările terminale) sunt atașate la capătul 3' al oligonucleotidelor. În anumite variante de realizare, grupările conjugate (sau grupările terminale) sunt atașate la capătul 5' al oligonucleotidelor. În anumite variante de realizare, grupările conjugate sunt atașate aproape de capătul 5' al oligonucleotidelor.

Exemple de grupări terminale includ, dar nu se limitează la, grupări conjugate, grupări de bonetare, fracțiuni fosfat, grupări protectoare, nucleozide modificate sau nemodificate și două sau mai multe nucleozide care sunt modificate sau nemodificate în mod independent.

A. Anumite grupări conjugate

În anumite variante de realizare, oligonucleotidele sunt atașate covalent la una sau mai multe grupări conjugate. În anumite variante de realizare, grupările conjugate modifică una sau mai multe proprietăți ale oligonucleotidei atașate, incluzând, dar fără a se limita la, farmacodinamică, farmacocinetică, stabilitate, legare, absorbție, distribuție tisulară, distribuție celulară, absorbție celulară, încărcare și clearance. În anumite variante de realizare, grupările conjugate conferă o nouă proprietate oligonucleotidei atașate, *de exemplu*, fluorofori sau grupări raportoare care permit detectarea oligonucleotidei. Anumite grupări conjugate și fracțiuni conjugate au fost descrise anterior, *de exemplu*: fracțiune de colesterol (Letsinger și colab., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86, 6553-6556), acid colic (Manoharan și colab., *Bioorg Med. Chem. Lett.*, 1994, 4, 1053-1060), un tioeter, *de exemplu*, hexil-S-tritilol (Manoharan și colab., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1992, 660, 306-309; Manoharan și colab., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1993, 3, 2765-2770), un tiocolesterol (Oberhauser și colab., *Nucl. Acids Res.*, 1992, 20, 533-538), un lanț alifatic, *de exemplu*, reziduuri de do-decan-diol sau undecil (Saison-Behmoaras și colab., *EMBO J.*, 1991, 10, 1111-1118; Kabanov și colab., *FEBS Lett.*, 1990, 259, 327-330; Svinarchuk și colab., *Biochimie*, 1993, 75, 49-54), o fosfolipidă, *de exemplu*, di-hexadecil-rac-glicerol sau 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonat de trietil-amoniu (Manoharan și colab., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36, 3651-3654; Shea și colab., *Nucl. Acids Res.*, 1990, 18, 3777-3783), o poliamină sau un lanț de polietilen glicol (Manoharan și colab., *Nucleosides & Nucleotides*, 1995, 14, 969-973), sau acid adamantan acetic o fracțiune de palmitil (Mishra și colab., *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264, 229-237), o fracțiune de octadecilamină sau hexilamino-carbonil-oxicoolesterol (Crooke și colab., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, 277, 923-937), o grupare tocoferol (Nishina și colab., *Molecular Therapy Nucleic Acids*, 2015, 4, e220; și Nishina și colab., *Molecular Therapy*, 2008, 16, 734-740), sau un cluster GalNAc (*de exemplu*, WO2014/179620).

1. Fracțiuni conjugate

Fracțiunile conjugate includ, fără limitare, intercalatori, molecule reporter, poliamine, poliamide, peptide, carbohidrați, fracțiuni de vitamine, polietilen glicoli, tioeteri, polieteri, colesterolii, tiocolesterolii, fracțiuni de acid colic, folat, lipide, fosfolipide, biotină, fenazină, fenantridină, antrachinonă, adamantan, acridină, fluoresceină, rodamine, cumarine, fluorofori și coloranți.

În anumite variante de realizare, o fracțiune conjugată cuprinde o substanță medicamentoasă activă, *de exemplu*, aspirină, warfarină, fenilbutazonă, ibuprofen, suprofen, fen-bufen, ketoprofen, (S)-(+)-pranoprofen, carprofen, dansilsarcozină, acid 2,3,5-triodobenzoic, fingolimod, acid flufenamic, acid folinic, o benzotiadiazidă, clorotiazidă, o diazepină, indo-meticină, un barbituric, o cefalosporină, un medicament sulfa, un antidiabetic, un antibacterian sau un antibiotic.

2. Linkeri de conjugare

Fracțiunile conjugate sunt atașate la oligonucleotide prin linkeri conjugați. În anumiți compuși oligomerici, linkerul conjugat este o singură legătură chimică (adică, fracțiunea conjugată este atașată direct la o oligonucleotidă printr-o legătură simplă). În anumite variante de realizare, linkerul conjugat cuprinde o structură de lanț, cum ar fi un lanț hidrocarbil, sau un oligomer de unități repetate cum ar fi etilenglicol, nucleozide sau unități de aminoacizi.

În anumite variante de realizare, un linker conjugat cuprinde una sau mai multe grupări selectate dintre alchil, amino, oxo, amidă, disulfură, polietilen glicol, eter, tioeter și hidroxilamino. În anumite astfel de variante de realizare, linkerul conjugat cuprinde grupări selectate dintre grupări alchil, amino, oxo, amidă și eter. În anumite variante de realizare, linkerul conjugat cuprinde grupări selectate dintre grupări alchil și amidă. În anumite variante de realizare, linkerul conjugat cuprinde grupări selectate dintre grupări alchil și eter. În anumite variante de realizare, linkerul conjugat cuprinde cel puțin o fracțiune de fosfor. În anumite variante de realizare, linkerul conjugat cuprinde cel puțin o grupare fosfat. În anumite variante de realizare, linkerul conjugat include cel puțin o grupare de legătură neutră.

În anumite variante de realizare, linkerii conjugați, inclusiv linkerii conjugați descriși mai sus, sunt fracțiuni de legare bifuncționale, *de exemplu*, cele cunoscute în domeniu ca fiind utile pentru atașarea grupărilor conjugate la compuși părinți, cum ar fi oligonucleotidele furnizate în prezenta. În general, o fracțiune de legare bifuncțională cuprinde cel puțin două grupări funcționale. Una dintre grupările funcționale este selectată pentru a se lega la un anumit situs al unui compus părinte, iar cealaltă este selectată pentru a se lega la o grupare conjugată. Exemple de grupări funcționale utilizate într-o fracțiune de legare bifuncțională includ, dar nu se limitează la, electrofile pentru reacția cu grupări nucleofile și nucleofile pentru reacția cu grupări electrofile. În anumite variante de realizare, fracțiunile de legare bifuncționale cuprind una sau mai multe grupări selectate dintre amino, hidroxil, acid carboxilic, tiol, alchil, alchenil și alchinil.

Exemple de linkeri conjugați includ, dar nu se limitează la, pirolidină, acid 8-amino-3,6-dioxaoctanoic (ADO), 4-(N-maleimidometil)ciclohexan-1-carboxilat de succinimidil (SMCC) și acid 6-aminohexanoic (AHEX sau AHA). Alți linkeri conjugați includ, dar nu se limitează la, alchil C₁-C₁₀ substituit sau nesubstituit, alchenil C₂-C₁₀ substituit sau nesubstituit sau alchinil C₂-C₁₀ substituit sau nesubstituit, în care o listă nelimitativă de grupări substituente preferate include hidroxil, amino, alcoxi, carboxi, benzii, fenil, nitro, tiol, tioalcoxi, halogen, alchil, aril, alchenil și alchinil.

În anumite variante de realizare, linkerii conjugați cuprind 1-10 nucleozide de legare. În anumite variante de realizare, linkerii conjugați cuprind 2-5 nucleozide de legare. În anumite variante de realizare, linkerii conjugați cuprind exact 3 nucleozide de legare. În anumite variante de realizare, linkerii conjugați cuprind motivul TCA. În anumite variante de realizare, astfel de nucleozide de legare sunt nucleozide modificate. În anumite variante de realizare, astfel de nucleozide de legare cuprind o fracțiune de zahăr modificat. În anumite variante de realizare, nucleozidele de legare sunt nemodificate. În anumite variante de realizare, nucleozidele de legare cuprind o bază heterociclică opțional protejată selectată dintre o purină, purină substituită, pirimidină sau pirimidină substituită. În anumite variante de realizare, o fracțiune clivabilă este o nucleozidă selectată dintre uracil, timină, citozină, 4-N-benzoilcitozină, 5-metilcitozină, 4-N-benzoil-5-metilcitozină, adenină, 6-N-benzoiladenină, guanină și 2-N-izobutirilguanină. De obicei, este de dorit ca nucleozidele de legare să fie clivate din compusul oligomeric după ce acesta atinge un țesut țintă. În consecință, nucleozidele de legare sunt în mod tipic legate între ele și la partea rămasă din compusul oligomeric prin legături clivabile. În anumite variante de realizare, astfel de legături clivabile sunt legături de fosfodiester.

În prezenta, nucleozidele de legare nu sunt considerate a fi parte a oligonucleotidei. În consecință, în variantele de realizare în care un compus oligomeric cuprinde o oligonucleotidă constând dintr-un număr sau un interval specificat de nucleozide legate și/sau un procent specificat de complementaritate cu un acid nucleic de referință și compusul oligomeric cuprinde, de asemenea, o grupare conjugată care cuprinde un linker conjugat care cuprinde nucleozide de legare, acele nucleozide de legare nu sunt numărate în funcție de lungimea oligonucleotidei și nu sunt utilizate la determinarea procentului de complementaritate a oligonucleotidei cu acidul nucleic de referință. De exemplu, un compus oligomeric poate cuprinde (1) o oligonucleotidă modificată constând din 8-30 nucleozide și (2) o grupare conjugată cuprinzând 1-10 nucleozide de legare care sunt contigue cu nucleozidele oligonucleotidei modificate. Numărul total de nucleozide legate contigue într-un astfel de compus oligomeric este mai mare de 30. Alternativ, un compus oligomeric poate cuprinde o oligonucleotidă modificată constând din 8-30 nucleozide și nicio grupare conjugată. Numărul total de nucleozide legate contigue într-un astfel de compus oligomeric nu este mai mare de 30. Dacă nu se indică altfel, linkerii conjugați cuprind nu mai mult de 10 nucleozide de legare. În anumite variante de realizare, linkerii conjugați cuprind nu mai mult de 5 nucleozide de legare. În anumite variante de realizare, linkerii

conjugăți cuprind nu mai mult de 3 nucleozide de legare. În anumite variante de realizare, linkerii conjugăți cuprind nu mai mult de 2 nucleozide de legare. În anumite variante de realizare, linkerii conjugăți cuprind nu mai mult de 1 nucleozidă de legare.

În anumite variante de realizare, este de dorit ca o grupare conjugată să fie clivată din oligonucleotidă. De exemplu, în anumite circumstanțe, compușii oligomerici cuprinzând o anumită fracțiune conjugată sunt captați mai bine de un anumit tip de celulă, dar odată ce compusul oligomeric a fost captat, este de dorit ca gruparea conjugată să fie clivată pentru a elibera oligonucleotida neconjugată sau părinte. Astfel, anumiți linkerii conjugăți pot cuprinde una sau mai multe fracțiuni clivabile. În anumite variante de realizare, o fracțiune clivabilă este o legătură clivabilă. În anumite variante de realizare, o fracțiune clivabilă este o grupare de atomi care cuprinde cel puțin o legătură clivabilă. În anumite variante de realizare, o fracțiune clivabilă cuprinde o grupare de atomi având una, două, trei, patru sau mai mult de patru legături clivabile. În anumite variante de realizare, o fracțiune clivabilă este clivată selectiv în interiorul unei celule sau unui compartiment subcelular, cum ar fi un lizozom. În anumite variante de realizare, o fracțiune clivabilă este clivată selectiv de enzime endogene, cum ar fi nucleaze.

În anumite variante de realizare, o legătură clivabilă este selectată dintre: o amidă, un ester, un eter, unul sau ambii esteri ai unui fosfodiester, un ester fosfat, un carbamat sau o disulfură. În anumite variante de realizare, o legătură clivabilă este unul sau ambii esteri ai unui fosfodiester. În anumite variante de realizare, o fracțiune clivabilă cuprinde un fosfat sau fosfodiester. În anumite variante de realizare, fracțiunea clivabilă este o legătură de fosfat între o oligonucleotidă și o fracțiune conjugată sau o grupare conjugată.

În anumite variante de realizare, o fracțiune clivabilă cuprinde sau constă din una sau mai multe nucleozide de legare. În anumite astfel de variante de realizare, respectivele una sau mai multe nucleozide de legare sunt legate între ele și/sau la partea rămasă din compusul oligomeric prin legături clivabile. În anumite variante de realizare, astfel de legături clivabile sunt legături de fosfodiester nemodificate. În anumite variante de realizare, o porțiune clivabilă este 2'-deoxi nucleozidă care este atașată fie la nucleozida 3', fie la cea 5'-terminală a unei oligonucleotide printr-o legătură internucleozidică de fosfat și atașată covalent la porțiunea rămasă din linkerului conjugat sau a fracțiunii conjugate printr-o legătură de fosfat sau fosforotioat. În anumite astfel de variante de realizare, fracțiunea clivabilă este 2'-deoxiadenozină.

B. Anumite grupări terminale

În anumite variante de realizare, compușii oligomerici cuprind una sau mai multe grupări terminale. În anumite astfel de variante de realizare, compușii oligomerici cuprind un 5'-fosfat stabilizat. 5'-fosfații stabiliizați includ, dar nu se limitează la 5'-fosfanați, incluzând, dar fără a se limita la 5'-vinilfosfonați. În anumite variante de realizare, grupările terminale cuprind una sau mai multe nucleozide abazice și/sau nucleozide inversate. În anumite variante de realizare, grupările terminale cuprind una sau mai multe nucleozide legate în 2'. În anumite astfel de variante de realizare, nucleozida legată în 2' este o nucleozidă abazică.

III. Duplexuri oligomerice

În anumite variante de realizare, compușii oligomerici descriși în prezenta cuprind o oligonucleotidă, având o secvență de nucleobaze complementară cu cea a unui acid nucleic țintă. În anumite variante de realizare, un compus oligomeric este împerecheat cu un al doilea compus oligomeric pentru a forma un duplex oligomeric. Astfel de duplexuri oligomerice cuprind un prim compus oligomeric având o regiune complementară unui acid nucleic țintă și un al doilea compus oligomeric având o regiune complementară primului compus oligomeric. În anumite variante de realizare, primul compus oligomeric al unui duplex oligomeric cuprinde sau constă din (1) o oligonucleotidă modificată sau nemodificată și opțional o grupare conjugată și (2) o a doua oligonucleotidă modificată sau nemodificată și opțional o grupare conjugată. Oricare sau ambii compuși oligomeri ai unui duplex oligomeric pot cuprinde o grupare conjugată. Oligonucleotidele fiecărui compus oligomeric al unui duplex oligomeric pot include nucleozide necomplementare proeminente.

IV. Activitate antisens

În anumite variante de realizare, compușii oligomerici și duplexurile oligomerice sunt capabile să se hibridizeze la un acid nucleic țintă, rezultând cel puțin o activitate antisens; astfel de compuși oligomerici și duplexuri oligomerice sunt compuși antisens. În anumite variante de realizare, compușii antisens au activitate antisens atunci când reduc sau inhibă cantitatea sau activitatea unui acid nucleic țintă cu 25% sau mai mult în testul celular standard. În anumite variante de realizare, compușii antisens afectează selectiv unul sau mai mulți acizi nucleici țintă. Astfel de compuși antisens cuprind o secvență de nucleobaze care se hibridizează la unul sau mai mulți acizi nucleici țintă, rezultând una sau mai multe activități antisens dorite și nu se hibridizează la unul sau mai mulți acizi nucleici ne-țintă sau nu se

hibridizează la unul sau mai mulți nucleici ne-țintă în așa fel încât să rezulte o activitate antisens semnificativă nedorită.

În anumite activități antisens, hibridizarea unui compus antisens la un acid nucleic țintă are ca rezultat recrutarea unei proteine care clivează acidul nucleic țintă. De exemplu, anumiți compuși antisens au ca rezultat clivarea mediată de RNaza H a acidului nucleic țintă. RNaza H este o endonuclează celulară care clivează catena de ARN a unui duplex ARN:ADN. ADN-ul dintr-un astfel de duplex ARN:ADN nu trebuie să fie ADN nemodificat. În anumite variante de realizare, sunt descriși în prezenta compuși antisens care sunt suficient de „asemănători ADN-ului” pentru a provoca activitatea RNazei H. În anumite variante de realizare, sunt tolerate una sau mai multe nucleozide care nu sunt asemănătoare ADN-ului în gapul unui gapmer.

În anumite activități antisens, un compus antisens sau o porțiune dintr-un compus antisens este încărcat într-un complex de matisare indus de ARN (RISC), ducând în final la clivarea acidului nucleic țintă. De exemplu, anumiți compuși antisens au ca rezultat clivarea acidului nucleic țintă de către Argonaute. Compușii antisens care sunt încărcati în RISC sunt compuși ARNi. Compușii ARNi pot fi dublu catenari (siARN) sau monocatenari (ssRNA).

În anumite variante de realizare, hibridizarea unui compus antisens la un acid nucleic țintă nu are ca rezultat recrutarea unei proteine care clivează acel acid nucleic țintă. În anumite variante de realizare, hibridizarea compusului antisens la acidul nucleic țintă are ca rezultat alterarea matisării acidului nucleic țintă. În anumite variante de realizare, hibridizarea unui compus antisens la un acid nucleic țintă are ca rezultat inhibarea unei interacțiuni de legare între acidul nucleic țintă și o proteină sau un alt acid nucleic. În anumite variante de realizare, hibridizarea unui compus antisens la un acid nucleic țintă are ca rezultat alterarea translației acidului nucleic țintă.

Activitățile antisens pot fi observate direct sau indirect. În anumite variante de realizare, observarea sau detectarea unei activități antisens implică observarea sau detectarea unei modificări a unei cantități dintr-un acid nucleic țintă sau dintr-o proteină codificată de un astfel de acid nucleic țintă, o modificare a raportului dintre variantele de matisare ale unui acid nucleic sau ale unei proteine, și/sau o modificare fenotipică într-o celulă sau un animal.

V. Anumiți acizi nucleici țintă

În anumite variante de realizare, compușii oligomerici cuprind sau constau dintr-o oligonucleotidă care cuprinde o regiune care este complementară unui acid nucleic țintă. În anumite variante de realizare, acidul nucleic țintă este o moleculă de ARN endogenă. În anumite variante de realizare, acidul nucleic țintă codifică o proteină. În anumite astfel de variante de realizare, acidul nucleic țintă este selectat dintre: un ARNm matur și un pre-ARNm, incluzând regiuni intronice, exonice și netranslate. În anumite variante de realizare, ARN-ul țintă este un ARNm matur. În anumite variante de realizare, acidul nucleic țintă este un pre-ARNm. În anumite astfel de variante de realizare, regiunea țintă se află în întregime într-un intron. În anumite variante de realizare, regiunea țintă se întinde peste o joncțiune intron/exon. În anumite variante de realizare, regiunea țintă este de cel puțin 50% într-un intron.

A. Complementaritate/nepotriviri cu acidul nucleic țintă

Este posibil să se introducă baze de nepotrivire fără a elimina din activitate. De exemplu, Gautschi și colab (J. Natl. Cancer Inst. 93:463-471, martie 2001) au demonstrat capacitatea unei oligonucleotide care are 100% complementaritate cu ARNm-ul de bcl-2 și care are 3 nepotriviri la ARNm-ul de bcl-xL pentru a reduce expresia atât a bcl-2 cât și a bcl-xL in vitro și in vivo. În plus, această oligonucleotidă a demonstrat o activitate antitumorală puternică in vivo. Maher și Dolnick (Nuc. Acid. Res. 16:3341-3358, 1988) au testat o serie de oligonucleotide cu 14 nucleobaze în tandem cu oligonucleotide de 28 și 42 nucleobaze compuse din secvența de două sau, respectiv, trei dintre oligonucleotidele în tandem, în ceea ce privește abilitatea lor de a stopa translația DHFR uman într-o analiză de reticulocite de iepure. Fiecare dintre cele trei oligonucleotide de 14 nucleobaze a fost capabilă să inhibe translația, deși la un nivel mai modest decât oligonucleotidele de 28 sau 42 de nucleobaze.

În anumite variante de realizare, compușii oligomerici cuprind oligonucleotide care sunt complementare cu acidul nucleic țintă pe întreaga lungime a oligonucleotidei. În anumite variante de realizare, oligonucleotidele sunt 99%, 95%, 90%, 85% sau 80% complementare cu acidul nucleic țintă. În anumite variante de realizare, oligonucleotidele sunt complementare în proporție de cel puțin 80% cu acidul nucleic țintă pe toată lungimea oligonucleotidei și cuprind o regiune care este 100% sau complet complementară cu un acid nucleic țintă. În anumite variante de realizare, regiunea de complementaritate completă este de la 6 la 20, 10 la 18 sau 18 la 20 de nucleobaze în lungime.

În anumite variante de realizare, oligonucleotidele cuprind una sau mai multe nucleobaze nepotrivite în raport cu acidul nucleic țintă. În anumite variante de realizare, activitatea antisens față de țintă este redusă printr-o astfel de nepotrivire, dar activitatea față de o non-țintă este redusă cu o cantitate mai mare. Astfel, în anumite variante de realizare, este îmbunătățită selectivitatea compusului oligomeric

care cuprinde o oligonucleotidă. În anumite variante de realizare, nepotrivirea este poziționată în mod specific într-o oligonucleotidă având un motiv de gapmer. În anumite variante de realizare, nepotrivirea este în poziția 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 sau 8 de la capătul 5' al regiunii de gap. În anumite variante de realizare, nepotrivirea este în poziția 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 de la capătul 3' al regiunii de gap. În anumite variante de realizare, nepotrivirea este în poziția 1, 2, 3, sau 4 de la capătul 5' al regiunii de aripă. În anumite variante de realizare, nepotrivirea este în poziția 4, 3, 2, sau 1 de la capătul 3' al regiunii de aripă.

B. Tau

Compușii oligomerici conform invenției cuprind sau constau dintr-o oligonucleotidă care cuprinde o regiune care este complementară unui acid nucleic țintă, în care acidul nucleic țintă este Tau. În anumite variante de realizare, acidul nucleic Tau are secvența prezentată în SECV ID NR: 1 (Nr. de acces GENBANK NT_010783.14 trunchiat de la nucleotidele 2624000 la 2761000).

În anumite variante de realizare, punerea în contact a unei celule cu un compus oligomeric complementar cu SECV ID NR: 1 reduce cantitatea de ARNm Tau, iar în anumite variante de realizare reduce cantitatea de proteină Tau. În anumite variante de realizare, punerea în contact a unei celule de la un animal cu un compus oligomeric complementar cu SECV ID NR: 1 ameliorează unul sau mai multe simptome ale unei boli neurodegenerative. În anumite variante de realizare, simptomul este pierderea de memorie, pierderea funcției motorii, sau creșterea numărului și/sau volumului de incluziuni neurofibrilare. În anumite variante de realizare, punerea în contact a unei celule de la un animal cu o oligonucleotidă complementară cu SECV ID NR: 1 are ca rezultat menținerea sau îmbunătățirea memoriei, menținerea sau îmbunătățirea funcției motorii și/sau menținerea sau reducerea numărului și/sau volumului de incluziuni neurofibrilare.

C. Anumiți acizi nucleici țintă în anumite țesuturi

În anumite variante de realizare, compușii oligomerici cuprind sau constau dintr-o oligonucleotidă care cuprinde o regiune care este complementară unui acid nucleic țintă, în care acidul nucleic țintă este exprimat în sistemul nervos central (SNC).

VI. Anumite compoziții farmaceutice

În anumite variante de realizare, sunt descrise în prezenta compoziții farmaceutice care cuprind unul sau mai mulți compuși oligomerici sau o sare a acestora. În anumite variante de realizare, compoziția farmaceutică cuprinde un diluant sau purtător acceptabil farmaceutic. În anumite variante de realizare, o compoziție farmaceutică cuprinde o soluție salină sterilă și unul sau mai mulți compuși oligomerici. În anumite variante de realizare, o compoziție farmaceutică constă din o soluție salină sterilă și unul sau mai mulți compuși oligomerici. În anumite variante de realizare, soluția salină sterilă este soluție salină de calitate farmaceutică. În anumite variante de realizare, o compoziție farmaceutică cuprinde unul sau mai mulți compuși oligomerici și apă sterilă. În anumite variante de realizare, o compoziție farmaceutică constă din unul sau mai mulți compuși oligomerici și apă sterilă. În anumite variante de realizare, apa sterilă este apă de calitate farmaceutică. În anumite variante de realizare, o compoziție farmaceutică cuprinde unul sau mai mulți compuși oligomerici și soluție salină tamponată cu fosfat (PBS). În anumite variante de realizare, o compoziție farmaceutică constă din unul sau mai mulți compuși oligomerici și PBS sterilă. În anumite variante de realizare, PBS sterilă este PBS de calitate farmaceutică.

În anumite variante de realizare, compozițiile farmaceutice cuprind unul sau mai mulți compuși oligomerici și unul sau mai mulți excipienți. În anumite variante de realizare, excipienții sunt selectați dintre apă, soluții sărate, alcool, polietilen glicoli, gelatină, lactoză, amilază, stearat de magneziu, talc, acid silicic, parafină vâscoasă, hidroximetilceluloză și polivinilpirolidonă.

În anumite variante de realizare, oligonucleotidele pot fi amestecate cu substanțe active sau inerte acceptabile farmaceutic pentru prepararea de compoziții sau formulări farmaceutice. Compozițiile și procedeele pentru formularea de compoziții farmaceutice depind de o serie de criterii, inclusiv, dar fără a se limita la, calea de administrare, întinderea bolii sau doza de administrat.

În anumite variante de realizare, compozițiile farmaceutice care cuprind un compus oligomeric cuprind orice săruri acceptabile farmaceutic ale compusului oligomeric, esteri ai compusului oligomeric sau săruri ale unor astfel de esteri. În anumite variante de realizare, compozițiile farmaceutice care cuprind compuși oligomerici cuprind una sau mai multe oligonucleotide care, după administrarea la un animal, inclusiv un om, sunt capabile să furnizeze (direct sau indirect) metabolitul activ biologic sau un rest al acestuia. În consecință, de exemplu, dezvăluirea este de asemenea îndreptată către săruri acceptabile farmaceutic ale compuşilor oligomerici, promedicamente, săruri acceptabile farmaceutic ale unor astfel de promedicamente și alte bioechivalente. Sărurile acceptabile farmaceutic adecvate includ, dar nu se limitează la, săruri de sodiu și potasiu. În anumite variante de realizare, promedicamentele cuprind una sau mai multe grupări conjugate atașate la o oligonucleotidă, în care gruparea conjugată este clivată de nucleazele endogene din corp.

Fracțiunile lipidice au fost utilizate în terapiile cu acid nucleic într-o varietate de metode. În anumite astfel de metode, acidul nucleic, cum ar fi un compus oligomeric, este introdus în lipozomi preformați sau lipoplexe formate din amestecuri de lipide cationice și lipide neutre. În anumite metode, se formează complexe de ADN cu lipide mono- sau policationice fără prezența unei lipide neutre. În anumite variante de realizare, o fracțiune lipidică este selectată pentru a crește distribuția unui agent farmaceutic la o anumită celulă sau țesut. În anumite variante de realizare, o fracțiune lipidică este selectată pentru a crește distribuția unui agent farmaceutic la țesutul gras. În anumite variante de realizare, o fracțiune lipidică este selectată pentru a crește distribuția unui agent farmaceutic la țesutul muscular.

În anumite variante de realizare, compozițiile farmaceutice cuprind un sistem de livrare. Exemplele de sisteme de livrare includ, dar nu se limitează la, lipozomi și emulsii. Anumite sisteme de livrare sunt utile pentru prepararea anumitor compoziții farmaceutice, inclusiv cele care cuprind compuși hidrofobi. În anumite variante de realizare, sunt utilizați anumiți solvenți organici, cum ar fi dimetilsulfoxid.

În anumite variante de realizare, compozițiile farmaceutice cuprind una sau mai multe molecule de eliberare specifice țesutului concepute pentru a furniza respectivii unul sau mai mulți agenți farmaceutici conform prezentei invenții la țesuturi sau tipuri de celule specifice. De exemplu, în anumite variante de realizare, compozițiile farmaceutice includ lipozomi acoperiți cu un anticorp specific țesutului.

În anumite variante de realizare, compozițiile farmaceutice cuprind un sistem de co-solvenți. Anumite astfel de sisteme de co-solvenți cuprind, de exemplu, alcool benzilic, un surfactant nepolar, un polimer organic miscibil cu apa și o fază apoasă. În anumite variante de realizare, astfel de sisteme de co-solvenți sunt utilizate pentru compușii hidrofobi. Un exemplu nelimitativ de astfel de sistem de co-solvenți este sistemul de co-solvenți VPD, care este o soluție de etanol absolut care cuprinde 3% g/v alcool benzilic, 8% g/v surfactant nepolar Polysorbate 80™ și 65% g/v polietilen glicol 300. Proporțiile unor astfel de sisteme de cosolvenți pot fi variate considerabil fără a modifica semnificativ caracteristicile lor de solubilitate și toxicitate. Mai mult, identitatea componentelor co-solvenților poate fi variată: de exemplu, alți agenți activi de suprafață pot fi utilizați în loc de Polysorbate 80™; dimensiunea fracției de polietilen glicol poate fi variată; alți polimeri biocompatibili pot înlocui polietilen glicolul, de exemplu, polivinil pirolidonă; iar alte zaharuri sau polizaharide pot înlocui dextroza.

În anumite variante de realizare, compozițiile farmaceutice sunt preparate pentru administrare orală. În anumite variante de realizare, compozițiile farmaceutice sunt preparate pentru administrare bucală. În anumite variante de realizare, o compoziție farmaceutică este preparată pentru administrare prin injecție (de exemplu, intravenoasă, subcutanată, intramusculară, intratecală, intracerebroventriculară, etc.). În anumite dintre astfel de variante de realizare, o compoziție farmaceutică cuprinde un purtător și este formulată în soluție apoasă, cum ar fi apă sau soluții tampon compatibile fiziologic, cum ar fi soluție Hanks, soluție Ringer sau tampon salin fiziologic. În anumite variante de realizare, sunt incluse alte ingrediente (de exemplu, ingrediente care ajută la solubilitate sau servesc drept conservanți). În anumite variante de realizare, suspensiile injectabile sunt preparate folosind purtători lichizi adecvați, agenți de suspendare și altele asemenea. Anumite compoziții farmaceutice pentru injectare sunt prezentate în formă de dozare unitară, de exemplu, în fiole sau în recipiente cu doze multiple. Anumite compoziții farmaceutice pentru injectare sunt suspensii, soluții sau emulsii în vehicule uleioase sau apoase și pot conține agenți de formulare cum ar fi agenți de suspendare, stabilizare și/sau dispersare. Anumiți solvenți adecvați pentru utilizare în compozițiile farmaceutice pentru injectare includ, dar nu se limitează la, solvenți lipofili și uleiuri grase, cum ar fi ulei de susan, esteri sintetici ai acizilor grași, cum ar fi oleat de etil sau trigliceride și lipozomi. Suspensiile injectabile apoase pot conține.

VII. Anumiți compusi

În anumite variante de realizare, Compusul Nr. 814907 este caracterizat ca un gapmer MOE 5-8-5, având o secvență de (de la 5' la 3') CCGTTTTCTTACCACCCT (SECV ID NR: 8), în care fiecare dintre nucleozidele 1-5 și 14 -18 sunt nucleozide 2'-MOE și fiecare dintre nucleozidele 6-13 sunt 2'-deoxinucleozide, în care legăturile internucleozidice dintre nucleozida 2 și nucleozida 3 și nucleozida 15 la nucleozida 16 sunt legăturile internucleozidice de fosfodiester și legăturile internucleozidice rămase sunt legături internucleozidice de fosforotioat, și în care fiecare citozină este o 5-metilcitozină.

În anumite variante de realizare, compusul nr. 814907 este caracterizat prin următoarea notație chimică: mCes mCeo Ges Tes Tes Tds Tds mCds Tds Tds Ads mCds mCds Aes mCeo mCes mCes Te;

în care,

A = o adenină,

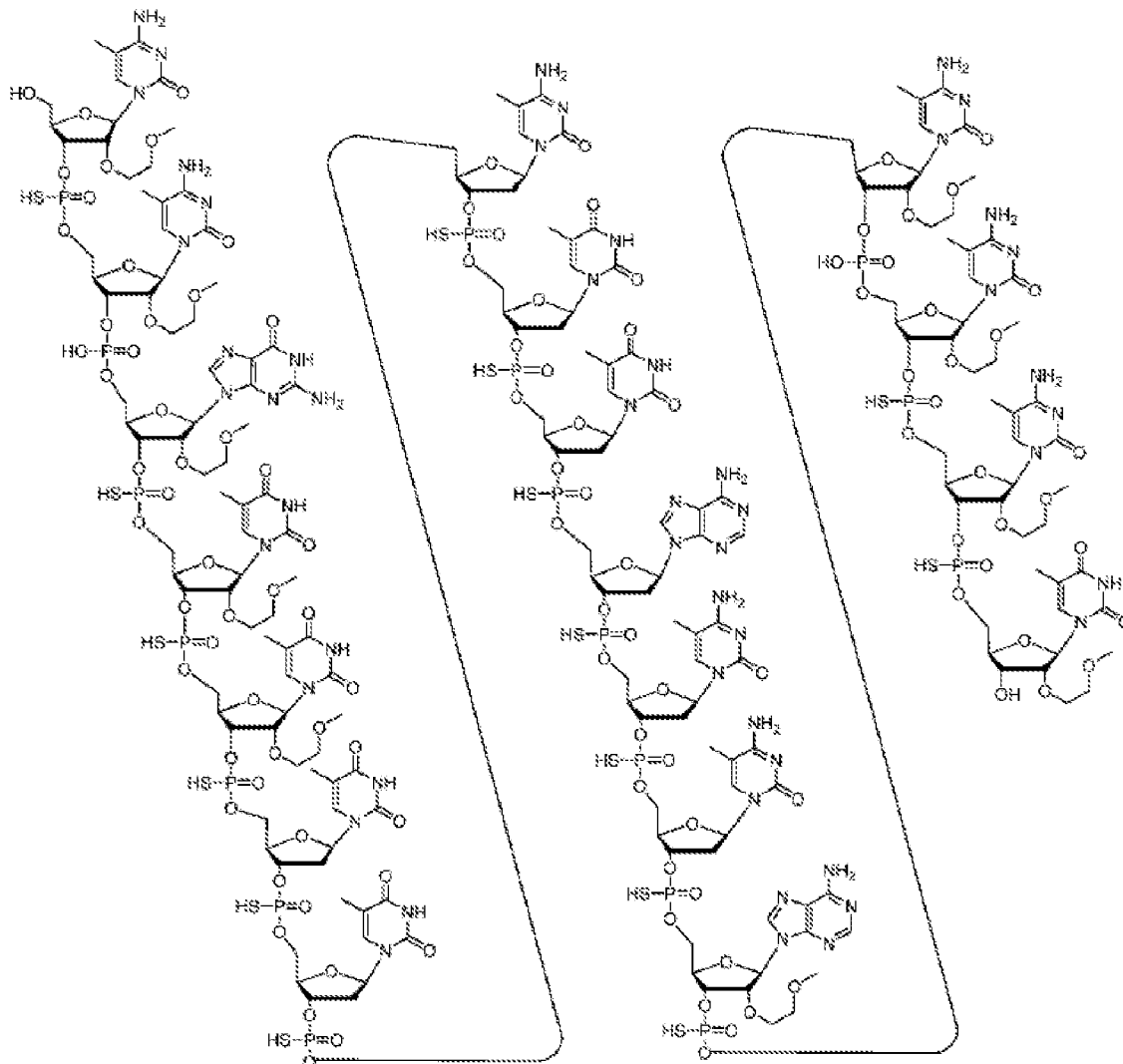
mC = o 5-metilcitozină,

G = o guanină,

T = o timină,

e = o nucleozidă 2'-MOE,
d = o 2'-deoxinucleozidă,
s = o legătură internucleozidică de fosforitoat, și
o = o legătură internucleozidică de fosfodiester.

- 5 În anumite variante de realizare, compusul nr. 814907 este caracterizat prin următoarea structură chimică:



(SECV ID NR: 8)

Structura 1. Compus nr. 814907

VIII. Anumite repere

- 10 În anumite variante de realizare, compusul nr. 623782 (caracterizat mai jos în Exemplul 1), descris pentru prima dată în WO 2015/010135, este un reper. Compusul nr. 623782 a fost un reprezentant de top între compușii descriși în WO 2015/010135 în ceea ce privește potența, eficacitatea și tolerabilitatea. Compusul nr. 623782 este furnizat ca reper pentru a demonstra eficacitatea și tolerabilitatea superioară a Compusului nr. 814907 (caracterizat mai jos în Exemplul 1) în comparație cu
- 15 Compusul nr. 623782 în studiile comparative descrise mai jos în Exemplul 1 și Exemplul 2.

Astfel cum s-a demonstrat în Exemplul 1, Compusul nr. 814907 a obținut o ED₅₀ de 25 μg la șoareci transgenici Tau tratați cu 30 μg, 100 μg, 500 μg, în timp ce Compusul nr. 623782 a obținut un ED₅₀ de 94 μg la șoareci transgenici Tau tratați cu 10 μg, 30 μg, 100 μg, 300 μg, 700 μg. Astfel, Compusul nr. 814907 este mai eficient decât Compusul nr. 623782.

- 20 După cum s-a demonstrat în Exemplul 2, administrarea Compusului nr. 814907 la șoareci de tip sălbatic nu a dus la pierderea de celule Purkinje, în timp ce administrarea Compusului nr. 623782 a dus la

pierderea de celule Purkinje în secțiuni ale cerebelului colorate cu calbindină la 3 din 11 animale. Prin urmare, Compusul nr. 814907 este mai tolerabil decât Compusul nr. 623782.

Dezvăluire

În timp ce anumiți compuși, compoziții și metode descrise în prezenta invenție au fost descrise cu specificitate în conformitate cu anumite variante de realizare, următoarele exemple servesc numai pentru a ilustra compușii descriși în prezenta invenție și nu sunt destinate să îi limiteze.

Deși lista de secvențe care însoțește această cerere de înregistrare identifică fiecare secvență ca „ARN” sau „ADN”, după cum este necesar, în realitate, acele secvențe pot fi modificate cu orice combinație de modificări chimice. O persoană de specialitate în domeniu va aprecia cu ușurință că o astfel de desemnare ca „ARN” sau „ADN” pentru a descrie oligonucleotidele modificate este, în anumite cazuri, arbitrară. De exemplu, o oligonucleotidă cuprinzând o nucleozidă care cuprinde o fracțiune de zahar 2'-OH și o bază de timină ar putea fi descrisă ca un ADN având un zahar modificat (2'-OH în locul unui 2'-H de ADN) sau ca un ARN având o bază modificată (timină (uracil metilat) în locul unui uracil de ARN). În consecință, secvențele de acizi nucleici descrise în prezenta, inclusiv, dar fără a se limita la cele din lista de secvențe, sunt destinate să cuprindă acizi nucleici care conțin orice combinație de ARN și/sau ADN natural sau modificat, incluzând, dar fără a se limita la astfel de acizi nucleici care au nucleobaze modificate. Cu titlu de exemplu suplimentar și fără limitare, un compus oligomeric având secvența de nucleobaze „ATCGATCG” cuprinde orice compuși oligomeri care au o astfel de secvență de nucleobaze, indiferent dacă sunt modificați sau nemodificați, incluzând, dar fără a se limita la, astfel de compuși care cuprind baze de ARN, cum ar fi cei care au secvența „AUCGAUCG” și cei care au unele baze de ADN și unele baze de ARN, cum ar fi „AUCGATCG” și compuși oligomerici care au alte nucleobaze modificate, cum ar fi „AT^mCGAUCG”, în care ^mC indică o bază citozină care cuprinde o grupare metil în poziția 5.

Anumiți compuși descriși în prezenta (de exemplu, oligonucleotide modificate) au unul sau mai mulți centri asimetrici și astfel dau naștere la enantiomeri, diastereomeri și alte configurații stereoizomerice care pot fi definite, în termeni de stereochimie absolută, ca (*R*) sau (*S*), ca α sau β , cum ar fi pentru anomeri de zahar, sau ca (*D*) sau (*L*), cum ar fi pentru aminoacizi, etc. Compușii descriși în prezenta care sunt ilustrați sau descriși ca având anumite configurații stereoizomerice includ numai compușii indicați. Compușii descriși în prezenta care sunt ilustrați sau descriși cu stereochimie nedefinită includ toți acești izomeri posibili, inclusiv formele lor stereoaleatorii și optic pure, dacă nu se specifică altfel. De asemenea, formele tautomerice ale compușilor din prezenta sunt de asemenea incluse, dacă nu se indică altfel. Dacă nu se indică altfel, compușii oligomerici și oligonucleotidele modificate descrise în prezenta sunt destinate să includă formele de sare corespunzătoare.

Compușii descriși în prezenta includ variații în care unul sau mai mulți atomi sunt înlocuiți cu un izotop neradioactiv sau izotop radioactiv al elementului indicat. De exemplu, compușii din prezenta care cuprind atomi de hidrogen admit toate substituțiile posibile de deuteriu pentru fiecare dintre atomii de hidrogen ¹H. Substituțiile izotopice admise de compușii din prezenta includ, dar nu se limitează la: ²H sau ³H în loc de ¹H, ¹³C sau ¹⁴C în loc de ¹²C, ¹⁵N în loc de ¹⁴N, ¹⁷O sau ¹⁸O în loc de ¹⁶O, și ³³S, ³⁴S, ³⁵S sau ³⁶S în loc de ³²S. În anumite variante de realizare, substituțiile izotopice neradioactive pot conferi noi proprietăți compusului oligomeric care sunt benefice pentru utilizare ca agent terapeutic sau instrument de cercetare. În anumite variante de realizare, substituțiile izotopice radioactive pot face compusul adecvat pentru scopuri de cercetare sau diagnostic, cum ar fi imagistică.

EXEMPLE

Următoarele exemple ilustrează anumite variante de realizare ale prezentei dezvăluiri și nu sunt limitative. Mai mult, acolo unde sunt furnizate variante de realizare specifice, inventatorii au avut în vedere aplicarea generică a acelor variante de realizare specifice. De exemplu, dezvăluirea unei oligonucleotide având un anumit motiv furnizează un suport rezonabil pentru oligonucleotide suplimentare care au același motiv sau similar. Și, de exemplu, acolo unde o modificare particulară de afinitate mare apare într-o anumită poziție, alte modificări de afinitate mare în aceeași poziție sunt considerate adecvate, dacă nu se indică altfel.

Exemplul 1: Efectele oligonucleotidelor modificate asupra ARNm de Tau umană la șoareci transgenici

Oligonucleotidele modificate prezentate în tabelul de mai jos sunt 100% complementare cu pre-ARNm de Tau umană (Nr. de acces GENBANK NT_010783.14, trunchiat de la nucleotidele 2624000 la 2761000, denumit în prezenta SECV ID NR: 1). Eficacitatea oligonucleotidelor modificate a fost testată pe șoareci transgenici cu Tau umană (Duff și colab., *Neurobiology of Disease* 7:87-98, 2000). Fiecare șoarece a primit o doză dintr-o oligonucleotidă modificată enumerată în tabelul de mai jos, sau numai vehicul PBS, prin injecție în bolus ICV. Fiecare grup de tratament a constat din 2 până la 4 șoareci. La câteva zile după administrarea oligonucleotidelor, șoarecii au fost sacrificați și au fost prelevate țesuturi. A fost extras ARN din cortex și analizat prin RT-qPCR pentru a determina nivelurile de ARNm de Tau

umană. A fost utilizat setul de probe de primer RTS3104, cu următoarele secvențe: primer înainte 5'-AAGATTGGGTCCCTGGACAAT-3', desemnat în prezenta ca SECV ID NR: 5; primer invers 5'-AGCTTGTGGGTTTCAATCTTTTATT-3', desemnat în prezenta ca SECV ID NR: 6; probă 5'-CACCCACGTCCCTGGCGGA-3', desemnată în prezenta ca SECV ID NR: 7. Rezultatele sunt prezentate în tabelul de mai jos ca procentul mediu de inhibare a expresiei ARNm de Tau umană pentru fiecare grup de tratament comparativ cu grupul tratat cu vehicul. Jumătate din doza efectivă maximă (ED₅₀) pentru fiecare oligonucleotidă modificată a fost calculată utilizând analiza de regresie neliniară.

Tabelul 1
Procent de reducere a nivelurilor de ARNm de Tau umană la șoareci hTau

Compusul nr.	Secvență	Doză (μg)	ARNm de Tau umană (% inhibiție)	ED ₅₀ (μg)	SECV ID NR.
623782	$m^{C_{es}}m^{C_{eo}}G_{es}T_{es}T_{ds}T_{ds}m^{C_{ds}}T_{ds}T_{ds}A_{ds}m^{C_{ds}}m^{C_{ds}}A_{es}m^{C_{eo}}m^{C_{es}}m^{C_{es}}T_{es}$	10	10	94	8
		30	17		
		100	54		
		300	79		
		700	90		
814907	$m^{C_{es}}m^{C_{eo}}G_{es}T_{es}T_{ds}T_{ds}m^{C_{ds}}T_{ds}T_{ds}A_{ds}m^{C_{ds}}m^{C_{ds}}A_{es}m^{C_{eo}}m^{C_{es}}m^{C_{es}}T_{es}$	30	48	25	8
		100	79		
		500	88		

Indici: "e" reprezintă o nucleozidă 2'-MOE; "d" reprezintă o 2'-deoxinucleozidă; "o" reprezintă o legătură internucleozidică de fosfodiester; iar "s" reprezintă o legătură internucleozidică de fosforotioat. Indicele "m" care precedă un "C" indică faptul că citozina este o 5-metilcitozină.

Exemplul 2: Tolerabilitatea oligonucleotidelor modificate care țintesc Tau umană

Tolerabilitatea oligonucleotidelor modificate descrise în Exemplul 1 a fost testată pe șoareci de tip sălbatic. Fiecare șoarece a primit o injecție de 700 μg de Compus nr. 623782 sau Compus nr. 814907 la o doză de 700 μg sau purtător PBS singur. La opt săptămâni după administrarea oligonucleotidei modificate, șoarecii au fost sacrificați și au fost prelevate țesuturi. Histopatologia a fost efectuată pe secțiuni de creier utilizând colorații H&E, IBA1, GFAP și calbindină și nu a fost observată nicio anomalie în raport cu șoarecii tratați cu vehicul la șoarecii tratați cu Compusul nr. 814907. Într-un experiment comparabil, pierderea de celule Purkinje a fost observată în secțiunile de creier colorate cu calbindină la 3 din 11 animale tratate cu Compusul nr. 623782.

Exemplul 3: Efectul Compusului nr. 814907 la maimuța cinomolgus după injectarea intratecală cu doze repetate timp de 13 săptămâni

Maimuțele Cynomolgus au fost tratate cu Compusul nr. 814907 pentru a determina tolerabilitatea locală și sistemică și farmacocinetica la trei niveluri de doză, după injecții lombare intratecale în bolus repetate timp de 13 săptămâni. Compusul nr. 814907 are o omologie completă de secvență cu ARNm de Tau de maimuță și a demonstrat activitate farmacologică la această specie.

Tratament

Maimuțele Cynomolgus cu vârsta cuprinsă între 2-4 ani au fost tratate cu vehicul martor (n=12) sau Compusul nr. 814907 intratecal (între L3-L4). Animalele au primit doze în Zilele 1, 14, 28, 56 și 84. Grupurile de tratament au primit 4 mg (n=6), 12 mg (n=6) sau 35 mg (n=14) de Compus nr. 814907. Animalele au fost sacrificate în ziua 98 sau 155 (4 animale din grupul martor cu vehicul și 4 animale din grupul de tratament cu 35 mg).

Tolerabilitate

Evaluarea tolerabilității s-a bazat pe observații clinice, greutatea corporală, consumul de hrană, examinări fizice și neurologice, observații neurocomportamentale (testul Irwin modificat (Irwin, 1968)), electrocardiogramă (ECG) și evaluarea tensiunii arteriale, oftalmologie, coagulare, hematologie, chimie clinică (sânge și lichid cefalorahidian [CSF]), numărul de celule (numai CSF), evaluarea gazelor din sânge, analiza urinei și evaluări ale patologiei anatomice. Au fost efectuate necropsii complete cu înregistrarea oricărei anomalii macroscopice. Au fost înregistrate greutatea organelor și au fost efectuate examinări microscopice. S-a recoltat sânge pentru analiza complementară. În plus, au fost prelevate sânge, CSF și țesuturi (la necropsie) pentru evaluări toxicocinetice.

Administrarea intratecală a 4 mg, 12 mg sau 35 mg de Compus nr. 814907 timp de 13 săptămâni (o dată la două săptămâni pentru prima lună, apoi o dată pe lună ulterior) a arătat o bună tolerabilitate locală și sistemică la masculii și femelele de maimuțe cynomolgus la toate regimurile de dozare testate.

Activitate

Țesutul cerebral și al măduvei spinării a fost analizat în ceea ce privește inhibarea ARNm de Tau de maimuță cynomolgus. Au fost prelevate felii de creier și probe din măduva spinării și au fost congelate rapid în azot lichid și depozitate congelate (-60°C până la -90°C). La momentul prelevării, au fost folosite punctii de biopsie de 2 mm pentru a preleva probe pentru analiza ARN din bucățile de creier congelat.

Puncțiile au fost realizate în mai multe regiuni ale măduvei spinării și ale creierului.

ARN-ul total din probele de creier și măduva spinării de la maimuțele cynomolgus tratate cu martor sau Compusul nr. 814907 a fost purificat utilizând un kit de purificare mini-ARN de la Life Technologies și supus analizei PCR în timp real. S-a utilizat un set de probe de primeri de maimuță rhMATPT LTS01278 (secvență înainte AGGACAGAGTGCAGTCGAAGATC, denumită în prezenta invenție ca SECV ID NR: 9; secvență înapoi AGGTCAGCTTGTGGGTTTCAA, denumită în prezenta invenție ca SECV ID NR: 10; secvență de probă CACCCATGTCCCTGGCGGAGG, denumită în prezenta invenție ca SECV ID NR: 11) pentru a măsura nivelurile de ARN. ARN-ul de Tau a fost apoi normalizat la gena de întreținere Ciclofilină A. Toate reacțiile qPCR au fost efectuate în trei exemplare. Datele sunt raportate în raport cu nivelurile de ARNm la animalele tratate cu CSF artificial.

După cum se arată în Tabelul de mai jos, a existat o scădere semnificativă și sensibilă la doză a nivelurilor de ARN de Tau în măduva spinării și în mai multe regiuni ale SNC după tratamentul cu Compusul nr. 814907, în comparație cu maimuțele tratate cu martor.

Tabelul 2

Inhibarea procentuală a nivelurilor ARNm de Tau de cynomolgus la maimuțele cynomolgus

Tratament	Regiunile creierului						
	Toracic Spinal Măduvă	Lombar Spinal Măduvă	Cortical Spinal Măduvă	Frontal Cortex	Temporal Cortex	Hipocamp	Pons
aCSF	0	0	0	0	0	0	0
4 mg 814907	51	63	31	41	29	18	29
12 mg 814907	60	60	47	60	56	52	43
35 mg 814907	58	71	60	77	70	74	66

Exemplul 4: Studiu clinic uman de fază I-IIa cu Compusul nr. 814907

Doze crescătoare multiple de Compus nr. 814907 sunt evaluate într-un studiu randomizat, dublu-orb, controlat cu placebo pentru a evalua siguranța, tolerabilitatea, farmacocinetica și farmacodinamica la pacienții cu boala Alzheimer (AD) ușoară cu vârstă cuprinsă între 50-74 de ani. Pacienții eligibili vor prezenta dovezi ale biomarkerului de AD în CSF de patologie amiloidă și tau, în plus față de îndeplinirea criteriilor clinice pentru AD. Patru cohorte cu nivel crescător al dozei de pacienți cu AD ușoară vor fi înrolate secvențial și randomizate 3:1 pentru a primi Compusul nr. 814907 sau placebo. Fiecare pacient va primi 4 doze de Compus nr. 814907 sau placebo cu un interval de 28 de zile între doze. Pacienții vor primi 4 doze intratecale (IT) în bolus de Compus nr. 814907 la intervale de 4 săptămâni în timpul perioadei de tratament de 3 luni (în Zilele 1, 29, 57, 85). Fiecare doză de Compus nr. 814907 sau placebo va fi administrată ca o singură injecție IT de 20 mL în bolus. Administrarea se va face prin puncție lombară folosind un ac de calibru mic introdus în spațiul L3/L4.

Evaluări de siguranță și tolerabilitate

Siguranța pacientului va fi monitorizată atent în timpul studiului. Evaluările de siguranță și tolerabilitate includ: examen fizic și evaluare neurologică standard (inclusiv fundi), semne vitale (HR, TA, modificări ortostatice, greutate), ECG, AE și medicații concomitente, Columbia Suicide Severity Rating Scale (C-SSRS), analize de laborator privind siguranța pentru CSF (număr de celule, proteine, glucoză), teste de laborator ale plasmei (chimie clinică, hematologie), analize de urină și evaluări neuroimagistice vor fi efectuate utilizând un scanner MRI 3T. Măsurile clinice și volumetrice de neuroimagnostică vor fi utilizate pentru a monitoriza deteriorarea nepreconizată.

Evaluări farmacocinetice

O probă de CSF va fi prelevată înainte de doză în fiecare zi de administrare (Zilele 1, 29, 57, 85) și în perioada post-tratament pentru analizele PK.

Evaluări exploratorii

Vor fi evaluați parametrii biochimici, neuroimagistici, de funcționare/capacitate de a efectua activități din viața de zi cu zi, cognitivi și neuropsihiatrici.

Parametrii biochimici includ biomarkeri potențiali pentru CSF și sânge/plasmă, incluzând obiectivele țintă, markeri de leziuni neuronale și sinaptice, markeri de activare a sistemului imunitar înăscut, componente ale complementului și biomarkeri legați de lipide.

5 Parametrii de neuroimagnostică includ MRI structural (volume de hipocamp, creier integral și ventriculare), marcarea spinului arterial (ASL), imagistica tensorului de difuzie (DTI) și FDG-PET (doar Cohortele C și D).

Parametrii de funcționare/capacitate de a desfășura activități ale vieții zilnice includ evaluarea prin Chestionarul funcțional de activități (FAQ).

10 Parametrii cognitivi includ evaluarea prin baterie repetabilă pentru evaluarea stării neuropsihologice (RBANS) și examenul stării mini-mentale (MMSE)

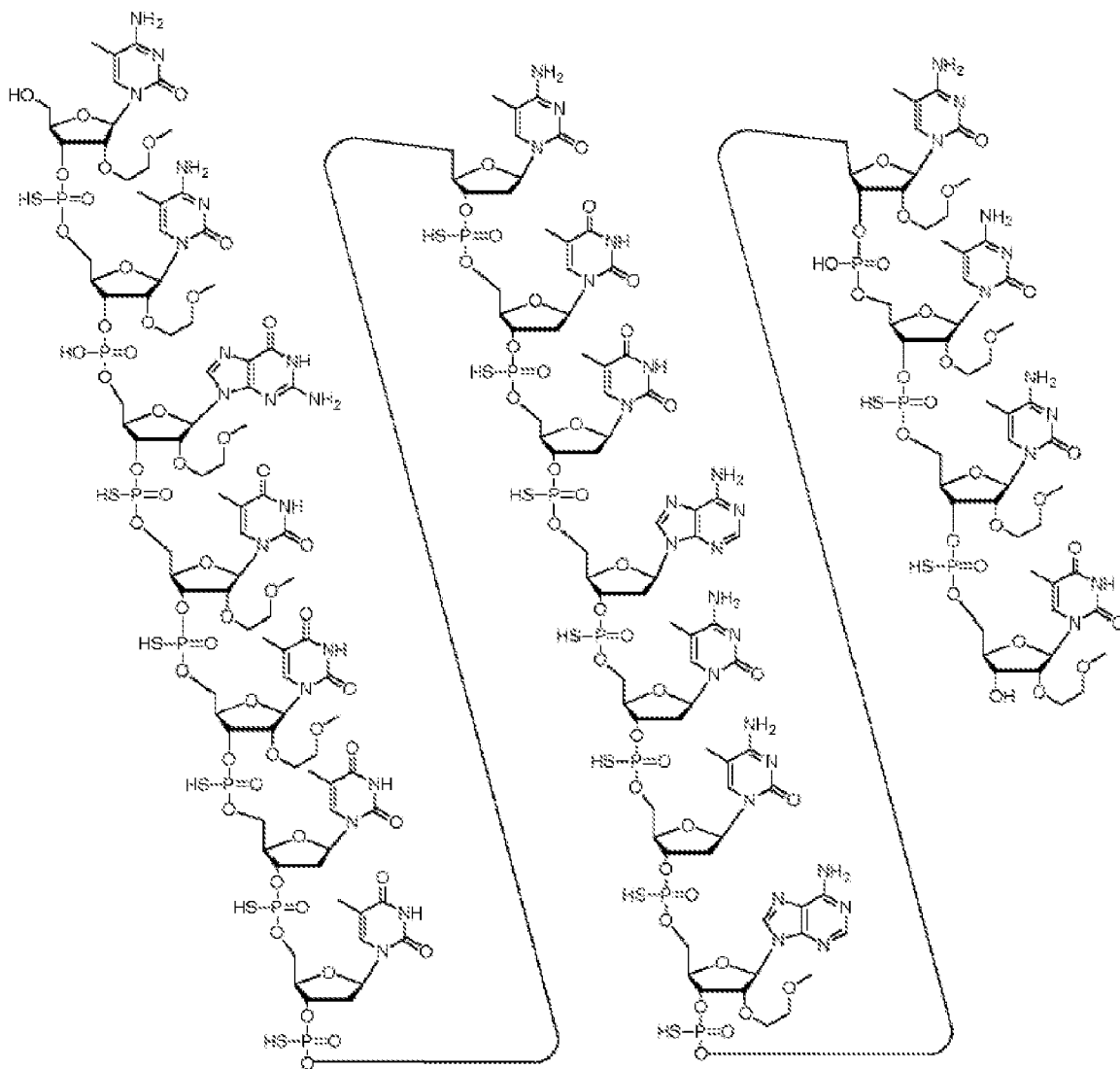
Parametrii neuropsihiatrici includ evaluarea prin Chestionarul de inventar neuropsihiatric (NPI-Q)

(56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:

- WO-A2-2014/012081
- US-A1- 2015 057 329
- US-A1- 2016 145 617
- US-A1- 2016 145 617

(57) Revendicări:

1. Oligonucleotidă modificată conform următoarei formule:



(SECV ID NR: 8)

sau o sare a acesteia.

2. Sare a oligonucleotidei modificate conform revendicării 1, în care sarea include o sare de sodiu și/sau o sare de potasiu.

3. Compus care cuprinde o oligonucleotidă modificată, în care oligonucleotida modificată este un gapmer constând din un segment de aripă 5', un segment de gap central, și un segment de aripă 3', în care:

segmentul de aripă 5' constă din cinci nucleozide 2'-MOE,
segmentul de gap central constă din opt 2'-deoxinucleozide, și
segmentul de aripă 3' constă din cinci nucleozide 2'-MOE;

în care oligonucleotida modificată are secvența de nucleobaze 5' - CCGTTTTCTTACCACCCT-3' (SECV ID NR: 8), în care fiecare citozină este o 5- metilcitozină; și în care legăturile internucleozidice ale polinucleotidei modificate sunt, de la 5' la 3', sosssssssssssoss, în care fiecare s este o legătură de fosforotioat și fiecare o este o legătură de fosfodiester.

4. Oligonucleotidă modificată, în care oligonucleotida modificată este un gapmer constând din un segment de aripă 5', un segment de gap central, și un segment de aripă 3', în care:

segmentul de aripă 5' constă din cinci nucleozide 2'-MOE,
segmentul de gap central constă din opt 2'-deoxinucleozide, și
segmentul de aripă 3' constă din cinci nucleozide 2'-MOE;

în care oligonucleotida modificată are secvența de nucleobaze 5' - CCGTTTTCTTACCACCCT-3' (SECV ID NR: 8), în care fiecare citozină este o 5- metilcitozină; și în care legăturile internucleozidice

ale polinucleotidei modificate sunt, de la 5' la 3', sosssssssssssoss, în care fiecare s este o legătură de fosforotioat and fiecare o este o legătură de fosfodiester.

5. Populație de oligonucleotide modificate sau săruri ale acestora conform oricăreia dintre revendicările 1, 2 sau 4, în care toate legăturile internucleozidice de fosforotioat ale oligonucleotidei modificate sunt stereoaleatorii.

6. Compus conform revendicării 3 sau oligonucleotidă modificată conform revendicării 4, în care oligonucleotida modificată este legată la o grupare conjugată.

7. Duplex oligomeric care cuprinde oligonucleotida modificată sau sarea acesteia conform revendicării 1 sau 2, compusul conform revendicării 3 sau oligonucleotida modificată conform revendicării 4.

8. Compoziție farmaceutică care cuprinde oligonucleotida modificată sau sarea acesteia conform revendicării 1 sau 2, compusul conform revendicării 3 sau oligonucleotida modificată conform revendicării 4 și un diluant sau purtător acceptabil farmaceutic.

9. Compoziție farmaceutică conform revendicării 8, cuprinzând un diluant acceptabil farmaceutic, în care diluantul acceptabil farmaceutic este soluție salină tamponată cu fosfat (PBS) sau CSF artificial (aCSF).

10. Compoziție farmaceutică conform revendicării 9, în care diluantul acceptabil farmaceutic este CSF artificial (aCSF).

11. Oligonucleotidă modificată sau sare a acesteia conform revendicării 1 sau 2, compus conform revendicării 3, oligonucleotidă modificată conform revendicării 4, sau compoziție farmaceutică conform oricăreia dintre revendicările 8-10, pentru utilizare în terapie.

12. Oligonucleotidă modificată sau sare a acesteia conform revendicării 1 sau 2, compus conform revendicării 3, oligonucleotidă modificată conform revendicării 4, sau compoziție farmaceutică conform oricăreia dintre revendicările 8-10, pentru utilizare în tratarea unei boli asociate cu tau.

13. Oligonucleotidă modificată, sare, compus, sau compoziție farmaceutică pentru utilizare conform revendicării 12, în care boala asociată cu tau este o boală neurodegenerativă.

14. Oligonucleotidă modificată, sare, compus, sau compoziție farmaceutică pentru utilizare conform revendicării 13, în care boala asociată cu tau este o tauopatie.

15. Oligonucleotidă modificată, sare, compus, sau compoziție farmaceutică pentru utilizare conform revendicării 13, în care boala neurodegenerativă este boala Alzheimer, demență frontotemporală (FTD), FTDP-17, paralizie supranucleară progresivă (PSP), encefalopatie traumatică cronică (CTE), degenerescență ganglionară corticobazală (CBD), epilepsie sau sindromul Dravet.

16. Oligonucleotidă modificată, sare, compus, sau compoziție farmaceutică pentru utilizare conform revendicării 15, în care boala neurodegenerativă este boala Alzheimer.

17. Oligonucleotidă modificată, sare, compus, sau compoziție farmaceutică pentru utilizare conform revendicării 16, în care boala Alzheimer este boală Alzheimer ușoară.

18. Oligonucleotidă modificată, sare, compus sau compoziție farmaceutică pentru utilizare conform revendicării 15, în care boala neurodegenerativă este demență frontotemporală (FTD).

19. Oligonucleotidă modificată, sare, compus, sau compoziție farmaceutică pentru utilizare conform revendicării 15, în care boala neurodegenerativă este paralizia supranucleară progresivă (PSP).

20. Oligonucleotidă modificată, sare, compus, sau compoziție farmaceutică pentru utilizare conform oricăreia dintre revendicările 11 până la 19, în care oligonucleotida modificată, sarea, compusul sau compoziția farmaceutică este administrată prin administrare intratecală.