



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

**(11) PI 0920263-3 B1**



**(22) Data do Depósito:** 15/10/2009

**(45) Data de Concessão:** 21/09/2021

**(54) Título:** COMPOSTOS COMPREENDENDO UM OLIGONUCLEOTÍDEO MODIFICADO, COMPOSIÇÃO E USO DOS MESMOS

**(51) Int.Cl.:** A61K 31/70.

**(30) Prioridade Unionista:** 15/10/2008 US 61/105,772; 30/04/2009 US 61/174,461.

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

**(72) Inventor(es):** SUSAN M. FREIER; BRETT P. MONIA; HONG ZHANG; CHENGUANG ZHAO; JEFFREY R. CROSBY; ANDREW M. SIWKOWSKI.

**(86) Pedido PCT:** PCT US2009060922 de 15/10/2009

**(87) Publicação PCT:** WO 2010/045509 de 22/04/2010

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 15/04/2011

**(57) Resumo:** COMPOSTO COMPREENDENDO UM OLIGONUCLEOTÍDEO MODIFICADO, USO DO REFERIDO COMPOSTO, E COMPOSIÇÃO. São aqui revelados compostos anti-sentido e métodos para diminuir o fator 11 e tratar ou prevenir complicações tromboembolíticas em um indivíduo que necessita deste. Exemplos de condições de doença que podem ser melhoradas com a administração de compostos anti-sentido que alvejam o fator 11 incluem trombose, embolia e tromboembolia, tais como, trombose venosa profunda, embolia pulmonar, infarto do miocárdio e acidente vascular. Os compostos anti-sentido que alvejam o fator 11 também podem ser usados como um tratamento profilático para prevenir indivíduos em risco para trombose e embolia.

**“COMPOSTOS COMPREENDENDO UM OLIGONUCLEOTÍDEO MODIFICADO, COMPOSIÇÃO E USO DOS MESMOS”**

REFERÊNCIA CRUZADA AOS PEDIDOS RELACIONADOS

[001] Este pedido reivindica a prioridade em 35 U.S.C. § 119(e) para o pedido provisório U.S. 61/105.772, depositado em 15 de outubro de 2008 e para o pedido provisório U.S. 61/174.461, depositado em 30 de abril de 2009. Cada uma das aplicações anteriores são aqui incorporadas pela referência na sua íntegra.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

[002] O presente pedido foi depositado junto com uma listagem de sequência no formato eletrônico. A listagem de sequência é fornecida como um arquivo intitulado 20091015\_BIOL0107WOSEQ.txt, criado em 15 de outubro de 2009, que tem 92 Kb de tamanho. A informação no formato eletrônico da listagem de sequência é aqui incorporada pela referência na sua íntegra.

CAMPO DA INVENÇÃO

[003] As modalidades da presente invenção fornecem métodos, compostos, e composições para reduzir a expressão de fator 11 RNAm e proteína em um animal. Tais métodos, compostos, e composições são usados para tratar, prevenir ou melhorar complicações tromboembolíticas.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[004] O sistema circulatório exige mecanismos que previnem perda sanguínea, bem como aqueles que neutralizam as obstruções intravasculares inapropriadas. Em geral, a coagulação compreende uma cascata de reações que culminam na conversão de fibrinogênio solúvel em um gel de fibrina insolúvel. As etapas da cascata envolvem a conversão de um zimogênio inativo em uma enzima ativada. A enzima ativa então catalisa a próxima etapa na cascata.



### Cascata de coagulação

[005] A cascata de coagulação pode ser iniciada por meio de duas ramificações, a via do fator tecidual (também “via extrínseca”), que é a via principal, e a via de ativação de contato (também “via intrínseca”).

[006] A via do fator tecidual é iniciada pelo fator tecidual do receptor de superfície celular (TF, também referido como fator III), que é expresso constitutivamente por células extravasculares (pericitos, cardiomiócitos, células de músculo liso e queratinócitos) e expresso por monócitos vasculares e células endoteliais mediante indução por citocinas inflamatórias ou endotoxina. (Drake *et al.*, *Am J Pathol* 1989, 134:1087-1097). O TF é o receptor celular de alta afinidade para o fator de coagulação VIIa, uma serina protease. Na ausência de TF, VIIa apresenta atividade catalítica muito baixa, e a ligação à TF é necessária para tornar VIIa funcional por meio de um mecanismo alostérico. (Drake *et al.*, *Am J Pathol* 1989, 134:1087-1097). O complexo TF-VIIa ativa o fator X em Xa. Xa, por sua vez, associa-se com seu co-fator do fator Va em um complexo de protrombinase que por sua vez ativa protrombina, (também conhecida como fator II ou fator 2) em trombina (também conhecida como fator IIa, ou fator 2a). A trombina ativa plaquetas, converte fibrinogênio em fibrina e promove reticulação de fibrina ativando fator XIII, formando assim um plugue estável em sítios onde TF é exposto em células extravasculares. Além do mais, a trombina reforça a resposta da cascata de coagulação ativando fatores V e VIII.

[007] A via de ativação de contato é desencadeada por ativação do fator XII em XIIa. O fator XIIa converte XI em XIa, e XIa converte IX em IXa. IXa associa-se com seu co-fator VIIIa para converter X em Xa. As duas vias convergem neste ponto, já que o fator Xa associa-se ao fator Va para ativar a protrombina (fator II) em trombina (fator IIa).

### Inibição de coagulação.

[008] Pelo menos três mecanismos mantêm a cascata de coagulação sob controle, a saber, a ação de proteína C ativada, antitrombina e inibidor da via do fator tecidual. A proteína C ativada é uma serina protease que degrada co-fatores Va e VIIIa. A proteína C é ativada por trombina com trombomodulina, e exige co-enzima de proteína S para funcionar. A antitrombina é um inibidor de serina protease (serpina) que inibe serina proteases: trombina, Xa, XIIa, XIa e IXa. O inibidor da via do fator tecidual inibe a ação de Xa e do complexo TF-VIIa. (Schwartz AL et al., *Trends Cardiovasc Med.* 1997; 7:234 –239.)

### Doença

[009] A trombose é o desenvolvimento patológico de coágulos sanguíneos, e uma embolia ocorre quando um coágulo sanguíneo migra para uma outra parte do corpo e interfere com função do órgão. A tromboembolia pode causar condições tais como trombose venosa profunda, embolia pulmonar, infarto do miocárdio e acidente vascular. De maneira significativa, a tromboembolia é uma das principais causas de morbidade que afeta cerca de 2 milhões de norte americanos a cada ano. (Adcock et al. *American Journal de Clinical Pathology.* 1997;108:434–49). Embora as principais causas de trombose sejam em virtude de problemas extrínsecos adquiridos, por exemplo, cirurgia, câncer, imobilidade, alguns casos são em virtude de uma pré-disposição genética, por exemplo, síndrome antifosfolipídica e a condição dominante autossômica, Fator V Leiden. (Bertina RM et al. *Nature* 1994; 369:64-67.)

### Tratamento

[0010] Os anticoagulantes mais comumente usados, varfarina, heparina e heparina de baixo peso molecular (LMWH), possuem todas desvantagens significativas.

[0011] A varfarina é usada tipicamente para tratar pacientes que sofrem de fibrilação atrial. O medicamento interage com fatores de coagulação dependentes de vitamina K que incluem fatores II, VII, IX e X. As proteínas anticoagulantes C e S são também inibidas por varfarina. A terapia medicamentosa que usa varfarina é mais complicada pelo fato de que a varfarina interage com outras medicações, incluindo medicamentos usados para tratar fibrilação atrial, tal como amiodarona. Em decorrência de a terapia com varfarina ser difícil de prever, os pacientes devem ser cuidadosamente monitorados a fim de detectar quaisquer sinais de hemorragia irregular.

[0012] A heparina funciona ativando a antitrombina que inibe tanto a trombina quanto o fator X. (Bjork I, Lindahl U. *Mol Cell Biochem.* 1982 48: 161-182). O tratamento com heparina pode causar uma reação imunológica que faz com que as plaquetas se agreguem nos vasos sanguíneos, o que pode levar à trombose. Este efeito colateral é conhecido como trombocitopenia induzida por heparina (HIT) e exige monitoramento do paciente. O tratamento prolongado com heparina também pode levar à osteoporose. LMWH também pode inibir o fator 2, mas em um grau menor que a heparina não fracionada (UFH). A LMWH resultou no desenvolvimento de HIT.

[0013] Assim, os agentes anticoagulantes atuais perdem a previsibilidade e especificidade e, portanto, exigem monitoramento cuidadoso do paciente para prevenir efeitos colaterais adversos, tais como complicações de hemorragia. Não existe atualmente nenhum anticoagulante que alveja apenas a via intrínseca ou extrínseca.

#### SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0014] São fornecidos aqui métodos, compostos e composições para modular a expressão de RNAm e proteína do fator 11. Em certas modalidades, os inibidores específicos do fator 11 modulam a

expressão de RNAm e proteína do fator 11. Em certas modalidades, os inibidores específicos do fator 11 são ácidos nucleicos, proteínas ou moléculas pequenas.

[0015] Em certas modalidades, a modulação pode ocorrer em uma célula ou tecido. Em certas modalidades, a célula ou tecido está em um animal. Em certas modalidades, o animal é um humano. Em certas modalidades, os níveis de RNAm do fator 11 são reduzidos. Em certas modalidades, os níveis de proteína do fator 11 são reduzidos. Tal redução pode ocorrer de uma maneira dependente do tempo ou de uma maneira dependente da dose.

[0016] São também fornecidos métodos, compostos e composições usados para prevenir, tratar e melhorar doenças, distúrbios e condições. Em certas modalidades, tais doenças, distúrbios e condições são complicações tromboembolíticas. Tais complicações tromboembolíticas incluem as categorias de trombose, embolia e tromboembolia. Em certas modalidades, tais complicações tromboembolíticas incluem trombose venosa profunda, embolia pulmonar, infarto do miocárdio e acidente vascular.

[0017] Tais doenças, distúrbios e condições podem apresentar um ou mais fatores de risco, causas, ou consequências em comum. Certos fatores de risco e causas para o desenvolvimento de uma complicação tromboembolítica incluem imobilidade, cirurgia (particularmente cirurgia ortopédica), malignidade, gravidez, idade avançada, uso de contraceptivos orais, fibrilação atrial, complicação tromboembolítica prévia, doença inflamatória crônica e distúrbios de coagulação protrombótica inerente ou adquirida. Certas consequências associadas ao desenvolvimento de uma complicação tromboembolítica incluem diminuição do fluxo sanguíneo por meio de um vaso afetado, morte de tecido e morte.

[0018] Em certas modalidades, os métodos de tratamento incluem

administrar um inibidor específico do fator 11 a um indivíduo que necessita deste.

#### DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0019] Entende-se que tanto a descrição geral precedente quanto a descrição detalhada a seguir são apenas exemplares e explicativas e não são restritivas da invenção, da maneira reivindicada. Aqui, o uso do singular inclui o plural, a menos que de outra forma especificamente declarada. Da maneira aqui usada, o uso de “ou” significa “e/ou”, a menos que de outra forma declarada. Além do mais, o uso da palavra “incluindo”, bem como outras formas, tais como “inclui” e “incluído”, não é limitante. Igualmente, palavras tais como “elemento” ou “componente” incluem tanto elementos quanto componentes que compreendem uma unidade e elementos e componentes que compreendem mais de uma subunidade, a menos que de outra forma especificamente declarada.

[0020] Os títulos de seção aqui usados são apenas para propósitos organizacionais e não pretende-se que sejam limitantes do assunto em questão descrito. Todos os documentos, ou porções de documentos, citados neste pedido, incluindo, mas sem limitação, patentes, pedidos de patente, artigos, livros e tratados, são aqui expressamente incorporados pela referência das porções do documento aqui discutido, bem como na sua íntegra.

#### Definições

[0021] A menos que as definições específicas sejam fornecidas, a nomenclatura utilizada junto com, e os procedimentos e técnicas, química analítica, química orgânica sintética e química médica e farmacêutica aqui descritas são aquelas conhecidas e comumente usadas na técnica. As técnicas padrões podem ser usadas para a síntese química e análise química. Onde permitido, todas as patentes, pedidos, pedidos publicados e outras publicações, números de acesso

ao GENBANK e informação de sequência associada obtida por meio das bases de dados, tal como National Center for Biotechnology Information (NCBI), e outros dados referidos em toda a revelação são aqui incorporados pela referência nas porções do documento aqui discutido, bem como na sua íntegra.

[0022] A menos que de outra forma indicada, os termos a seguir apresentam os seguintes significados:

[0023] “2’-O-metoxietila” (também 2’-MOE e 2’-O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-OCH<sub>3</sub>) refere-se a uma modificação O-metóxi-etila da posição 2’ de um anel furosila. Um açúcar modificado de 2’-O-metoxietila é um açúcar modificado.

[0024] “Nucleotídeo de 2’-O-metoxietila” significa um nucleotídeo compreendendo um açúcar modificado da fração de 2’-O-metoxietila.

[0025] “5-metilcitosina” significa uma citosina modificada por um grupo metila anexado à posição 5. Uma 5-metilcitosina é uma nucleobase modificada.

[0026] “Agente farmacêutico ativo” significa a substância ou substâncias em uma composição farmacêutica que fornecem um benefício terapêutico quando administrada a um indivíduo. Por exemplo, em certas modalidades, um oligonucleotídeo anti-sentido alvejado pelo fator 11 é um agente farmacêutico ativo.

[0027] “Região alvo ativa” ou “região alvo” significa uma região na qual um ou mais compostos ativos anti-sentido são alvejados. “Compostos ativos anti-sentido” significa compostos anti-sentido para reduzir os níveis de ácido nucleico ou níveis de proteína alvo.

[0028] “Administrado ao mesmo tempo” refere-se à co-administração de dois agentes de qualquer maneira, na qual os efeitos farmacológicos de ambas são manifestados no paciente ao mesmo tempo. A administração concomitante não exige que ambos os agentes sejam administrados em uma única composição farmacêutica,

na mesma forma de dosagem, ou pela mesmo via de administração. Os efeitos de ambos os agentes não precisam ser manifestados ao mesmo tempo. Os efeitos precisam ser apenas sobrepostos por um período de tempo e não precisam ser coincidentes.

[0029] “Administração” significa fornecer um agente farmacêutico a um indivíduo e inclui, mas sem limitação, administração por um profissional médico e auto administração.

[0030] “Melhora” refere-se a uma diminuição de pelo menos um indicador, sinal ou sintoma de uma doença, distúrbio ou condição associada. A gravidade de indicadores pode ser determinada por medidas subjetivas ou objetivas, que são conhecidas pelos versados na técnica.

[0031] “Animal” refere-se a um animal humano ou não humano, incluindo, mas sem limitação, camundongos, ratos, coelhos, cães, gatos, porcos e primatas não humanos, incluindo, mas sem limitação, macacos e chimpanzés.

[0032] “Composto antídoto” refere-se a um composto capaz de diminuir a intensidade ou duração de qualquer atividade mediada por anti-sentido.

[0033] “Oligonucleotídeo antídoto” significa um composto antídoto compreendendo um oligonucleotídeo que é complementar a e é capaz de hibridizar em um composto anti-sentido.

[0034] “Proteína antídoto” significa um composto antídoto que compreende um peptídeo.

[0035] “Anticorpo” refere-se a uma molécula caracterizada por reagir especificamente com um antígeno de alguma maneira, onde o anticorpo e o antígeno são cada qual definidos nos termos do outro. O anticorpo pode se referir a uma molécula de anticorpo completa ou qualquer fragmento ou região desta, tais como a região de cadeia pesada, a região de cadeia leve, região Fab e região Fc.

[0036] “Atividade anti-sentido” significa qualquer atividade detectável ou mensurável atribuída à hibridização de um composto anti-sentido em seu ácido nucleico alvo. Em certas modalidades, a atividade anti-sentido é uma diminuição na quantidade ou expressão de um ácido nucleico alvo ou proteína codificada por tal ácido nucleico alvo.

[0037] “Composto anti-sentido” significa um composto oligomérico que é capaz de se submeter à hibridização em um ácido nucleico alvo por meio da ligação de hidrogênio.

[0038] “Inibição anti-sentido” significa redução de níveis de ácido nucleico alvo ou níveis de proteína alvo na presença de um composto anti-sentido complementar a um ácido nucleico alvo comparado aos níveis de ácido nucleico alvo ou níveis de proteína alvo na ausência do composto anti-sentido.

[0039] “Oligonucleotídeo anti-sentido” significa um oligonucleotídeo de fita simples com uma sequência de nucleobases que permite a hibridização em uma região ou segmento correspondente de um ácido nucleico alvo.

[0040] “Açúcar bicíclico” significa um anel furosila modificado pela ponte de dois átomos de anel não geminal. Um açúcar bicíclico é um açúcar modificado.

[0041] “Ácido nucleico bicíclico” ou “BNA” refere-se a um nucleosídeo ou nucleotídeo no qual a porção furanose do nucleosídeo ou nucleotídeo inclui uma ponte que conecta dois átomos de carbono no anel furanose, formando por meio disso um sistema de anel bicíclico.

[0042] “Estrutura cap” ou “fração cap terminal” significa modificações químicas, que foram incorporadas em ambas as terminações de um composto anti-sentido.

[0043] “Região quimicamente distinta” refere-se a uma região de



um composto anti-sentido que é de alguma maneira quimicamente diferente de uma outra região do mesmo composto anti-sentido. Por exemplo, uma região com nucleotídeos 2'-O-metoxietila é quimicamente distinta de uma região com nucleotídeos sem modificações 2'-O-metoxietila.

[0044] “Composto anti-sentido quimérico” significa um composto anti-sentido que apresenta pelo menos duas regiões quimicamente distintas.

[0045] “Co-administração” significa administração de dois ou mais agentes farmacêuticos a um indivíduo. Os dois ou mais agentes farmacêuticos podem estar em uma única composição farmacêutica ou podem estar em composições farmacêuticas separadas. Cada um dos dois ou mais agentes farmacêuticos pode ser administrado por meio da mesmo ou diferentes vias de administração. A co-administração inclui administração em paralelo ou sequencial.

[0046] “Fator de coagulação” significa quaisquer dos fatores I, II, III, IV, V, VII, VIII, IX, X, XI, XII, XIII, ou TAFI na cascata de coagulação sanguínea. “Ácido nucleico do fator de coagulação” significa qualquer ácido nucleico que codifica um fator de coagulação. Por exemplo, em certas modalidades, um ácido nucleico do fator de coagulação inclui, sem limitação, uma sequência de DNA que codifica um fator de coagulação (incluindo DNA genômico compreendendo introns e exons), uma sequência de RNA transcrita do DNA que codifica um fator de coagulação, e uma sequência de RNAm que codifica um fator de coagulação. “RNAm do fator de coagulação” significa um RNAm que codifica uma proteína do fator de coagulação.

[0047] “Complementaridade” significa a capacidade de pareamento entre nucleobases de um primeiro ácido nucleico e um segundo ácido nucleico.

[0048] “Nucleobases contíguas” significa nucleobases

imediatamente adjacentes umas às outras.

[0049] “Diluyente” significa um ingrediente em uma composição que perde a atividade farmacológica, mas é farmaceuticamente necessário ou desejável. Por exemplo, o diluyente em uma composição injetada pode ser um líquido, por exemplo, solução de salina.

[0050] “Dose” significa uma quantidade especificada de um agente farmacêutico fornecido em uma única administração, ou em um período de tempo especificado. Em certas modalidades, uma dose pode ser administrada em um, dois ou mais bolos, comprimidos ou injeções. Por exemplo, em certas modalidades onde a administração subcutânea é desejada, a dose desejada exige um volume que não é acomodado facilmente por uma única injeção, portanto, duas ou mais injeções podem ser usadas para atingir a dose desejada. Em certas modalidades, o agente farmacêutico é administrado por infusão por um período de tempo prolongado ou continuamente. As doses podem ser declaradas como a quantidade de agente farmacêutico por hora, dia, semana ou mês.

[0051] “Quantidade eficaz” significa a quantidade de agente farmacêutico ativo suficiente para efetuar uma consequência fisiológica desejada em um indivíduo que necessita do agente. A quantidade eficaz pode variar entre indivíduos dependendo da saúde e condição física do indivíduo a ser tratado, do grupo taxonômico dos indivíduos a serem tratados, da fórmula da composição, da avaliação da condição médica do indivíduo e de outros fatores relevante.

[0052] “Ácido nucleico do fator 11” ou “ácido nucleico do fator XI” ou “ácido nucleico do F 11” ou “ácido nucleico do F XI” significa qualquer ácido nucleico que codifica o fator 11. Por exemplo, em certas modalidades, um ácido nucleico do fator 11 inclui uma sequência de DNA que codifica o fator 11, uma sequência de RNA transcrita do DNA que codifica o fator 11 (incluindo DNA genômico que

compreende introns e exons), e uma sequência de RNAm que codifica o fator 11. “RNAm do fator 11” significa um RNAm que codifica uma proteína do fator 11.

[0053] “Inibidor específico do fator 11” refere-se a qualquer agente capaz de inibir especificamente a expressão de RNAm do fator 11 e/ou a proteína do fator 11 no nível molecular. Por exemplo, os inibidores específicos do fator 11 incluem ácidos nucleicos (incluindo compostos anti-sentido), peptídeos, anticorpos, moléculas pequenas, e outros agentes capazes de inibir a expressão de RNAm do fator 11 e/ou proteína do fator 11. Em certas modalidades, modulando especificamente a expressão do RNAm do fator 11 e/ou a expressão da proteína do fator 11, os inibidores específicos do fator 11 podem afetar outros componentes da cascata de coagulação, incluindo componentes à jusante. De maneira similar, em certas modalidades, os inibidores específicos do fator 11 podem afetar outros processos moleculares em um animal.

[0054] “Antídoto do inibidor específico do fator 11” significa um composto capaz de diminuir o efeito de um inibidor específico do fator 11. Em certas modalidades, um antídoto do inibidor específico do fator 11 é selecionado de um peptídeo do fator 11; um antídoto de oligonucleotídeo do fator 11, incluindo um antídoto do composto do fator 11 complementar a um composto anti-sentido do fator 11; e qualquer composto ou proteína que afeta a via de coagulação intrínseca ou extrínseca.

[0055] “Totalmente complementar” ou “100 % complementar” significa que cada nucleobase de um primeiro ácido nucleico apresenta uma nucleobase complementar em um segundo ácido nucleico. Em certas modalidades, um primeiro ácido nucleico é um composto anti-sentido e um ácido nucleico alvo é um segundo ácido nucleico.

[0056] “Gap-mer” significa um composto anti-sentido quimérico no qual uma região interna com uma pluralidade de nucleosídeos que auxilia a clivagem de RNase H está posicionada entre regiões externas com um ou mais nucleosídeos, em que os nucleosídeos compreendendo a região interna são quimicamente distintos do nucleosídeo ou nucleosídeos compreendendo as regiões externas. A região interna pode ser referida como um “segmento de intervalo” e as regiões externas podem ser referidas como “segmentos em asa”.

[0057] “Maior em intervalo” significa um composto anti-sentido quimérico com um segmento de intervalo de 12 ou mais 2'-desoxirribonucleosídeos contíguos posicionado entre e imediatamente adjacente aos segmentos em asa 5' e 3' que apresentam de um a seis nucleosídeos.

[0058] “Hibridização” significa o anelamento de moléculas de ácido nucleico complementar. Em certas modalidades, as moléculas de ácido nucleico complementar incluem um composto anti-sentido e um ácido nucleico alvo.

[0059] “Identificar um animal em risco para complicações tromboembolíticas” significa identificar um animal que foi diagnosticado com uma complicação tromboembolítica ou identificar um animal pré-disposto para desenvolver uma complicação tromboembolítica. Os indivíduos pré-dispostos para desenvolver uma complicação tromboembolítica incluem aqueles com um ou mais fatores de risco para complicações tromboembolíticas incluindo imobilidade, cirurgia (particularmente cirurgia ortopédica), malignidade, gravidez, idade avançada, uso de contraceptivos orais, e distúrbios de coagulação protrombótica inerente ou adquirida. Tal identificação pode ser realizada por qualquer método incluindo avaliar um histórico médico do indivíduo e testes clínicos ou avaliações padrões.

[0060] “Imediatamente adjacente” significa que não existem

elementos de intervenção entre os elementos adjacentes imediatos.

[0061] “Indivíduo” significa um animal humano ou não humano selecionado para tratamento ou terapia.

[0062] “Ligação internucleosídeos” refere-se à ligação química entre os nucleosídeos.

[0063] “Nucleosídeos ligados” significam nucleosídeos adjacentes que são ligados juntos.

[0064] “Incompatibilidade” ou “nucleobase não complementar” refere-se ao caso quando uma nucleobase de um primeiro ácido nucleico não é capaz de parear com a nucleobase correspondente de um segundo ou ácido nucleico alvo.

[0065] “Ligação internucleosídeos modificados” refere-se a uma substituição ou qualquer mudança de uma ligação internucleosídeo de ocorrência natural (isto é, uma ligação internucleosídeo de fosfodiéster).

[0066] “Nucleobase modificada” refere-se a qualquer nucleobase sem ser adenina, citosina, guanina, timidina ou uracila. Uma “nucleobase não modificada” significa as bases púricas adenina (A) e guanina (G), e as bases pirimídicas timina (T), citosina (C) e uracila (U).

[0067] “Nucleotídeo modificado” significa um nucleotídeo que apresenta, independentemente, uma fração de açúcar modificado, ligação internucleosídeos modificada, ou nucleobase modificada. Um “nucleosídeo modificado” significa um nucleosídeo que apresenta, independentemente, uma fração de açúcar modificado ou nucleobase modificada.

[0068] “Oligonucleotídeo modificado” significa um oligonucleotídeo compreendendo uma ligação internucleosídeos modificados, um açúcar modificado, ou uma nucleobase modificada.

[0069] “Açúcar modificado” refere-se a uma substituição ou

mudança de um açúcar natural.

[0070] “Motivo” significa o padrão de regiões quimicamente distintas em um composto anti-sentido.

[0071] “Ligação internucleosídeos de ocorrência natural” significa uma ligação de fosfodiéster 3’ a 5’.

[0072] “Fração de açúcar natural” significa um açúcar observado em DNA (2’-H) ou RNA (2’-OH).

[0073] “Ácido nucleico” refere-se a moléculas compostas de nucleotídeos monoméricos. Um ácido nucleico inclui ácidos ribonucleicos (RNA), ácidos desoxirribonucleicos (DNA), ácidos nucleicos de fita simples, ácidos nucleicos de fita dupla, ácidos ribonucleicos de pequena interferência (RNAsi), e RNAsmicro (RNAmi).

[0074] “Nucleobase” significa uma fração heterocíclica capaz de parear com uma base de um outro ácido nucleico.

[0075] “Sequência de nucleobases” significa a ordem de nucleobases contíguas independente de qualquer modificação de açúcar, ligação ou nucleobase.

[0076] “Nucleosídeo” significa uma nucleobase ligada a um açúcar.

[0077] “Mimético de nucleosídeo” inclui aquelas estruturas usadas para substituir o açúcar ou o açúcar e a base, e não necessariamente a ligação em uma ou mais posições de um composto oligomérico tal como, por exemplo, mimético de nucleosídeos com morfolino, cicloexenila, cicloexila, tetraidropiranila, miméticos de açúcar biciclo ou triciclo, por exemplo, unidades de açúcar não furanose. O mimético de nucleotídeo inclui aquelas estruturas usadas para substituir o nucleosídeo e a ligação em uma ou mais posições de um composto oligomérico tal como, por exemplo, ácidos nucleicos peptídicos ou morfolinos (morfolinos ligados por -N(H)-C(=O)-O- ou outra ligação não

fosfodiéster). Os representantes de açúcar sobrepõem-se com o termo levemente mais amplo de mimético de nucleosídeo, mas pretende-se que indiquem apenas a substituição da unidade de açúcar (anel furanose). Os anéis de tetraidropiranila aqui fornecidos são ilustrativos de um exemplo dos representantes de açúcar em que o grupo do açúcar furanose foi substituído por um sistema de anel de tetraidropiranila.

[0078] “Nucleotídeo” significa um nucleosídeo com um grupo fosfato covalentemente ligado à porção de açúcar do nucleosídeo.

[0079] “Composto oligomérico” ou “oligômero” significa um polímero de subunidades monoméricas ligadas que é capaz de hibridizar em pelo menos uma região de uma molécula de ácido nucleico.

[0080] “Oligonucleotídeo” significa um polímero de nucleosídeos ligados, em que cada qual pode ser modificado ou não modificado, independente um do outro.

[0081] “Administração parenteral” significa administração por meio de injeção ou infusão. A administração parenteral inclui administração subcutânea, administração intravenosa, administração intramuscular, administração intra-arterial, administração intraperitonal ou administração intracranial, por exemplo, administração intratecal ou intracerebroventricular.

[0082] “Peptídeo” significa uma molécula formada ligando pelo menos dois aminoácidos por ligações de amida. Peptídeo refere-se a polipeptídeos e proteínas.

[0083] “Composição farmacêutica” significa uma mistura de substâncias adequadas para administrar a um indivíduo. Por exemplo, uma composição farmacêutica pode compreender um ou mais agentes farmacêuticos ativos e um solução aquosa estéril.

[0084] “Sais farmaceuticamente aceitáveis” significa sais

farmaceuticamente e fisiologicamente aceitáveis de compostos anti-sentido, isto é, sais que mantêm a atividade biológica desejada do oligonucleotídeo pai e não transmitem efeitos toxicológicos indesejados a este.

[0085] “Ligação de fosforotioato” significa uma ligação internucleosídeos onde a ligação fosfodiéster é modificada substituindo um dos átomos de oxigênio sem conexão com um átomo de enxofre. Uma ligação de fosforotioato (P=S) é uma ligação modificada entre nucleosídeos.

[0086] “Porção” significa um número definido de nucleobases contíguas (isto é, ligadas) de um ácido nucleico. Em certas modalidades, uma porção é um número definido de nucleobases contíguas de um ácido nucleico alvo. Em certas modalidades, uma porção é um número definido de nucleobases contíguas de um composto anti-sentido.

[0087] “Prevenção” refere-se a retardar ou evitar o início ou desenvolvimento de uma doença, distúrbio ou condição por um período de tempo de minutos a indefinidamente. Prevenção também significa reduzir o risco de desenvolver uma doença, distúrbio ou condição.

[0088] “Pró-medicamento” significa um agente terapêutico que é preparado em uma forma inativa que é convertida para uma forma ativa no corpo ou células destes pela ação de enzimas endógenas ou outros produtos químicos ou condições.

[0089] “Efeitos colaterais” significam respostas fisiológicas atribuíveis a um tratamento sem ser os efeitos desejados. Em certas modalidades, os efeitos colaterais incluem reações de sítio de injeção, anormalidades no teste de função hepática, anormalidades da função renal, toxicidade hepática, toxicidade renal, anormalidades do sistema nervoso central, miopatias e indisposição. Por exemplo, maiores níveis



de aminotransferase no soro pode indicar toxicidade hepática ou anormalidade da função hepática. Por exemplo, o aumento da bilirrubina pode indicar toxicidade hepática ou anormalidade da função hepática.

[0090] “Oligonucleotídeo de fita simples” significa um oligonucleotídeo que não é hibridizado em uma fita complementar.

[0091] “Especificamente hibridizável” refere-se a um composto anti-sentido com um grau suficiente de complementaridade entre um oligonucleotídeo anti-sentido e um ácido nucleico alvo para induzir um efeito desejado, exibindo ao mesmo tempo efeitos mínimos ou nenhum efeito em ácidos nucleicos não alvos em condições nas quais a ligação específica é desejada, isto é, em condições fisiológicas no case de ensaios *in vivo* e tratamentos terapêuticos.

[0092] “Alvejar” ou “alvejado” significa o processo de projeto e seleção de um composto anti-sentido que hibridizará especificamente em um ácido nucleico alvo e induzirá um efeito desejado.

[0093] “Ácido nucleico alvo”, “RNA alvo”, e “transcrito de RNA alvo” referem-se todos a um ácido nucleico capaz de ser alvejado por compostos anti-sentido.

[0094] “Segmento alvo” significa a sequência de nucleotídeos de um ácido nucleico alvo no qual um composto anti-sentido é alvejado. “sítio alvo 5’” refere-se ao principal nucleotídeo 5’ de um segmento alvo. “sítio alvo 3’” refere-se ao principal nucleotídeo 3’ de um segmento alvo.

[0095] “Quantidade terapeuticamente eficaz” significa uma quantidade de um agente farmacêutico que fornece um benefício terapêutico a um indivíduo.

[0096] “Complicação tromboembolítica” significa qualquer doença, distúrbio ou condição que envolve uma embolia causada por um trombo. Exemplos de tais doenças, distúrbios e condições incluem as

categorias de trombose, embolia, e tromboembolia. Em certas modalidades, tais doenças, distúrbios e condições incluem trombose venosa profunda, embolia pulmonar, infarto do miocárdio e acidente vascular.

[0097] “Tratar” refere-se a administrar uma composição farmacêutica para realizar uma alteração ou melhoria de uma doença, distúrbio ou condição.

[0098] “Nucleotídeo não modificado” significa um nucleotídeo composto de nucleobases de ocorrência natural, frações de açúcar e ligações entre nucleosídeos. Em certas modalidades, um nucleotídeo não modificado é um Nucleotídeo de RNA (isto é,  $\beta$ -D-ribonucleosídeos) ou um nucleotídeo de DNA (isto é,  $\beta$ -D-desoxirribonucleosídeo).

#### Certas modalidades

[0099] As modalidades da presente invenção fornecem métodos, compostos e composições para diminuir a expressão de RNAm e proteína do fator 11.

[00100] As modalidades da presente invenção fornecem métodos, compostos e composições para o tratamento, prevenção ou melhora de doenças, distúrbios e condições associadas ao fator 11 em um indivíduo que necessita destes. São também contemplados métodos e compostos para a preparação de um medicamento para o tratamento, prevenção, ou melhora de uma doença, distúrbio ou condição associada ao fator 11. Doenças, distúrbios e condições associados ao fator 11 incluem complicações tromboembolíticas tais como trombose, embolia, tromboembolia, trombose venosa profunda, embolia pulmonar, infarto do miocárdio e acidente vascular.

[00101] As modalidades da presente invenção fornecem um inibidor específico do fator 11 para uso no tratamento, prevenção ou melhora de uma doença associada ao fator 11. Em certas modalidades, os

inibidores específicos do fator 11 são ácidos nucleicos (incluindo compostos anti-sentido), peptídeos, anticorpos, moléculas pequenas, e outros agentes capazes de inibir a expressão de RNAm do fator 11 e/ou proteína do fator 11.

[00102] Em certas modalidades da presente invenção, os inibidores específicos do fator 11 são peptídeos ou proteínas, tais como, mas sem limitação, inibidores de alfa 1 protease, antitrombina III, inibidores de C1 e inibidores de alfa 2 plasmina da maneira descrita em *J Clin Invest* 1982, 69:844-852; alfa 1 antitripsina (alfa 1AT) da maneira descrita em *Thromb Res* 1987, 48:145-151; inibidores do peptídeo do fator 11 da maneira descrita em USPPN 2008/021998 e *Blood* 1998, 92:4198-206; MAP4-RGKWC da maneira descrita em *Thromb Res* 2001, 104:451-465; beta 2 GPI da maneira descrita em *Proc Natl Acad Sci* 2004, 101:3939-44; inibidor da proteinase de *Lentinus* da maneira descrita em *Eur J Biochem* 1999, 262:915-923; inibidor do domínio Kunitz precursor da proteína protease nexina-2/beta amilóide (APPI) e antitrombina (AT) da maneira descrita em *J Biol Chem* 2004, 279:29485-29492; e aprotinina da maneira descrita em *J Biol Chem* 2005, 280:23523-30.

[00103] Em certas modalidades da presente invenção, os inibidores específicos do fator 11 são anticorpos, tais como, mas sem limitação, Winston-Salem (IgG3 kapa) e Baltimore (IgG1 kapa) da maneira descrita em *Blood* 1988, 72:1748-54; 5F4, 3C1, e 1F1 da maneira descrita em *J Biol Chem* 1985, 260:10714-719; anticorpos monoclonais da maneira descrita em *Throm Haemost* 1990, 63:417-23; XI-5108 da maneira descrita em *J Thromb Haem* 2006, 4:1496-1501; anticorpos monoclonais 4-1 da maneira descrita em *Thromb Res* 1986, 42:225-34; e anticorpo abcixmab da maneira descrita no exemplo 19 de USPN 6.566.140.

[00104] Em certas modalidades da presente invenção, os inibidores

específicos do fator 11 são moléculas pequenas, tal como, mas sem limitação, fluorfosfatos de diisopropila (DFP); os inibidores de molécula pequena da maneira descrita nos exemplos 1-7 de USPPN 2004/0180855; e p-aminobenzamidina (pAB) da maneira descrita em *J Biol Chem* 2005, 280:23523-30.

[00105] As modalidades da presente invenção fornecem um inibidor específico do fator 11, da maneira aqui descrita, para uso no tratamento, prevenção ou melhora das complicações tromboembolíticas tais como trombose, embolia, tromboembolia, trombose venosa profunda, embolia pulmonar, infarto do miocárdio e acidente vascular.

[00106] As modalidades da presente invenção fornecem o uso de inibidores específicos do fator 11 da maneira aqui descrita na fabricação de um medicamento para tratar, melhorar ou prevenir uma complicação tromboembolítica tais como trombose, embolia, tromboembolia, trombose venosa profunda, embolia pulmonar, infarto do miocárdio e acidente vascular.

[00107] As modalidades da presente invenção fornecem um inibidor específico do fator 11 da maneira aqui descrita para uso no tratamento, prevenção ou melhora de uma complicação tromboembolítica, da maneira aqui descrita, por terapia de combinação com um agente ou terapia adicional, da maneira aqui descrita. Os agentes ou terapias podem ser co-administrados ou administrados ao mesmo tempo.

[00108] As modalidades da presente invenção fornecem o uso de um inibidor específico do fator 11, da maneira aqui descrita, na fabricação de um medicamento para tratar, prevenir ou melhorar uma complicação tromboembolítica, da maneira aqui descrita, por terapia de combinação com um agente ou terapia adicional da maneira aqui descrita. Os agentes ou terapias podem ser co-administrados ou

administrados ao mesmo tempo.

[00109] As modalidades da presente invenção fornecem o uso de um inibidor específico do fator 11, da maneira aqui descrita, na fabricação de um medicamento para tratar, prevenir ou melhorar uma complicação tromboembólica da maneira aqui descrita em um paciente que é subsequentemente administrado com um agente ou terapia adicional da maneira aqui descrita.

[00110] As modalidades da presente invenção fornecem um estojo para tratar, prevenir ou melhorar uma complicação tromboembólica, da maneira aqui descrita, em que o estojo compreende:

(i) um inibidor específico do fator 11 da maneira aqui descrita; e alternativamente

(ii) um agente ou terapia adicional da maneira aqui descrita.

[00111] Um estojo da presente invenção pode incluir adicionalmente instruções para usar o estojo para tratar, prevenir ou melhorar uma complicação tromboembólica, da maneira aqui descrita, por terapia de combinação da maneira aqui descrita.

[00112] As modalidades da presente invenção fornecem compostos anti-sentido alvejados em um ácido nucleico do fator 11. Em certas modalidades, o ácido nucleico do fator 11 é qualquer das sequências apresentadas no acesso ao GENBANK No. NM\_000128.3 (aqui incorporado como SEQ ID NO: 1), acesso ao GENBANK No. NT\_022792.17, truncado de 19598000 a 19624000, (aqui incorporado como SEQ ID NO: 2), acesso ao GENBANK No. NM\_028066.1 (aqui incorporado como SEQ ID NO: 6), exons 1-15 do acesso ao GENBANK No. NW\_001118167.1 (aqui incorporado como SEQ ID NO: 274).

[00113] Em certas modalidades, a invenção fornece um composto compreendendo um oligonucleotídeo modificado. Em certas modalidades, o composto da invenção compreende um

oligonucleotídeo modificado que consiste em 12 a 30 nucleosídeos ligados.

[00114] Em certas modalidades, o composto da invenção pode compreender um oligonucleotídeo modificado compreendendo uma sequência de nucleobases pelo menos 80 %, pelo menos 85 %, pelo menos 90 %, pelo menos 95 %, pelo menos 96 %, pelo menos 97 %, pelo menos 98 %, ou pelo menos 99 % complementar a uma porção de tamanho igual de SEQ ID NO: 1. Em certas modalidades, o composto da invenção pode compreender um oligonucleotídeo modificado compreendendo uma sequência de nucleobases 100 % complementar a uma porção de tamanho igual de SEQ ID NO: 1.

[00115] Em certas modalidades, a invenção fornece um composto compreendendo um oligonucleotídeo modificado que compreende uma sequência de nucleobases complementar a pelo menos uma porção de nucleobases 656 a 676 de SEQ ID NO: 1. O dito oligonucleotídeo modificado pode compreender pelo menos 8, pelo menos 10, pelo menos 12, pelo menos 14, pelo menos 16, pelo menos 18 ou 20 nucleobases contíguas complementares a uma porção de tamanho igual de nucleobases 656 a 676 de SEQ ID NO: 1. O dito oligonucleotídeo modificado pode compreender uma sequência de nucleobases pelo menos 80 %, pelo menos 85 %, pelo menos 90 %, pelo menos 95 %, pelo menos 96 %, pelo menos 97 %, pelo menos 98 %, ou pelo menos 99 % complementar a uma porção de tamanho igual de SEQ ID NO: 1. O dito oligonucleotídeo modificado pode compreender uma sequência de nucleobases 100 % complementar a uma porção de tamanho igual de SEQ ID NO: 1. O dito oligonucleotídeo modificado pode atingir pelo menos 80 % de inibição dos níveis de RNAm humano da maneira determinada usando um método de ensaio de RT-PCR, opcionalmente em células HepG2 (por exemplo, da maneira descrita no exemplo 3).

[00116] Em certas modalidades, a invenção fornece um composto compreendendo um oligonucleotídeo modificado que compreende uma sequência de nucleobases complementar a pelo menos uma porção de nucleobases 665 a 687 de SEQ ID NO: 1. O dito oligonucleotídeo modificado pode compreender pelo menos 8, pelo menos 10, pelo menos 12, pelo menos 14, pelo menos 16, pelo menos 18 ou 20 nucleobases contíguas complementares a uma porção de tamanho igual de nucleobases 665 a 687 de SEQ ID NO: 1. O dito oligonucleotídeo modificado pode compreender uma sequência de nucleobases pelo menos 80 %, pelo menos 85 %, pelo menos 90 %, pelo menos 95 %, pelo menos 96 %, pelo menos 97 %, pelo menos 98 %, ou pelo menos 99 % complementar a uma porção de tamanho igual de SEQ ID NO: 1. O dito oligonucleotídeo modificado pode compreender uma sequência de nucleobases 100 % complementar a uma porção de tamanho igual de SEQ ID NO: 1. O dito oligonucleotídeo modificado pode atingir pelo menos 50 % de inibição dos níveis de RNAm humano da maneira determinada usando um método de ensaio de RT-PCR, opcionalmente em células HepG2 (por exemplo, da maneira descrita no exemplo 3).

[00117] Em certas modalidades, a invenção fornece um composto compreendendo um oligonucleotídeo modificado que compreende uma sequência de nucleobases complementar a pelo menos uma porção de nucleobases 675 a 704 de SEQ ID NO: 1. O dito oligonucleotídeo modificado pode compreender pelo menos 8, pelo menos 10, pelo menos 12, pelo menos 14, pelo menos 16, pelo menos 18 ou 20 nucleobases contíguas complementares a uma porção de tamanho igual de nucleobases 675 a 704 de SEQ ID NO: 1. O dito oligonucleotídeo modificado pode compreender uma sequência de nucleobases pelo menos 80 %, pelo menos 85 %, pelo menos 90 %, pelo menos 95 %, pelo menos 96 %, pelo menos 97 %, pelo menos 98

%, ou pelo menos 99 % complementar a uma porção de tamanho igual de SEQ ID NO: 1. O dito oligonucleotídeo modificado pode compreender uma sequência de nucleobases 100 % complementar a uma porção de tamanho igual de SEQ ID NO: 1. O dito oligonucleotídeo modificado pode atingir pelo menos 50 % de inibição dos níveis de RNAm humano da maneira determinada usando um método de ensaio de RT-PCR, opcionalmente em células HepG2 (por exemplo, da maneira descrita no exemplo 3).

[00118] Em certas modalidades, a invenção fornece um composto compreendendo um oligonucleotídeo modificado que compreende uma sequência de nucleobases complementar a pelo menos uma porção de nucleobases 677 a 704 de SEQ ID NO: 1. O dito oligonucleotídeo modificado pode compreender pelo menos 8, pelo menos 10, pelo menos 12, pelo menos 14, pelo menos 16, pelo menos 18 ou 20 nucleobases contíguas complementares a uma porção de tamanho igual de nucleobases 677 a 704 de SEQ ID NO: 1. O dito oligonucleotídeo modificado pode compreender uma sequência de nucleobases pelo menos 80 %, pelo menos 85 %, pelo menos 90 %, pelo menos 95 %, pelo menos 96 %, pelo menos 97 %, pelo menos 98 %, ou pelo menos 99 % complementar a uma porção de tamanho igual de SEQ ID NO: 1. O dito oligonucleotídeo modificado pode compreender uma sequência de nucleobases 100 % complementar a uma porção de tamanho igual de SEQ ID NO: 1. O dito oligonucleotídeo modificado pode atingir pelo menos 60 % de inibição dos níveis de RNAm humano da maneira determinada usando um método de ensaio de RT-PCR, opcionalmente em células HepG2 (por exemplo, da maneira descrita no exemplo 3).

[00119] Em certas modalidades, a invenção fornece um composto compreendendo um oligonucleotídeo modificado que compreende uma sequência de nucleobases complementar a pelo menos uma porção



de nucleobases 678 a 697 de SEQ ID NO: 1. O dito oligonucleotídeo modificado pode compreender pelo menos 8, pelo menos 10, pelo menos 12, pelo menos 14, pelo menos 16, pelo menos 18 ou 20 nucleobases contíguas complementares a uma porção de tamanho igual de nucleobases 678 a 697 de SEQ ID NO: 1. O dito oligonucleotídeo modificado pode compreender uma sequência de nucleobases pelo menos 80 %, pelo menos 85 %, pelo menos 90 %, pelo menos 95 %, pelo menos 96 %, pelo menos 97 %, pelo menos 98 %, ou pelo menos 99 % complementar a uma porção de tamanho igual de SEQ ID NO: 1. O dito oligonucleotídeo modificado pode compreender uma sequência de nucleobases 100 % complementar a uma porção de tamanho igual de SEQ ID NO: 1. O dito oligonucleotídeo modificado pode atingir pelo menos 70 % de inibição dos níveis de RNAm humano da maneira determinada usando um método de ensaio de RT-PCR, opcionalmente em células HepG2 (por exemplo, da maneira descrita no exemplo 3).

[00120] Em certas modalidades, a invenção fornece um composto compreendendo um oligonucleotídeo modificado que compreende uma sequência de nucleobases complementar a pelo menos uma porção de nucleobases 680 a 703 de SEQ ID NO: 1. O dito oligonucleotídeo modificado pode compreender pelo menos 8, pelo menos 10, pelo menos 12, pelo menos 14, pelo menos 16, pelo menos 18 ou 20 nucleobases contíguas complementares a uma porção de tamanho igual de nucleobases 680 a 703 de SEQ ID NO: 1. O dito oligonucleotídeo modificado pode compreender uma sequência de nucleobases pelo menos 80 %, pelo menos 85 %, pelo menos 90 %, pelo menos 95 %, pelo menos 96 %, pelo menos 97 %, pelo menos 98 %, ou pelo menos 99 % complementar a uma porção de tamanho igual de SEQ ID NO: 1. O dito oligonucleotídeo modificado pode compreender uma sequência de nucleobases 100 % complementar a

uma porção de tamanho igual de SEQ ID NO: 1. O dito oligonucleotídeo modificado pode atingir pelo menos 80 % de inibição dos níveis de RNAm humano da maneira determinada usando um método de ensaio de RT-PCR, opcionalmente em células HepG2 (por exemplo, da maneira descrita no exemplo 3 e exemplo 30).

[00121] Em certas modalidades, a invenção fornece um composto compreendendo um oligonucleotídeo modificado que compreende uma sequência de nucleobases complementar a pelo menos uma porção de nucleobases 683 a 702 de SEQ ID NO: 1. O dito oligonucleotídeo modificado pode compreender pelo menos 8, pelo menos 10, pelo menos 12, pelo menos 14, pelo menos 16, pelo menos 18 ou 20 nucleobases contíguas complementares a uma porção de tamanho igual de nucleobases 683 a 702 de SEQ ID NO: 1. O dito oligonucleotídeo modificado pode compreender uma sequência de nucleobases pelo menos 80 %, pelo menos 85 %, pelo menos 90 %, pelo menos 95 %, pelo menos 96 %, pelo menos 97 %, pelo menos 98 %, ou pelo menos 99 % complementar a uma porção de tamanho igual de SEQ ID NO: 1. O dito oligonucleotídeo modificado pode compreender uma sequência de nucleobases 100 % complementar a uma porção de tamanho igual de SEQ ID NO: 1. O dito oligonucleotídeo modificado pode atingir pelo menos 90 % de inibição dos níveis de RNAm humano da maneira determinada usando um método de ensaio de RT-PCR, opcionalmente em células HepG2 (por exemplo, da maneira descrita no exemplo 3).

[00122] Em certas modalidades, a invenção fornece um composto compreendendo um oligonucleotídeo modificado que compreende uma sequência de nucleobases complementar a pelo menos uma porção de nucleobases 738 a 759 de SEQ ID NO: 1. O dito oligonucleotídeo modificado pode compreender pelo menos 8, pelo menos 10, pelo menos 12, pelo menos 14, pelo menos 16, pelo menos 18 ou 20

nucleobases contíguas complementares a uma porção de tamanho igual de nucleobases 738 a 759 de SEQ ID NO: 1. O dito oligonucleotídeo modificado pode compreender uma sequência de nucleobases pelo menos 80 %, pelo menos 85 %, pelo menos 90 %, pelo menos 95 %, pelo menos 96 %, pelo menos 97 %, pelo menos 98 %, ou pelo menos 99 % complementar a uma porção de tamanho igual de SEQ ID NO: 1. O dito oligonucleotídeo modificado pode compreender uma sequência de nucleobases 100 % complementar a uma porção de tamanho igual de SEQ ID NO: 1. O dito oligonucleotídeo modificado pode atingir pelo menos 80 % de inibição dos níveis de RNAm humano da maneira determinada usando um método de ensaio de RT-PCR, opcionalmente em células HepG2 (por exemplo, da maneira descrita no exemplo 3 e exemplo 30).

[00123] Em certas modalidades, a invenção fornece um composto compreendendo um oligonucleotídeo modificado que compreende uma sequência de nucleobases complementar a pelo menos uma porção de nucleobases 738 a 760 de SEQ ID NO: 1. O dito oligonucleotídeo modificado pode compreender pelo menos 8, pelo menos 10, pelo menos 12, pelo menos 14, pelo menos 16, pelo menos 18 ou 20 nucleobases contíguas complementares a uma porção de tamanho igual de nucleobases 738 a 760 de SEQ ID NO: 1. O dito oligonucleotídeo modificado pode compreender uma sequência de nucleobases pelo menos 80 %, pelo menos 85 %, pelo menos 90 %, pelo menos 95 %, pelo menos 96 %, pelo menos 97 %, pelo menos 98 %, ou pelo menos 99 % complementar a uma porção de tamanho igual de SEQ ID NO: 1. O dito oligonucleotídeo modificado pode compreender uma sequência de nucleobases 100 % complementar a uma porção de tamanho igual de SEQ ID NO: 1. O dito oligonucleotídeo modificado pode atingir pelo menos 60 % de inibição dos níveis de RNAm humano da maneira determinada usando um

método de ensaio de RT-PCR, opcionalmente em células HepG2 (por exemplo, da maneira descrita no exemplo 3).

[00124] Em certas modalidades, a invenção fornece um composto compreendendo um oligonucleotídeo modificado que compreende uma sequência de nucleobases complementar a pelo menos uma porção de nucleobases 738 a 762 de SEQ ID NO: 1. O dito oligonucleotídeo modificado pode compreender pelo menos 8, pelo menos 10, pelo menos 12, pelo menos 14, pelo menos 16, pelo menos 18 ou 20 nucleobases contíguas complementares a uma porção de tamanho igual de nucleobases 738 a 762 de SEQ ID NO: 1. O dito oligonucleotídeo modificado pode compreender uma sequência de nucleobases pelo menos 80 %, pelo menos 85 %, pelo menos 90 %, pelo menos 95 %, pelo menos 96 %, pelo menos 97 %, pelo menos 98 %, ou pelo menos 99 % complementar a uma porção de tamanho igual de SEQ ID NO: 1. O dito oligonucleotídeo modificado pode compreender uma sequência de nucleobases 100 % complementar a uma porção de tamanho igual de SEQ ID NO: 1. O dito oligonucleotídeo modificado pode atingir pelo menos 45 % de inibição dos níveis de RNAm humano da maneira determinada usando um método de ensaio de RT-PCR, opcionalmente em células HepG2 (por exemplo, da maneira descrita no exemplo 3).

[00125] Em certas modalidades, a invenção fornece um composto compreendendo um oligonucleotídeo modificado que compreende uma sequência de nucleobases complementar a pelo menos uma porção de nucleobases 1.018 a 1.042 de SEQ ID NO: 1. O dito oligonucleotídeo modificado pode compreender pelo menos 8, pelo menos 10, pelo menos 12, pelo menos 14, pelo menos 16, pelo menos 18 ou 20 nucleobases contíguas complementares a uma porção de tamanho igual de nucleobases 1.018 a 1.042 de SEQ ID NO: 1. O dito oligonucleotídeo modificado pode compreender uma sequência de

nucleobases pelo menos 80 %, pelo menos 85 %, pelo menos 90 %, pelo menos 95 %, pelo menos 96 %, pelo menos 97 %, pelo menos 98 %, ou pelo menos 99 % complementar a uma porção de tamanho igual de SEQ ID NO: 1. O dito oligonucleotídeo modificado pode compreender uma sequência de nucleobases 100 % complementar a uma porção de tamanho igual de SEQ ID NO: 1. O dito oligonucleotídeo modificado pode atingir pelo menos 80 % de inibição dos níveis de RNAm humano da maneira determinada usando um método de ensaio de RT-PCR, opcionalmente em células HepG2 (por exemplo, da maneira descrita no exemplo 3).

[00126] Em certas modalidades, a invenção fornece um composto compreendendo um oligonucleotídeo modificado que compreende uma sequência de nucleobases complementar a pelo menos uma porção de nucleobases 1.062 a 1.089 de SEQ ID NO: 1. O dito oligonucleotídeo modificado pode compreender pelo menos 8, pelo menos 10, pelo menos 12, pelo menos 14, pelo menos 16, pelo menos 18 ou 20 nucleobases contíguas complementares a uma porção de tamanho igual de nucleobases 1.062 a 1.089 de SEQ ID NO: 1. O dito oligonucleotídeo modificado pode compreender uma sequência de nucleobases pelo menos 80 %, pelo menos 85 %, pelo menos 90 %, pelo menos 95 %, pelo menos 96 %, pelo menos 97 %, pelo menos 98 %, ou pelo menos 99 % complementar a uma porção de tamanho igual de SEQ ID NO: 1. O dito oligonucleotídeo modificado pode compreender uma sequência de nucleobases 100 % complementar a uma porção de tamanho igual de SEQ ID NO: 1. O dito oligonucleotídeo modificado pode atingir pelo menos 70 % de inibição dos níveis de RNAm humano da maneira determinada usando um método de ensaio de RT-PCR, opcionalmente em células HepG2 (por exemplo, da maneira descrita no exemplo 3).

[00127] Em certas modalidades, a invenção fornece um composto

compreendendo um oligonucleotídeo modificado que compreende uma sequência de nucleobases complementar a pelo menos uma porção de nucleobases 1.062 a 1.090 de SEQ ID NO: 1. O dito oligonucleotídeo modificado pode compreender pelo menos 8, pelo menos 10, pelo menos 12, pelo menos 14, pelo menos 16, pelo menos 18 ou 20 nucleobases contíguas complementares a uma porção de tamanho igual de nucleobases 1.062 a 1.090 de SEQ ID NO: 1. O dito oligonucleotídeo modificado pode compreender uma sequência de nucleobases pelo menos 80 %, pelo menos 85 %, pelo menos 90 %, pelo menos 95 %, pelo menos 96 %, pelo menos 97 %, pelo menos 98 %, ou pelo menos 99 % complementar a uma porção de tamanho igual de SEQ ID NO: 1. O dito oligonucleotídeo modificado pode compreender uma sequência de nucleobases 100 % complementar a uma porção de tamanho igual de SEQ ID NO: 1. O dito oligonucleotídeo modificado pode atingir pelo menos 60 % de inibição dos níveis de RNAm humano da maneira determinada usando um método de ensaio de RT-PCR, opcionalmente em células HepG2 (por exemplo, da maneira descrita no exemplo 3).

[00128] Em certas modalidades, a invenção fornece um composto compreendendo um oligonucleotídeo modificado que compreende uma sequência de nucleobases complementar a pelo menos uma porção de nucleobases 1.062 a 1.091 de SEQ ID NO: 1. O dito oligonucleotídeo modificado pode compreender pelo menos 8, pelo menos 10, pelo menos 12, pelo menos 14, pelo menos 16, pelo menos 18 ou 20 nucleobases contíguas complementares a uma porção de tamanho igual de nucleobases 1.062 a 1.091 de SEQ ID NO: 1. O dito oligonucleotídeo modificado pode compreender uma sequência de nucleobases pelo menos 80 %, pelo menos 85 %, pelo menos 90 %, pelo menos 95 %, pelo menos 96 %, pelo menos 97 %, pelo menos 98 %, ou pelo menos 99 % complementar a uma porção de tamanho igual

de SEQ ID NO: 1. O dito oligonucleotídeo modificado pode compreender uma sequência de nucleobases 100 % complementar a uma porção de tamanho igual de SEQ ID NO: 1. O dito oligonucleotídeo modificado pode atingir pelo menos 20 % de inibição dos níveis de RNAm humano da maneira determinada usando um método de ensaio de RT-PCR, opcionalmente em células HepG2 (por exemplo, da maneira descrita no exemplo 3).

[00129] Em certas modalidades, a invenção fornece um composto compreendendo um oligonucleotídeo modificado que compreende uma sequência de nucleobases complementar a pelo menos uma porção de nucleobases 1.275 a 1.301 de SEQ ID NO: 1. O dito oligonucleotídeo modificado pode compreender pelo menos 8, pelo menos 10, pelo menos 12, pelo menos 14, pelo menos 16, pelo menos 18 ou 20 nucleobases contíguas complementares a uma porção de tamanho igual de nucleobases 1.062 a 1.091 de SEQ ID NO: 1. O dito oligonucleotídeo modificado pode compreender uma sequência de nucleobases pelo menos 80 %, pelo menos 85 %, pelo menos 90 %, pelo menos 95 %, pelo menos 96 %, pelo menos 97 %, pelo menos 98 %, ou pelo menos 99 % complementar a uma porção de tamanho igual de SEQ ID NO: 1. O dito oligonucleotídeo modificado pode compreender uma sequência de nucleobases 100 % complementar a uma porção de tamanho igual de SEQ ID NO: 1. O dito oligonucleotídeo modificado pode atingir pelo menos 80 % de inibição dos níveis de RNAm humano da maneira determinada usando um método de ensaio de RT-PCR, opcionalmente em células HepG2 (por exemplo, da maneira descrita no exemplo 3).

[00130] Em certas modalidades, a invenção fornece um composto compreendendo um oligonucleotídeo modificado que compreende uma sequência de nucleobases complementar a pelo menos uma porção de nucleobases 1.276 a 1.301 de SEQ ID NO: 1. O dito

oligonucleotídeo modificado pode compreender pelo menos 8, pelo menos 10, pelo menos 12, pelo menos 14, pelo menos 16, pelo menos 18 ou 20 nucleobases contíguas complementares a uma porção de tamanho igual de nucleobases 1.062 a 1.091 de SEQ ID NO: 1. O dito oligonucleotídeo modificado pode compreender uma sequência de nucleobases pelo menos 80 %, pelo menos 85 %, pelo menos 90 %, pelo menos 95 %, pelo menos 96 %, pelo menos 97 %, pelo menos 98 %, ou pelo menos 99 % complementar a uma porção de tamanho igual de SEQ ID NO: 1. O dito oligonucleotídeo modificado pode compreender uma sequência de nucleobases 100 % complementar a uma porção de tamanho igual de SEQ ID NO: 1. O dito oligonucleotídeo modificado pode atingir pelo menos 80 % de inibição dos níveis de RNAm humano da maneira determinada usando um método de ensaio de RT-PCR, opcionalmente em células HepG2 (por exemplo, da maneira descrita no exemplo 30).

[00131] Em certas modalidades, a invenção fornece um composto compreendendo um oligonucleotídeo modificado que compreende uma sequência de nucleobases complementar a pelo menos uma porção de nucleobases 1.284 a 1.308 de SEQ ID NO: 1. O dito oligonucleotídeo modificado pode compreender pelo menos 8, pelo menos 10, pelo menos 12, pelo menos 14, pelo menos 16, pelo menos 18 ou 20 nucleobases contíguas complementares a uma porção de tamanho igual de nucleobases 1.062 a 1.091 de SEQ ID NO: 1. O dito oligonucleotídeo modificado pode compreender uma sequência de nucleobases pelo menos 80 %, pelo menos 85 %, pelo menos 90 %, pelo menos 95 %, pelo menos 96 %, pelo menos 97 %, pelo menos 98 %, ou pelo menos 99 % complementar a uma porção de tamanho igual de SEQ ID NO: 1. O dito oligonucleotídeo modificado pode compreender uma sequência de nucleobases 100 % complementar a uma porção de tamanho igual de SEQ ID NO: 1. O dito



oligonucleotídeo modificado pode atingir pelo menos 80 % de inibição dos níveis de RNAm humano da maneira determinada usando um método de ensaio de RT-PCR, opcionalmente em células HepG2 (por exemplo, da maneira descrita no exemplo 3).

[00132] Em certas modalidades, a invenção fornece um composto compreendendo um oligonucleotídeo modificado que compreende uma sequência de nucleobases complementar a pelo menos uma porção de nucleobases 1.291 a 1.317 de SEQ ID NO: 1. O dito oligonucleotídeo modificado pode compreender pelo menos 8, pelo menos 10, pelo menos 12, pelo menos 14, pelo menos 16, pelo menos 18 ou 20 nucleobases contíguas complementares a uma porção de tamanho igual de nucleobases 1.062 a 1.091 de SEQ ID NO: 1. O dito oligonucleotídeo modificado pode compreender uma sequência de nucleobases pelo menos 80 %, pelo menos 85 %, pelo menos 90 %, pelo menos 95 %, pelo menos 96 %, pelo menos 97 %, pelo menos 98 %, ou pelo menos 99 % complementar a uma porção de tamanho igual de SEQ ID NO: 1. O dito oligonucleotídeo modificado pode compreender uma sequência de nucleobases 100 % complementar a uma porção de tamanho igual de SEQ ID NO: 1. O dito oligonucleotídeo modificado pode atingir pelo menos 80 % de inibição dos níveis de RNAm humano da maneira determinada usando um método de ensaio de RT-PCR, opcionalmente em células HepG2 (por exemplo, da maneira descrita no exemplo 3).

[00133] Em certas modalidades, a invenção fornece um composto compreendendo um oligonucleotídeo modificado que compreende uma sequência de nucleobases complementar a pelo menos uma porção de nucleobases 1.275 a 1.318 de SEQ ID NO: 1. O dito oligonucleotídeo modificado pode compreender pelo menos 8, pelo menos 10, pelo menos 12, pelo menos 14, pelo menos 16, pelo menos 18 ou 20 nucleobases contíguas complementares a uma porção de

tamanho igual de nucleobases 1.275 a 1.318 de SEQ ID NO: 1. O dito oligonucleotídeo modificado pode compreender uma sequência de nucleobases pelo menos 80 %, pelo menos 85 %, pelo menos 90 %, pelo menos 95 %, pelo menos 96 %, pelo menos 97 %, pelo menos 98 %, ou pelo menos 99 % complementar a uma porção de tamanho igual de SEQ ID NO: 1. O dito oligonucleotídeo modificado pode compreender uma sequência de nucleobases 100 % complementar a uma porção de tamanho igual de SEQ ID NO: 1. O dito oligonucleotídeo modificado pode atingir pelo menos 70 % de inibição dos níveis de RNAm humano da maneira determinada usando um método de ensaio de RT-PCR, opcionalmente em células HepG2 (por exemplo, da maneira descrita no exemplo 3).

[00134] As modalidades da presente invenção fornecem compostos compreendendo um oligonucleotídeo modificado que consiste em 12 a 30 nucleosídeos ligados e com uma sequência de nucleobases compreendendo pelo menos 8, pelo menos 10, pelo menos 12, pelo menos 14, pelo menos 16, pelo menos 18, ou 20 nucleobases contíguas de uma sequência de nucleobases selecionadas entre as sequências de nucleobases citadas em SEQ ID NOs: 15 a 241.

[00135] As modalidades da presente invenção fornecem compostos compreendendo um oligonucleotídeo modificado que consiste em 12 a 30 nucleosídeos ligados e com uma sequência de nucleobases compreendendo pelo menos 8, pelo menos 10, pelo menos 12, pelo menos 14, pelo menos 16, pelo menos 18, ou 20 nucleobases contíguas de uma sequência de nucleobases selecionadas entre as sequências de nucleobases citadas em SEQ ID NOs: 15 a 269.

[00136] As modalidades da presente invenção fornecem compostos compreendendo um oligonucleotídeo modificado que consiste em 12 a 30 nucleosídeos ligados e com uma sequência de nucleobases compreendendo pelo menos 8, pelo menos 10, pelo menos 12, pelo

menos 14, pelo menos 16, pelo menos 18, ou 20 nucleobases contíguas de uma sequência de nucleobases selecionadas entre as sequências de nucleobases citadas em SEQ ID NOs: 242 a 269.

[00137] Em certas modalidades, o oligonucleotídeo modificado compreende pelo menos 8, pelo menos 10, pelo menos 12, pelo menos 14, pelo menos 16, ou pelo menos 18 nucleobases de uma sequência de nucleobases selecionadas de No ISISs: 22, 31, 32, 34, 36 a 38, 40, 41, 43, 51to 53, 55, 56, 59, 60, 64, 66, 71, 73, 75, 96, 98 to 103, 105 a 109, 113 to 117, 119, 124, 127, 129, 171, 172, 174, 176, 178, 179, 181 to 197, 199 to 211, e 213 a 232. Em certas modalidades, o oligonucleotídeo modificado compreende uma sequência de nucleobases selecionadas de SEQ ID NOs: 22, 31, 32, 34, 36 a 38, 40, 41, 43, 51 a 53, 55, 56, 59, 60, 64, 66, 71, 73, 75, 96, 98 a 103, 105 a 109, 113 a 117, 119, 124, 127, 129, 171, 172, 174, 176, 178, 179, 181 a 197, 199 a 211, e 213 a 232. Em certas modalidades, o oligonucleotídeo modificado consiste em uma sequência de nucleobases selecionadas de SEQ ID NOs: 22, 31, 32, 34, 36 a 38, 40, 41, 43, 51 a 53, 55, 56, 59, 60, 64, 66, 71, 73, 75, 96, 98 a 103, 105 a 109, 113 a 117, 119, 124, 127, 129, 171, 172, 174, 176, 178, 179, 181 a 197, 199 a 211, e 213 a 232. O dito oligonucleotídeo modificado pode atingir pelo menos 70 % de inibição dos níveis de RNAm humano da maneira determinada usando um método de ensaio de RT-PCR, opcionalmente em células HepG2 (por exemplo, da maneira descrita no exemplo 3).

[00138] Em certas modalidades, o oligonucleotídeo modificado compreende pelo menos 8, pelo menos 10, pelo menos 12, pelo menos 14, pelo menos 16, ou pelo menos 18 nucleobases de uma sequência de nucleobases selecionadas de No ISISs: 22, 31, 34, 37, 40, 43, 51 a 53, 60, 98, 100 a 102, 105 a 109, 114, 115, 119, 171, 174, 176, 179, 181, 186, 188 a 193, 195, 196, 199 a 210, e 213 a 232. Em

certas modalidades, o oligonucleotídeo modificado compreende uma sequência de nucleobases selecionadas de SEQ ID NOs: 22, 31, 34, 37, 40, 43, 51 a 53, 60, 98, 100 a 102, 105 a 109, 114, 115, 119, 171, 174, 176, 179, 181, 186, 188 a 193, 195, 196, 199 a 210, e 213 a 232. Em certas modalidades, o oligonucleotídeo modificado consiste em uma sequência de nucleobases selecionadas de SEQ ID NOs: 22, 31, 34, 37, 40, 43, 51 a 53, 60, 98, 100 a 102, 105 a 109, 114, 115, 119, 171, 174, 176, 179, 181, 186, 188 a 193, 195, 196, 199 a 210, e 213 a 232. O dito oligonucleotídeo modificado pode atingir pelo menos 80 % de inibição dos níveis de RNAm humano da maneira determinada usando um método de ensaio de RT-PCR, opcionalmente em células HepG2 (por exemplo, da maneira descrita no exemplo 3).

[00139] Em certas modalidades, o oligonucleotídeo modificado compreende pelo menos 8, pelo menos 10, pelo menos 12, pelo menos 14, pelo menos 16, ou pelo menos 18 nucleobases de uma sequência de nucleobases selecionadas de No ISISs: 31, 37, 100, 105, 179, 190 a 193, 196, 202 a 207, 209, 210, 214 a 219, 221 a 224, 226, 227, 229 e 231. Em certas modalidades, o oligonucleotídeo modificado compreende uma sequência de nucleobases selecionadas de SEQ ID NOs: 31, 37, 100, 105, 179, 190 a 193, 196, 202 a 207, 209, 210, 214 a 219, 221 a 224, 226, 227, 229 e 231. Em certas modalidades, o oligonucleotídeo modificado consiste em uma sequência de nucleobases selecionadas de SEQ ID NOs: 31, 37, 100, 105, 179, 190 a 193, 196, 202 a 207, 209, 210, 214 a 219, 221 a 224, 226, 227, 229 e 231. O dito oligonucleotídeo modificado pode atingir pelo menos 90 % de inibição dos níveis de RNAm humano da maneira determinada usando um método de ensaio de RT-PCR, opcionalmente em células HepG2 (por exemplo, da maneira descrita no exemplo 3).

[00140] Em certas modalidades, o oligonucleotídeo modificado compreende pelo menos 8, pelo menos 10, pelo menos 12, pelo

menos 14, pelo menos 16, ou pelo menos 18 nucleobases de uma sequência de nucleobases selecionadas de SEQ ID NOs: 34, 52, 53, 114, 115, 190, 213 a 232, 242 a 260, e 262 a 266. Em certas modalidades, o oligonucleotídeo modificado compreende uma sequência de nucleobases selecionadas de SEQ ID NOs: 34, 52, 53, 114, 115, 190, 213 a 232, 242 a 260, e 262 a 266. Em certas modalidades, o oligonucleotídeo modificado consiste em uma sequência de nucleobases selecionadas de SEQ ID NOs: 34, 52, 53, 114, 115, 190, 213 a 232, 242 a 260, e 262 a 266. Os ditos oligonucleotídeos modificados podem atingir pelo menos 70 % de inibição dos níveis de RNAm humano da maneira determinada usando um método de ensaio de RT-PCR, opcionalmente em células HepG2 (por exemplo, da maneira descrita no exemplo 30).

[00141] Em certas modalidades, o oligonucleotídeo modificado compreende pelo menos 8, pelo menos 10, pelo menos 12, pelo menos 14, pelo menos 16, ou pelo menos 18 nucleobases de uma sequência de nucleobases selecionadas de SEQ ID NOs: 34, 52, 53, 114, 115, 190, 213 a 216, 218 a 226, 243 a 246, 248, 249, 252 a 259, 264 e 265. Em certas modalidades, o oligonucleotídeo modificado compreende uma sequência de nucleobases selecionadas de SEQ ID NOs: 34, 52, 53, 114, 115, 190, 213 a 216, 218 a 226, 243 a 246, 248, 249, 252 a 259, 264 e 265. Em certas modalidades, o oligonucleotídeo modificado consiste em uma sequência de nucleobases selecionadas de SEQ ID NOs: 34, 52, 53, 114, 115, 190, 213 a 216, 218 a 226, 243 a 246, 248, 249, 252 a 259, 264 e 265. Os ditos oligonucleotídeos modificados podem atingir pelo menos 80 % de inibição dos níveis de RNAm humano da maneira determinada usando um método de ensaio de RT-PCR, opcionalmente em células HepG2 (por exemplo, da maneira descrita no exemplo 30).

[00142] Em certas modalidades, o oligonucleotídeo modificado

compreende pelo menos 8, pelo menos 10, pelo menos 12, pelo menos 14, pelo menos 16, ou pelo menos 18 nucleobases de uma sequência de nucleobases selecionadas de SEQ ID NOs: 34, 190, 215, 222, 223, 226, 246, e 254. Em certas modalidades, o oligonucleotídeo modificado compreende uma sequência de nucleobases selecionadas de SEQ ID NOs: 34, 190, 215, 222, 223, 226, 246, e 254. Em certas modalidades, o oligonucleotídeo modificado consiste em uma sequência de nucleobases selecionadas de SEQ ID NOs: 34, 190, 215, 222, 223, 226, 246, e 254. Os ditos oligonucleotídeos modificados podem atingir pelo menos 90 % de inibição dos níveis de RNAm humano da maneira determinada usando um método de ensaio de RT-PCR, opcionalmente em células HepG2 (por exemplo, da maneira descrita no exemplo 30).

[00143] Em certas modalidades, o composto consiste em um oligonucleotídeo modificado de fita simples.

[00144] Em certas modalidades, o oligonucleotídeo modificado consiste em 20 nucleosídeos ligados.

[00145] Em certas modalidades, a sequência de nucleobases do oligonucleotídeo modificado é 100 % complementar a uma sequência de nucleobases de SEQ ID NO: 1 ou SEQ ID NO: 2 ou SEQ ID NO: 6 ou SEQ ID NO: 274.

[00146] Em certas modalidades, o composto apresenta pelo menos uma ligação modificada entre nucleosídeos. Em certas modalidades, a ligação internucleosídeos é uma ligação internucleosídeos de fosforotioato.

[00147] Em certas modalidades, o composto apresenta pelo menos um nucleosídeo compreendendo um açúcar modificado. Em certas modalidades, o pelo menos um açúcar modificado é um açúcar bicíclico. Em certas modalidades, o pelo menos um açúcar modificado compreende um 2'-O-metoxietila.

[00148] As modalidades da presente invenção fornecem compostos compreendendo um oligonucleotídeo modificado que consiste em 12 a 30 nucleosídeos ligados e com uma sequência de nucleobases compreendendo pelo menos 8, pelo menos 10, pelo menos 12, pelo menos 14, pelo menos 16, pelo menos 18, ou 20 nucleobases contíguas de uma sequência de nucleobases selecionadas entre as sequências de nucleobases citadas em SEQ ID NOs: 15 a 241, SEQ ID NOs: 15 a 269, ou SEQ ID NOs: 242 a 269, em que pelo menos um nucleosídeo compreende um açúcar modificado.

[00149] Em certas modalidades, o dito pelo menos um açúcar modificado é um açúcar bicíclico.

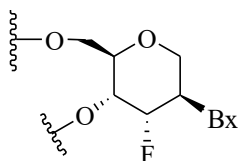
[00150] Em certas modalidades, o dito pelo menos um açúcar bicíclico compreende uma ponte 4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-O-2', em que n é 1 ou 2.

[00151] Em certas modalidades, o dito pelo menos um açúcar bicíclico compreende uma ponte 4'-CH(CH<sub>3</sub>)-O-2'.

[00152] Em certas modalidades, o dito pelo menos um açúcar modificado compreende um grupo 2'-O-metoxietila.

[00153] As modalidades da presente invenção fornecem compostos compreendendo um oligonucleotídeo modificado que consiste em 12 a 30 nucleosídeos ligados e com uma sequência de nucleobases compreendendo pelo menos 8, pelo menos 10, pelo menos 12, pelo menos 14, pelo menos 16, pelo menos 18, ou 20 nucleobases contíguas de uma sequência de nucleobases selecionadas entre as sequências de nucleobases citadas em SEQ ID NOs: 15 a 241, SEQ ID NOs: 15 a 269, ou SEQ ID NOs: 242 a 269, compreendendo pelo menos um nucleosídeo de tetraidropirano modificado, em que um anel de tetraidropirano substitui o anel furanose.

[00154] Em certas modalidades, o dito pelo menos um nucleosídeo de tetraidropirano modificado apresenta a estrutura:



[00155] Em certas modalidades, o composto apresenta pelo menos um nucleosídeo compreendendo uma nucleobase modificada. Em certas modalidades, a nucleobase modificada é uma 5-metilcitosina.

[00156] Em certas modalidades, o oligonucleotídeo modificado do composto compreende:

(i) um segmento de intervalo que consiste em desoxinucleosídeos ligados;

(ii) um segmento em asa 5' que consiste em nucleosídeos ligados;

(iii) um segmento em asa 3' que consiste em nucleosídeos ligados, em que o segmento de intervalo é posicionado imediatamente adjacente e entre o segmento em asa 5' e o segmento em asa 3', e em que cada nucleosídeo de cada segmento em asa compreende um açúcar modificado. Em algumas tais modalidades, cada citosina no oligonucleotídeo modificado é uma 5-metilcitosina.

[00157] Em certas modalidades, o oligonucleotídeo modificado do composto compreende:

(i) um segmento de intervalo que consiste em dez desoxinucleosídeos ligados;

(ii) um segmento em asa 5' que consiste em cinco nucleosídeos ligados;

(iii) um segmento em asa 3' que consiste em cinco nucleosídeos ligados, em que o segmento de intervalo é posicionado imediatamente adjacente e entre o segmento em asa 5' e o segmento em asa 3', em que cada nucleosídeo de cada segmento em asa compreende um açúcar 2'-O-metoxietila; e em que cada ligação internucleosídeos é uma ligação de fosforotioato. Em algumas tais



modalidades, cada citosina no oligonucleotídeo modificado é uma 5-metilcitosina.

[00158] Em certas modalidades, o oligonucleotídeo modificado do composto compreende:

- (i) um segmento de intervalo que consiste em quatorze desoxinucleosídeos ligados;

- (ii) um segmento em asa 5' que consiste em três nucleosídeos ligados;

- (iii) um segmento em asa 3' que consiste em três nucleosídeos ligados, em que o segmento de intervalo é posicionado imediatamente adjacente e entre o segmento em asa 5' e o segmento em asa 3', em que cada nucleosídeo de cada segmento em asa compreende um açúcar 2'-O-metoxietila; e em que cada ligação internucleosídeos é uma ligação de fosforotioato. Em algumas tais modalidades, cada citosina no oligonucleotídeo modificado é uma 5-metilcitosina.

[00159] Em certas modalidades, o oligonucleotídeo modificado do composto compreende:

- (i) um segmento de intervalo que consiste em treze desoxinucleosídeos ligados;

- (ii) um segmento em asa 5' que consiste em dois nucleosídeos ligados;

- (iii) um segmento em asa 3' que consiste em cinco nucleosídeos ligados, em que o segmento de intervalo é posicionado imediatamente adjacente e entre o segmento em asa 5' e o segmento em asa 3', em que cada nucleosídeo de cada segmento em asa compreende um açúcar 2'-O-metoxietila; e em que cada ligação internucleosídeos é uma ligação de fosforotioato. Em algumas tais modalidades, cada citosina no oligonucleotídeo modificado é uma 5-metilcitosina.

[00160] As modalidades da presente invenção fornecem uma composição compreendendo um oligonucleotídeo modificado que consiste em 12 a 30 nucleosídeos ligados e com uma sequência de nucleobases compreendendo pelo menos 12 nucleobases contíguas de uma sequência de nucleobases selecionadas entre as sequências de nucleobases citadas em SEQ ID NOs: 15 a 241 ou um sal destas e um veículo ou diluente farmacologicamente aceitável.

[00161] As modalidades da presente invenção fornecem uma composição compreendendo um oligonucleotídeo modificado que consiste em 12 a 30 nucleosídeos ligados e com uma sequência de nucleobases compreendendo pelo menos 12 nucleobases contíguas de uma sequência de nucleobases selecionadas entre as sequências de nucleobases citadas em SEQ ID NOs: 15 a 269 ou um sal destas e um veículo ou diluente farmacologicamente aceitável.

[00162] As modalidades da presente invenção fornecem uma composição compreendendo um oligonucleotídeo modificado que consiste em 12 a 30 nucleosídeos ligados e com uma sequência de nucleobases compreendendo pelo menos 12 nucleobases contíguas de uma sequência de nucleobases selecionadas entre as sequências de nucleobases citadas em SEQ ID NOs: 241 a 269 ou um sal destas e um veículo ou diluente farmacologicamente aceitável.

[00163] As modalidades da presente invenção fornecem métodos que compreendem administrar a um animal um composto compreendendo um oligonucleotídeo modificado que consiste em 12 a 30 nucleosídeos ligados e com uma sequência de nucleobases compreendendo pelo menos 8 nucleobases contíguas de uma sequência de nucleobases selecionadas entre as sequências de nucleobases citadas em SEQ ID NOs: 15 a 241.

[00164] As modalidades da presente invenção fornecem métodos que compreendem administrar a um animal um composto

compreendendo um oligonucleotídeo modificado que consiste em 12 a 30 nucleosídeos ligados e com uma sequência de nucleobases compreendendo pelo menos 8 nucleobases contíguas de uma sequência de nucleobases selecionadas entre as sequências de nucleobases citadas em SEQ ID NOs: 15 a 269.

[00165] As modalidades da presente invenção fornecem métodos que compreendem administrar a um animal um composto compreendendo um oligonucleotídeo modificado que consiste em 12 a 30 nucleosídeos ligados e com uma sequência de nucleobases compreendendo pelo menos 8 nucleobases contíguas de uma sequência de nucleobases selecionadas entre as sequências de nucleobases citadas em SEQ ID NOs: 241 a 269.

[00166] Em certas modalidades, o animal é um humano.

[00167] Em certas modalidades, a administração previne trombose venosa profunda ou embolia pulmonar.

[00168] Em certas modalidades, o composto é co-administrado com qualquer um do grupo selecionado de aspirina, clopidogrel, dipiridamol, heparina, lepirudina, ticlopidina, varfarina, apixaban, rivaroxaban e LOVENOX.

[00169] Em certas modalidades, o composto é co-administrado com qualquer inibidor do fator Xa.

[00170] Em certa modalidade, o inibidor do fator Xa é qualquer um de Rivaroxaban, LY517717, YM150, apixaban, PRT054021 e DU-176b.

[00171] Em certas modalidades, o composto é administrado ao mesmo tempo com qualquer um do grupo selecionado de aspirina, clopidogrel, dipiridamol, heparina, lepirudina, ticlopidina, varfarina, apixaban, rivaroxaban, e LOVENOX que são administrados ao mesmo tempo.

[00172] Em certas modalidades, a administração é administração

parenteral. Em certas modalidades, a administração parenteral é qualquer uma de administração subcutânea ou intravenosa.

[00173] As modalidades da presente invenção fornecem métodos que compreendem identificar um animal em risco de desenvolver complicações tromboembolíticas e administrar no animal em risco uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto compreendendo um oligonucleotídeo modificado que consiste em 12 a 30 nucleosídeos ligados, em que o oligonucleotídeo modificado é complementar a um ácido nucleico do fator 11.

[00174] Em certas modalidades, a complicação tromboembolítica é trombose venosa profunda, embolia pulmonar, ou uma combinação destas.

[00175] As modalidades da presente invenção fornecem métodos que compreendem identificar um animal com um distúrbio de coagulação administrando ao animal uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto compreendendo um oligonucleotídeo modificado que consiste em 12 a 30 nucleosídeos ligados, em que o oligonucleotídeo modificado é complementar a um ácido nucleico do fator 11.

[00176] Em certas modalidades, o composto é co-administrado com qualquer um do grupo selecionado de aspirina, clopidogrel, dipiridamol, heparina, lepirudina, ticlopidina, varfarina, apixaban, rivaroxaban e LOVENOX.

[00177] Em certas modalidades, o composto é administrado ao mesmo tempo com qualquer um do grupo selecionado de aspirina, clopidogrel, dipiridamol, heparina, lepirudina, ticlopidina, varfarina, apixaban, rivaroxaban, e LOVENOX que são administrados ao mesmo tempo.

[00178] As modalidades da presente invenção fornecem métodos que compreendem reduzir o risco de complicações tromboembolíticas

em um animal administrando ao animal uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto compreendendo um oligonucleotídeo modificado que consiste em 12 a 30 nucleosídeos ligados, em que o oligonucleotídeo modificado é complementar a um ácido nucleico do fator 11.

[00179] As modalidades da presente invenção fornecem métodos que compreendem tratar um distúrbio de coagulação em um animal administrando ao animal uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto compreendendo um oligonucleotídeo modificado que consiste em 12 a 30 nucleosídeos ligados, em que o oligonucleotídeo modificado é complementar a um ácido nucleico do fator 11.

[00180] As modalidades da presente invenção fornecem métodos que compreendem inibir a expressão do fator 11 em um animal, administrando ao animal uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto compreendendo um oligonucleotídeo modificado que consiste em 12 a 30 nucleosídeos ligados, em que o oligonucleotídeo modificado é complementar a um ácido nucleico do fator 11.

[00181] Em certas modalidades, a inibição do fator 11 no animal é revertida administrando um antídoto para o oligonucleotídeo modificado.

[00182] Em certas modalidades, o antídoto é um oligonucleotídeo complementar ao oligonucleotídeo modificado.

#### Compostos anti-sentido

[00183] Os composto oligoméricos incluem, mas sem limitação, oligonucleotídeos, oligonucleosídeos, análogos de oligonucleotídeo, miméticos de oligonucleotídeo, compostos anti-sentido, oligonucleotídeos anti-sentido, e RNAssi. Um composto oligomérico pode ser “anti-sentido” a um ácido nucleico alvo, o que significa que é capaz de se submeter à hibridização em um ácido nucleico alvo por meio da ligação de hidrogênio.

[00184] Em certas modalidades, um composto anti-sentido apresenta uma sequência de nucleobases que, quando escrita na direção 5' para 3', compreende o complemento reverso do segmento alvo de um ácido nucleico alvo no qual é alvejado. Em certas tais modalidades, um oligonucleotídeo anti-sentido apresenta uma sequência de nucleobases que, quando escrita na direção 5' para 3', compreende o complemento reverso do segmento alvo de um ácido nucleico alvo no qual é alvejado.

[00185] Em certas modalidades, um composto anti-sentido alvejado em um ácido nucleico do fator 11 apresenta 12 a 30 subunidades de comprimento. Em outras palavras, tais compostos anti-sentido apresentam de 12 a 30 subunidades ligadas. Em outras modalidades, o composto anti-sentido apresenta 8 a 80, 12 a 50, 15 a 30, 18 a 24, 19 a 22, ou 20 subunidades ligadas. Em certas tais modalidades, os compostos anti-sentido apresentam 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, ou 80 subunidades ligadas de comprimento, ou uma faixa definida por quaisquer dos valores anteriores. Em algumas modalidades, o composto anti-sentido é um oligonucleotídeo anti-sentido, e as subunidades ligadas são nucleotídeos.

[00186] Em certas modalidades, os oligonucleotídeos anti-sentido alvejados em um ácido nucleico do fator 11 podem ser encurtados ou truncados. Por exemplo, uma subunidade simples pode ser deletada da extremidade 5' (truncação 5'), ou alternativamente da extremidade 3' (truncação 3'). Um composto anti-sentido encurtado ou truncado alvejado em um ácido nucleico do fator 11 pode apresentar duas subunidades deletadas da extremidade 5' ou, alternativamente pode apresentar duas subunidades deletadas da extremidade 3', do

composto anti-sentido. Alternativamente, os nucleosídeos deletados podem ser dispersos em todo o composto anti-sentido, por exemplo, em um composto anti-sentido com um nucleosídeo deletado da extremidade 5' e um nucleosídeo deletado da extremidade 3'.

[00187] Quando uma subunidade adicional simples está presente em um composto anti-sentido aumentado, a subunidade adicional pode estar localizada na extremidade 5' ou 3' do composto anti-sentido. Quando duas ou mais subunidades adicionais estão presentes, as subunidades adicionadas podem ser adjacentes umas as outras, por exemplo, em um composto anti-sentido com duas subunidades adicionadas na extremidade 5' (adição 5'), ou alternativamente na extremidade 3' (adição 3'), do composto anti-sentido. Alternativamente, as subunidades adicionadas podem ser dispersas em todo o composto anti-sentido, por exemplo, em um composto anti-sentido com uma subunidade adicionada na extremidade 5' e uma subunidade adicionada na extremidade 3'.

[00188] É possível aumentar ou diminuir o tamanho de um composto anti-sentido, tal como um oligonucleotídeo anti-sentido, e/ou introduzir bases de incompatibilidade sem eliminar a atividade. Por exemplo, em Woolf et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7305-7309, 1992), uma série de oligonucleotídeos anti-sentido com 13-25 nucleobases de comprimento foi testada com relação à sua capacidade de induzir a clivagem de um RNA alvo em um modelo de injeção de oócito. Os oligonucleotídeos anti-sentido com 25 nucleobases de comprimento com 8 ou 11 bases de incompatibilidade próximas às extremidades dos oligonucleotídeos anti-sentido foram capazes de direcionar a clivagem específica do RNAm alvo, embora em um grau menor que os oligonucleotídeos anti-sentido que não continham incompatibilidades. De maneira similar, a clivagem específica alvo foi atingida usando oligonucleotídeos anti-sentido com

13 nucleobases, incluindo aqueles com 1 ou 3 incompatibilidades.

[00189] Gautschi et al (J. Natl. Câncer Inst. 93:463-471, março de 2001) demonstraram a capacidade de um oligonucleotídeo com 100 % de complementaridade com o bcl-2 RNAm e com 3 incompatibilidades com o bcl-xL RNAm para reduzir a expressão tanto de bcl-2 quanto bcl-xL *in vitro* e *in vivo*. Além do mais, este oligonucleotídeo demonstrou potente atividade anti-tumor atividade *in vivo*.

[00190] Maher e Dolnick (Nuc. Acid. Res. 16:3341-3358,1988) testaram uma série de oligonucleotídeos anti-sentido com 14 nucleobases em tandem, e oligonucleotídeos anti-sentido com 28 e 42 nucleobases compreendidos da sequência de dois ou três dos oligonucleotídeos anti-sentido em tandem, respectivamente, com relação à sua capacidade de interromper a tradução de DHFR humano em um ensaio de reticulócito de coelho. Cada um dos três oligonucleotídeos anti-sentido com 14 nucleobases sozinho foi capaz de inibir a tradução, embora em um nível mais modesto que os oligonucleotídeos anti-sentido com 28 ou 42 nucleobases.

#### Motivos de composto anti-sentido

[00191] Em certas modalidades, os compostos anti-sentido alvejados em um ácido nucleico do fator 11 apresentaram subunidades quimicamente modificadas arranjadas em padrões, ou motivos, para conferir aos compostos anti-sentido propriedades tais como a melhor atividade inibitória, maior afinidade de ligação com relação a um ácido nucleico alvo, ou resistência à degradação por nucleases *in vivo*.

[00192] Os compostos anti-sentido quiméricos contêm tipicamente pelo menos uma região modificada de maneira a conferir maior resistência à degradação da nuclease, maior absorção celular, maior afinidade de ligação com relação ao ácido nucleico alvo, e/ou maior atividade inibitória. Uma segunda região de um composto anti-sentido



quimérico funcionar opcionalmente como um substrato para a endonuclease celular RNase H, que cliva a fita de RNA de um duplex RNA:DNA.

[00193] Os compostos anti-sentido com um motivo Gap-mer são considerados compostos anti-sentido quiméricos. Em um Gap-mer, uma região interna com uma pluralidade de nucleotídeos que auxilia a clivagem de RNaseH está posicionada entre as regiões externas com uma pluralidade de nucleotídeos que são quimicamente distintos dos nucleosídeos da região interna. No caso de um oligonucleotídeo anti-sentido com um motivo Gap-mer, o segmento de intervalo funciona, em geral, como o substrato para clivagem de endonuclease, enquanto os segmentos em asa compreendem nucleosídeos modificados. Em certas modalidades, as regiões de um Gap-mer são diferenciadas pelos tipos de frações de açúcar compreendendo cada região distinta. Os tipos de frações de açúcar que são usados para diferenciar as regiões de um Gap-mer podem, em algumas modalidades, incluir  $\beta$ -D-ribonucleosídeos,  $\beta$ -D-desoxirribonucleosídeos, 2'-nucleosídeos modificados (tais 2'-nucleosídeos modificados podem incluir 2'-MOE, e 2'-O-CH<sub>3</sub>, entre outros) e nucleosídeos modificados de açúcar bicíclico (tais nucleosídeos modificados de açúcar bicíclico podem incluir aqueles com uma ponte 4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-O-2', onde n=1 ou n=2). Preferivelmente, cada região distinta compreende frações uniformes de açúcar. O motivo asa-intervalo-asa é descrito com frequência como "X-Y-Z", onde "X" representa o tamanho da região em asa 5', "Y" representa o tamanho da região de intervalo, e "Z" representa o tamanho da região em asa 3'. Da maneira aqui usada, um Gap-mer descrito como "X-Y-Z" apresenta uma configuração de maneira tal que o segmento de intervalo esteja posicionado imediatamente adjacente a cada um do segmento em asa 5' e do segmento em asa 3'. Assim, não existem nucleotídeos de intervenção entre o segmento em asa 5' e o

segmento de intervalo, ou o segmento de intervalo e o segmento em asa 3'. Quaisquer dos compostos anti-sentido aqui descritos podem apresentar um motivo Gap-mer. Em algumas modalidades, X e Z são os mesmos, em outras modalidades, são diferentes. Em uma modalidade preferida, Y apresenta entre 8 e 15 nucleotídeos. X, Y ou Z pode apresentar de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30 ou mais nucleotídeos. Assim, os Gap-mers da presente invenção incluem, mas sem limitação, por exemplo, 5-10-5, 4-8-4, 4-12-3, 4-12-4, 3-14-3, 2-13-5, 2-16-2, 1-18-1, 3-10-3, 2-10-2, 1-10-1, 2-8-2, 5-8-5, ou 6-8-6.

[00194] Em certas modalidades, o composto anti-sentido apresenta um motivo "wingmer", com uma configuração asa-intervalo ou intervalo-asa, isto é, uma configuração X-Y ou Y-Z, da maneira descrita anteriormente para a configuração Gap-mer. Assim, as configurações do tipo wingmer da presente invenção incluem, mas sem limitação, por exemplo 5-10, 8-4, 4-12, 12-4, 3-14, 16-2, 18-1, 10-3, 2-10, 1-10, 8-2, 2-13, 5-13, 5-8, ou 6-8.

[00195] Em certas modalidades, os compostos anti-sentido alvejados em um ácido nucleico do fator 11 possuem um motivo Gap-mer 5-10-5.

[00196] Em certas modalidades, os compostos anti-sentido alvejados em um ácido nucleico do fator 11 possuem um motivo Gap-mer 3-14-3.

[00197] Em certas modalidades, os compostos anti-sentido alvejados em um ácido nucleico do fator 11 possuem um motivo Gap-mer 2-13-5.

[00198] Em certas modalidades, os compostos anti-sentido alvejados em um ácido nucleico do fator 11 possuem um motivo Gap-mer 5-8-5.

[00199] Em certas modalidades, os compostos anti-sentido

alvejados em um ácido nucleico do fator 11 possuem um motivo Gap-mer 6-8-6.

[00200] Em certas modalidades, um composto anti-sentido alvejado em um ácido nucleico do fator 11 apresenta um motivo maior em intervalo.

[00201] Em certas modalidades, um oligonucleotídeo anti-sentido maior em intervalo alvejado em um ácido nucleico do fator 11 apresenta um segmento de intervalo de quatorze 2'-desoxirribonucleotídeos posicionados imediatamente adjacente e entre segmentos em asa de três nucleosídeos quimicamente modificados. Em certas modalidades, a modificação química compreende uma modificação 2'-açúcar. Em uma outra modalidade, a modificação química compreende uma modificação 2'-açúcar MOE.

[00202] Em certas modalidades, um oligonucleotídeo anti-sentido maior em intervalo alvejado em um ácido nucleico do fator 11 apresenta um segmento de intervalo de treze 2'-desoxirribonucleotídeos posicionados imediatamente adjacente e entre um segmento em asa 5' de dois nucleosídeos quimicamente modificados e um segmento em asa 3' de cinco nucleosídeos quimicamente modificados. Em certas modalidades, a modificação química compreende uma modificação 2'-açúcar. Em uma outra modalidade, a modificação química compreende uma modificação 2'-açúcar MOE.

Ácidos nucleicos alvos, regiões e sequências de nucleotídeos alvos

[00203] As sequências de nucleotídeos que codificam o fator 11 incluem, sem limitação, o seguinte: acesso ao GENBANK No. NM\_000128.3, depositada primeiro no GENBANK em 24 de março de 1999, aqui incorporada como SEQ ID NO: 1; NT\_022792.17, truncada de 19598000 a 19624000, depositada primeiro no GENBANK em 29 de novembro de 2000, e aqui incorporada como SEQ ID NO: 2; acesso

ao GENBANK No. NM\_028066.1, depositada primeiro no GENBANK em 2 de junho de 2002, aqui incorporada como SEQ ID NO: 6; e exons 1-15 do acesso ao GENBANK No. NW\_001118167.1, depositados primeiro no GENBANK em 28 de março de 2006, aqui incorporados como SEQ ID NO: 274.

[00204] Entende-se que a sequência apresentada em cada SEQ ID NO nos exemplos aqui contidos é independente de qualquer modificação em uma fração de açúcar, uma ligação internucleosídeos, ou uma nucleobase. Com tal, os compostos anti-sentido definidos por uma SEQ ID NO pode compreender, independentemente, um ou mais modificações em uma fração de açúcar, uma ligação internucleosídeos, ou uma nucleobase. Os compostos anti-sentido descritos pelo número Isis (No ISIS) indicam uma combinação de sequência de nucleobases e motivo.

[00205] Em certas modalidades, uma região alvo é uma região estruturalmente definida do ácido nucleico alvo. Por exemplo, uma região alvo pode incluir uma UTR 3', uma UTR 5', um exon, um intron, uma junção exon/intron, uma região codificante, uma região de início de tradução, região de final de tradução ou outra região de ácido nucleico definido. As regiões estruturalmente definidas para o fator 11 podem ser obtidas pelo número de acesso de bases de dados de sequência, tal como NCBI, e tal informação é aqui incorporada pela referência. Em certas modalidades, uma região alvo pode incluir a sequência a partir de um sítio alvo 5' de um segmento alvo na região alvo para um sítio alvo 3' de um outro segmento alvo na mesma região alvo.

[00206] Alvejar inclui a determinação de pelo menos um segmento alvo no qual um composto anti-sentido hibridiza, de maneira tal que um efeito desejado ocorra. Em certas modalidades, o efeito desejado é uma redução nos níveis de ácido nucleico alvo de RNAm. Em certas

modalidades, o efeito desejado é redução de níveis de proteína codificados pelo ácido nucleico alvo ou uma mudança fenotípica associada com o ácido nucleico alvo.

[00207] Uma região alvo pode conter um ou mais segmentos alvos. Múltiplos segmentos alvos em uma região alvo podem ser sobrepostos. Alternativamente, pode ser não sobrepostos. Em certas modalidades, os segmentos alvos em uma região alvo são separados por não mais que cerca de 300 nucleotídeos. Em certas modalidades, os segmentos alvos em uma região alvo são separados por inúmeros nucleotídeos, isto é, apresenta cerca de, apresenta não mais que, apresenta não mais que cerca de 250, 200, 150, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, ou 10 nucleotídeos no ácido nucleico alvo, ou apresenta uma faixa definida por qualquer de dois dos valores precedentes. Em certas modalidades, os segmentos alvos em uma região alvo são separados por não mais que, ou não mais que cerca de, 5 nucleotídeos no ácido nucleico alvo. Em certas modalidades, os segmentos alvos são contíguos. São contempladas regiões alvo definidas por uma faixa com um ácido nucleico inicial que é qualquer um dos sítios alvos 5' ou sítios alvos 3' aqui listados.

[00208] Os segmentos alvos adequados podem ser observados em uma UTR 5', uma região codificante, uma UTR 3', um intron, um exon ou uma junção exon/intron. Os segmentos alvos contendo um códon inicial ou um códon de parada são também os segmentos alvos adequados. Um segmento alvo adequado pode excluir especificamente uma certa região estruturalmente definida, tal como o códon inicial ou o códon de parada.

[00209] A determinação dos segmentos alvos adequados pode incluir uma comparação da sequência de um ácido nucleico alvo com outras sequências em todo o genoma. Por exemplo, o algoritmo BLAST pode ser usado para identificar regiões de similaridade entre

os diferentes ácidos nucleicos. Esta comparação pode prevenir a seleção das sequências do composto anti-sentido que podem hibridizar de uma maneira não específica nas sequências sem ser um ácido nucleico alvo selecionado (isto é, sequências não alvo ou fora do alvo).

[00210] Pode existir variação na atividade (por exemplo, da maneira definida por redução percentual de níveis de ácido nucleico alvo) dos compostos anti-sentido em uma região alvo ativa. Em certas modalidades, as reduções nos níveis de RNAm do fator 11 são indicativas de inibição da expressão do fator 11. As reduções em níveis de uma proteína do fator 11 são também indicativas de inibição da expressão do RNAm alvo. Adicionalmente, mudanças fenotípicas são indicativas de inibição da expressão do fator 11. Por exemplo, um período prolongado de aPTT pode ser indicativo de inibição da expressão do fator 11. Em um outro exemplo, período prolongado de aPTT junto com um período normal de PT pode ser indicativo de inibição da expressão do fator 11. Em um outro exemplo, uma menor quantidade de fator plaquetário (PF-4) pode ser indicativa de inibição da expressão do fator 11. Em um outro exemplo, menor formação de trombo ou aumento do tempo para a formação do trombo pode ser indicativo de inibição da expressão do fator 11.

#### Hibridização

[00211] Em algumas modalidades a hibridização ocorre entre um composto anti-sentido aqui revelado e um ácido nucleico do fator 11. O mecanismo de hibridização mais comum envolve a ligação de hidrogênio (por exemplo, ligação de hidrogênio de Watson-Crick, Hoogsteen ou Hoogsteen reversa) entre nucleobases complementares das moléculas de ácido nucleico.

[00212] A hibridização pode ocorrer em condições variadas. As condições severas são dependentes de sequência e são determinadas

pela natureza e composição das moléculas de ácido nucleico a serem hibridizadas.

[00213] Os métodos de determinar se uma sequência é especificamente hibridizável em um ácido nucleico alvo são bem conhecidos na técnica. Em certas modalidades, os compostos anti-sentido aqui fornecidos são especificamente hibridizáveis com um ácido nucleico do fator 11.

#### Complementaridade

[00214] Um composto anti-sentido e um ácido nucleico alvo são complementares um ao outro quando um número suficiente de nucleobases do composto anti-sentido podem hidrogenar a ligação com as nucleobases correspondentes do ácido nucleico alvo, de maneira tal que um efeito desejado ocorra (por exemplo, a inibição anti-sentido de um ácido nucleico alvo, tal como um ácido nucleico do fator 11).

[00215] As nucleobases não complementares entre um composto anti-sentido e um ácido nucleico do fator 11 podem ser toleradas, contanto que o composto anti-sentido permaneça capaz de hibridizar especificamente em um ácido nucleico alvo. Além do mais, um composto anti-sentido pode hibridizar em um ou mais segmentos de um ácido nucleico do fator 11, de maneira tal que segmentos de intervenção ou adjacentes não estejam envolvidos no evento de hibridização (por exemplo, uma estrutura em alça, estrutura de incompatibilidade ou em grampo).

[00216] Em certas modalidades, os compostos anti-sentido aqui fornecidos, ou uma porção especificada destes, são, ou são pelo menos, 70 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, ou 100 % complementares a um ácido nucleico do fator 11, uma região alvo, segmento alvo, ou porção especificada destes. A complementaridade

percentual de um composto anti-sentido com um ácido nucleico alvo pode ser determinada usando métodos de rotina.

[00217] Por exemplo, um composto anti-sentido no qual 18 de 20 nucleobases do composto anti-sentido são complementares a uma região alvo e, portanto, hibridizariam especificamente, representariam complementaridade percentual de 90. Neste exemplo, o restante das nucleobases não complementares pode ser agrupado ou intercalado com nucleobases complementares e não precisam ser contíguas umas às outras ou às nucleobases complementares. Como tal, um composto anti-sentido que apresenta 18 nucleobases de comprimento com 4 (quatro) nucleobases não complementares, que são flanqueadas por duas regiões de complementaridade completa com o ácido nucleico alvo, apresentaria 77,8 % de complementaridade total com o ácido nucleico alvo e estaria, assim, no escopo da presente invenção. A complementaridade percentual de um composto anti-sentido com uma região de um ácido nucleico alvo pode ser determinada de maneira rotineira usando os programas BLAST (ferramentas de pesquisa de alinhamento local básico) e programas PowerBLAST conhecidos na técnica (Altschul et al., J. Mol. Biol., 1990, 215, 403 410; Zhang e Madden, Genoma Res., 1997, 7, 649 656). A homologia percentual, identidade ou complementaridade de sequência podem ser determinadas, por exemplo, pelo programa Gap (Pacote de análise de sequência Wisconsin, versão 8 para Unix, grupo Genetics Computer, University Research Park, Madison Wis.), usando ajustes padrões que utilizam o algoritmo de Smith e Waterman (Adv. Appl. Math., 1981, 2, 482 489).

[00218] Em certas modalidades, os compostos anti-sentido aqui fornecidos, ou porções especificadas destes, são totalmente complementares (isto é 100 % complementares) a um ácido nucleico alvo, ou porção especificada destes. Por exemplo, composto anti-



sentido pode ser totalmente complementar a um ácido nucleico do fator 11, ou uma região alvo, ou um segmento alvo ou sequência alvo deste. Da maneira aqui usada, “totalmente complementar” significa que cada nucleobase de um composto anti-sentido é capaz de parear bases precisamente com as nucleobases correspondentes de um ácido nucleico alvo. Por exemplo, um composto anti-sentido com 20 nucleobases é totalmente complementar a uma sequência alvo que apresenta 400 nucleobases de comprimento, enquanto existe uma porção correspondente do ácido nucleico alvo com 20 nucleobases que é totalmente complementar ao composto anti-sentido. Totalmente complementar também pode ser usado com relação a uma porção especificada deste do primeiro e /ou do segundo ácido nucleico. Por exemplo, uma porção com 20 nucleobases de um composto anti-sentido com 30 nucleobases pode ser “totalmente complementar” a uma sequência alvo que apresenta 400 nucleobases de comprimento. A porção com 20 nucleobases do oligonucleotídeo com 30 nucleobases é totalmente complementar à sequência alvo se o sequência alvo apresentar uma porção com 20 nucleobases correspondente, em que cada nucleobase é complementar à porção com 20 nucleobases do composto anti-sentido. Ao mesmo tempo, todo o composto anti-sentido com 30 nucleobases pode ou não ser totalmente complementar à sequência alvo, dependendo se as 10 nucleobases restantes do composto anti-sentido são também complementares à sequência alvo.

[00219] O local de uma nucleobase não complementar pode ser na extremidade 5' ou extremidade 3' do composto anti-sentido. Alternativamente, a nucleobase não complementar, ou nucleobases, pode estar em uma posição interna do composto anti-sentido. Quando duas ou mais nucleobases não complementares são presentes, elas pode ser contíguas (isto é, ligadas) ou não contíguas. Em uma

modalidade, uma nucleobase não complementar está localizada no segmento em asa de um oligonucleotídeo anti-sentido Gap-mer.

[00220] Em certas modalidades, os compostos anti-sentido que apresentam, ou apresentam até, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 nucleobases de comprimento compreendem não mais que 4, não mais que 3, não mais que 2, ou não mais que 1 nucleobase não complementar com relação a um ácido nucleico alvo, tal como um ácido nucleico do fator 11, ou porção especificada deste.

[00221] Em certas modalidades, os compostos anti-sentido que apresentam, ou apresentam até, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ou 30 nucleobases de comprimento compreendem não mais que 6, não mais que 5, não mais que 4, não mais que 3, não mais que 2, ou não mais que 1 nucleobase não complementar com relação a um ácido nucleico alvo, tal como um ácido nucleico do fator 11, ou porção especificada deste.

[00222] Os compostos anti-sentido aqui fornecidos também incluem aqueles que são complementares a uma porção de um ácido nucleico alvo. Da maneira aqui usada, “porção” refere-se a um número definido de nucleobases contíguas (isto é, ligadas) em uma região ou segmento de um ácido nucleico alvo. Uma “porção” também pode se referir a um número definido de nucleobases contíguas de um composto anti-sentido. Em certas modalidades, os compostos anti-sentido são complementares a pelo menos uma porção de um segmento alvo com 8 nucleobases. Em certas modalidades, os compostos anti-sentido são complementares a pelo menos uma porção de um segmento alvo com 12 nucleobases. Em certas modalidades, os compostos anti-sentido são complementares a pelo menos uma porção de um segmento alvo com 15 nucleobases. São também contemplados compostos anti-sentido que são complementares a pelo menos uma porção de um segmento alvo com

9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ou mais nucleobases, ou uma faixa definida por qualquer de dois destes valores.

Identidade

[00223] Os compostos anti-sentido aqui fornecidos também podem apresentar uma identidade percentual definida em uma sequência particular de nucleotídeos, SEQ ID NO, ou composto representado por um número Isis específico, ou porção deste. Da maneira aqui usada, um composto anti-sentido é idêntico à sequência aqui revelada se apresentar a mesma capacidade de parear nucleobase. Por exemplo, um RNA que contém uracila no lugar de timidina em uma sequência de DNA revelada seria considerado idêntico à sequência de DNA uma vez que tanto uracila quanto timidina pareiam com adenina. Versões menores e maiores dos compostos anti-sentido aqui descritos, bem como os compostos com bases não idênticas aos compostos anti-sentido aqui fornecidos, também são contempladas. As bases não idênticas podem ser adjacentes umas às outras ou dispersas em todo o composto anti-sentido. A identidade percentual de um composto anti-sentido é calculada de acordo com o número de bases que apresenta pareamento de base idêntico à sequência na qual está sendo comparado.

[00224] Em certas modalidades, os compostos anti-sentido, ou porções destes, são pelo menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % ou 100 % idênticos a um ou mais dos compostos anti-sentido ou SEQ ID NOs, ou uma porção destes, aqui revelados.

[00225] Em certas modalidades, uma porção do composto anti-sentido é comparada a uma porção de tamanho igual a do ácido nucleico alvo. Em certas modalidades, uma porção com 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 ou 25 nucleobases é comparada a uma porção de tamanho igual a do ácido nucleico alvo.

[00226] Em certas modalidades, uma porção do oligonucleotídeo anti-sentido é comparada a uma porção de tamanho igual a do ácido nucleico alvo. Em certas modalidades, uma porção com 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 ou 25 nucleobases é comparada a uma porção de tamanho igual a do ácido nucleico alvo.

### Modificações

[00227] Um nucleosídeo é uma combinação base-açúcar. A porção de nucleobase (também conhecida como base) do nucleosídeo é em geral uma fração de base heterocíclica. Os nucleotídeos são os nucleosídeos que incluem adicionalmente um grupo fosfato covalentemente ligado à porção de açúcar do nucleosídeo. Para aqueles nucleosídeos que incluem um açúcar pentofuranosila, o grupo fosfato pode estar ligado na fração hidroxila 2', 3' ou 5' do açúcar. Os oligonucleotídeos são formados por meio da ligação covalente de nucleosídeos adjacentes uns aos outros para formar um oligonucleotídeo polimérico linear. Na estrutura do oligonucleotídeo, os grupos fosfato são comumente referidos como os que formam as ligações entre nucleosídeos do oligonucleotídeo.

[00228] As modificações nos compostos anti-sentido incluem substituições ou mudanças nas ligações entre nucleosídeos, frações de açúcar, ou nucleobases. Os compostos anti-sentido modificados são frequentemente preferidos com relação às formas nativas em decorrência de propriedades desejadas tais como, por exemplo, melhor absorção celular, melhor afinidade com o ácido nucleico alvo, maior estabilidade na presença de nucleases, ou maior atividade inibitória.

[00229] Os nucleosídeos quimicamente modificados também podem ser empregados para aumentar a afinidade de ligação de um oligonucleotídeo anti-sentido menor ou truncado com relação ao seu ácido nucleico alvo. Consequentemente, os resultados comparáveis

podem ser frequentemente obtidos com compostos anti-sentido menores que apresentam tais nucleosídeos quimicamente modificados.

#### Ligações modificadas entre nucleosídeos

[00230] A ligação de ocorrência natural entre nucleosídeos de RNA e DNA é uma ligação de fosfodiéster 3' a 5'. Os compostos anti-sentido com uma ou mais ligações modificadas, isto é, de ocorrência não natural, entre nucleosídeos são selecionados frequentemente com relação aos compostos anti-sentido com ligações entre nucleosídeos de ocorrência natural em decorrência de propriedades desejáveis tais como, por exemplo, melhor absorção celular, melhor afinidade com relação aos ácidos nucleicos alvos, e maior estabilidade na presença de nucleases.

[00231] Os oligonucleotídeos com ligações modificadas entre nucleosídeos incluem ligações entre nucleosídeos que mantêm um átomo de fósforo, bem como as ligações entre nucleosídeos que não apresentam um átomo de fósforo. As ligações contendo fósforo representativas entre nucleosídeos incluem, mas sem limitação, fosfodiésteres, fosfotriésteres, metilfosfonatos, fosforamido e fosforotioatos. Os métodos de preparação de ligações contendo fósforo e não contendo fósforo são bem conhecidos.

[00232] Em certas modalidades, os compostos anti-sentido alvejados em um ácido nucleico do fator 11 compreendem uma ou mais ligações modificadas entre os nucleosídeos. Em certas modalidades, as ligações modificadas entre os nucleosídeos são ligações fosforotioato. Em certas modalidades, cada ligação entre os nucleosídeos de um composto anti-sentido é uma ligação internucleosídeos de fosforotioato.

#### Frações de açúcar modificado

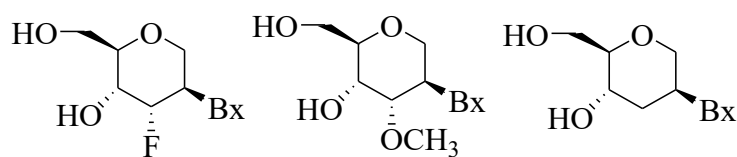
[00233] Os compostos anti-sentido da invenção podem conter

opcionalmente um ou mais nucleosídeos nos quais o grupo de açúcar foi modificado. Tais nucleosídeos com açúcar modificado podem transmitir melhor estabilidade da nuclease, maior afinidade de ligação ou alguma outra propriedade biológica benéfica aos compostos anti-sentido. Em certas modalidades, os nucleosídeos compreendem frações quimicamente modificadas de anel ribofuranose. Exemplos de anéis ribofuranose quimicamente modificados incluem sem limitação, a adição de grupos substituintes (incluindo grupos substituintes 5' e 2', ligação de átomos do anel não germinal para formar ácidos nucleicos bicíclicos (BNA), substituição do átomo de oxigênio do anel ribosila por S, N(R), ou C(R1)(R)2 (R = H, alquila  $C_{1-C12}$  ou um grupo protetor) e combinações destes. Exemplos de açúcares quimicamente modificados incluem nucleosídeo substituído por 2'-F-5'-metila (ver pedido internacional PCT WO 2008/101157, publicado em 8/21/08 para outros nucleosídeos revelados substituídos por 5',2'-bis) ou a substituição do átomo de oxigênio do anel ribosila por S com substituição adicional na posição 2' (ver pedido de patente U.S. publicado US2005-0130923, publicado em 16 de junho de 2005) ou, alternativamente, a substituição 5' de um BNA (ver pedido internacional PCT WO 2007/134181, publicado em 11/22/07, em que o LNA é substituído por, por exemplo, um grupo 5'-metila ou um 5'-vinila).

[00234] Exemplos de nucleosídeos com frações de açúcar modificado incluem, sem limitações, nucleosídeos compreendendo grupos substituintes 5'-vinila, 5'-metila (R ou S), 4'-S, 2'-F, 2'-OCH<sub>3</sub> e 2'-O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>. O substituinte na posição 2' também pode ser selecionado de alila, amino, azido, tio, O-alila, O-alquila  $C_{1-C10}$ , OCF<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-N(R<sub>m</sub>)(R<sub>n</sub>) e O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-N(R<sub>m</sub>)(R<sub>n</sub>), onde cada R<sub>m</sub> e R<sub>n</sub> é, independentemente, H ou alquila  $C_{1-C10}$  substituída ou não substituída.

[00235] Exemplos de ácidos nucleicos bicíclicos (BNAs) incluem, sem limitações, nucleosídeos compreendendo uma ponte entre os átomos 4' e 2' do anel ribosila. Em certas modalidades, os compostos anti-sentido aqui fornecidos incluem um ou mais nucleosídeos BNA, nos quais a ponte compreende uma das fórmulas: 4'-(CH<sub>2</sub>)-O-2' (LNA); 4'-(CH<sub>2</sub>)-S-2'; 4'-(CH<sub>2</sub>)-O-2' (LNA); 4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-2' (ENA); 4'-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-O-2' (ver PCT/US2008/068922); 4'-CH(CH<sub>3</sub>)-O-2' e 4'-CH(CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>)-O-2' (ver patente U.S. 7.399.845, depositada em 15 de julho de 2008); 4'-CH<sub>2</sub>-N(OCH<sub>3</sub>)-2' (ver PCT/US2008/064591); 4'-CH<sub>2</sub>-O-N(CH<sub>3</sub>)-2' (ver pedido de patente U.S. publicado US2004-0171570, publicado em 2 de setembro de 2004 ); 4'-CH<sub>2</sub>-N(R)-O-2' (ver patente U.S. 7.427.672, depositada em 23 de setembro de 2008); 4'-CH<sub>2</sub>-C(CH<sub>3</sub>)-2'e 4'-CH<sub>2</sub>-C(=CH<sub>2</sub>)-2' (ver PCT/US2008/066154); e em que R é, independentemente, H, alquila C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> ou um grupo protetor. Cada um dos BNAs precedentes inclui várias configurações estereoquímicas de açúcar incluindo, por exemplo, α-L-ribofuranose e β-D-ribofuranose (ver pedido internacional PCT PCT/DK98/00393, publicado em 25 de março de 1999 como WO 99/14226).

[00236] Em certas modalidades, os nucleosídeos são modificados por substituição do anel de ribosila por um dos substitutos de açúcar. Tal modificação inclui, sem limitação, substituição do anel ribosila por um sistema de anel substituto (algumas vezes referido como análogos de DNA), tais como um anel morfolino, um anel de cicloexenila, um anel de cicloexila ou um anel de tetraidropiranila, tal como um com uma das fórmulas:



[00237] Muitos outros sistemas de anel substituto de açúcar biciclo e triciclo são também conhecidos na técnica e podem ser usados para

modificar nucleosídeos para incorporação nos compostos anti-sentido (ver, por exemplo, o artigo de revisão: Leumann, J. C, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2002**, 10, 841-854). Tais sistemas de anel podem se submeter a várias substituições adicionais para melhorar a atividade.

[00238] Os métodos para as preparações de açúcares modificados são bem conhecidos pelos versados na técnica.

[00239] Em nucleotídeos com frações de açúcar modificado, as frações de nucleobase (natural, modificada ou uma combinação destas) são mantidas para hibridização com um ácido nucleico alvo apropriado.

[00240] Em certas modalidades, os compostos anti-sentido alvejados em um ácido nucleico do fator 11 compreendem um ou mais nucleotídeos com frações de açúcar modificado. Em certas modalidades, a fração de açúcar modificado é 2'-MOE. Em certas modalidades, os nucleotídeos modificados 2'-MOE são arranjados em um motivo Gap-mer.

#### Nucleobases modificadas

[00241] As modificações ou substituições de nucleobase (ou base) são estruturalmente distinguíveis, ainda que indiferentemente de maneira funcional, das nucleobases de ocorrência natural ou sintéticas não modificadas. Tanto as nucleobases naturais quanto modificadas são capazes de participar da ligação de hidrogênio. Tais modificações de nucleobase podem transferir a estabilidade da nuclease, a afinidade de ligação ou alguma outra propriedade biológica benéfica aos compostos anti-sentido. As nucleobases modificadas incluem nucleobases sintéticas e naturais tal como, por exemplo, 5-metilcitosina (5-me-C). Certas substituições de nucleobase, incluindo substituições de 5-metilcitosina, são particularmente usadas para aumentar a afinidade de ligação de um composto anti-sentido por um



ácido nucleico alvo. Por exemplo, as substituições 5-metilcitosina mostraram aumentar a estabilidade do duplex de ácido nucleico em 0,6-1,2 °C (Sanghvi, Y.S., Crooke, S.T. e Lebleu, B., eds., *Antisense Research and Applications*, CRC Press, Boca Raton, **1993**, pp. 276-278).

[00242] Nucleobases modificadas adicionais incluem 5-hidroximetil citosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metil e outros derivados alquil de adenina e guanina, 2-propila e outros derivados alquila de adenina e guanina, 2-tiouracila, 2-tiotimina e 2-tiocitosina, 5-halouracila e citosina, 5-propinil ( $-C\equiv C-CH_3$ ) uracila e citosina e outros derivados alquinila de bases pirimídicas, 6-azo uracila, citosina e timina, 5-uracila (pseudouracila), 4-tiouracila, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquil, 8-hidroxila e outras 8-adeninas e guaninas substituídas, 5-halo particularmente 5-bromo, 5-trifluorometil e outras 5-uracilas e citosinas substituídas, 7-metilguanina e 7-metiladenina, 2-F-adenina, 2-amino-adenina, 8-azaguanina e 8-aza-aenina, 7-deazaguanina e 7-deaza-adenina e 3-deazaguanina e 3-deaza-adenina.

[00243] As frações de base heterocíclica também incluem aquelas nas quais a base púrica ou pirimídica é substituída por outros heterocíclis, por exemplo, 7-deaza-adenina, 7-deazaguanosina, 2-aminopiridina e 2-piridona. As nucleobases que são particularmente usadas para aumentar a afinidade de ligação dos compostos anti-sentido incluem 5-pirimidinas substituídas, 6-azapirimidinas e N-2, N-6 e O-6 purinas substituídas, incluindo 2 aminopropiladenina, 5-propiniluracila e 5-propinilcitosina.

[00244] Em certas modalidades, os compostos anti-sentido alvejados em um ácido nucleico do fator 11 compreendem uma ou mais nucleobases modificadas. Em certas modalidades, os oligonucleotídeos anti-sentido maiores em intervalo alvejados em um ácido nucleico do fator 11 compreendem uma ou mais nucleobases

modificadas. Em certas modalidades, a nucleobase modificada é 5-metilcitosina. Em certas modalidades, cada citosina é uma 5-metilcitosina.

*Composições e métodos para formular composições farmacêuticas*

[00245] Os oligonucleotídeos anti-sentido podem ser misturados com substâncias ativas farmaceuticamente aceitáveis ou inertes para a preparação de composições ou formulações farmacêuticas. Composições e métodos para a formulação de composições farmacêuticas são dependentes de inúmeros critérios incluindo, mas sem limitação, via de administração, grau da doença ou dose a ser administrada.

[00246] Um composto anti-sentido alvejado em um ácido nucleico do fator 11 pode ser utilizado em composições farmacêuticas combinando o composto anti-sentido com um diluente ou veículo farmaceuticamente aceitável adequado. Um diluente farmaceuticamente aceitável inclui salina tamponada com fosfato (PBS). PBS é um diluente adequado para uso em composições a serem distribuídas parenteralmente. Dessa maneira, em uma modalidade, é empregada nos métodos aqui descritos uma composição farmacêutica compreendendo um composto anti-sentido alvejado em um ácido nucleico do fator 11 e um diluente farmaceuticamente aceitável. Em certas modalidades, o diluente farmaceuticamente aceitável é PBS. Em certas modalidades, o composto anti-sentido é um oligonucleotídeo anti-sentido.

[00247] As composições farmacêuticas compreendendo os compostos anti-sentido incluem qualquer dos sais farmaceuticamente aceitáveis, ésteres, ou sais de tais ésteres, ou qualquer outro oligonucleotídeo que, mediante administração a um animal, incluindo um humano, é capaz de fornecer (direta ou indiretamente) o metabólito biologicamente ativo ou resíduo deste. Dessa maneira, por exemplo, a

revelação é também projetada para sais farmaceuticamente aceitáveis de compostos anti-sentido, pró-medicamentos, sais farmaceuticamente aceitáveis de tais pró-medicamentos e outros bioequivalentes. Os sais farmaceuticamente aceitáveis adequados incluem, mas sem limitação, sais de sódio e potássio.

[00248] Um pró-medicamento pode incluir a incorporação de nucleosídeos adicionais em uma ou ambas as extremidades de um composto anti-sentido que são clivadas por nucleases endógenas no corpo, para formar o composto ativo anti-sentido.

#### Compostos anti-sentido conjugados

[00249] Os compostos anti-sentido podem ser covalentemente ligados a uma ou mais frações ou conjugados que melhoram a atividade, distribuição celular ou absorção celular dos oligonucleotídeos anti-sentido resultantes. Os grupos de conjugados típicos incluem frações de colesterol e frações lipídicas. Os grupos de conjugados adicionais incluem carboidratos, fosfolipídeos, biotina, fenazina, folato, fenantridina, antraquinona, acridina, fluoresceínas, rodaminas, coumarinas e corantes.

[00250] Os compostos anti-sentido também podem ser modificados para apresentar um ou mais grupos estabilizadores que são em geral anexados a uma ou ambas as terminações de compostos anti-sentido para melhorar propriedades tal como, por exemplo, estabilidade da nuclease. São incluídos nos grupos estabilizadores as estruturas cap. Estas modificações terminais protegem o composto anti-sentido com o ácido nucleico terminal da exodegradação da nuclease, e podem auxiliar na distribuição e/ou localização em uma célula. O cap pode estar presente na terminação 5' (5'-cap), ou na terminação 3' (3'-cap), ou pode estar presente em ambas as terminações. As estruturas cap são bem conhecidas na técnica e incluem, por exemplo, caps não básicas de desóxi invertidas. Os grupos estabilizadores 3' e 5'

adicionais que podem ser usados para transformar em cap uma ou ambas as extremidades de um composto anti-sentido, para transmitir estabilidade da nuclease, incluem aqueles revelados em WO 03/004602, publicado em 16 de janeiro de 2003.

*Tratamento com cultura de células e compostos anti-sentido*

[00251] Os efeitos de compostos anti-sentido no nível, atividade ou expressão de ácidos nucleicos com fator 11 podem ser testados *in vitro* em uma variedade de tipos celulares. Os tipos celulares usados para tais análises são disponíveis a partir de vendedores comerciais (por exemplo, American Type Culture Collection, Manassus, VA; Zen-Bio, Inc., Research Triangle Park, NC; Clonetics Corporation, Walkersville, MD) e são cultivados de acordo com as instruções do vendedor usando reagentes disponíveis comercialmente (por exemplo, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). Os tipos celulares ilustrativos incluem, mas sem limitação, células HepG2, células Hep3B e hepatócitos primários.

*Teste in vitro de oligonucleotídeos anti-sentido*

[00252] São descritos aqui métodos para tratamento de células com oligonucleotídeos anti-sentido, que podem ser modificados de maneira apropriada para tratamento com outros compostos anti-sentido.

[00253] Em geral, as células são tratadas com oligonucleotídeos anti-sentido quando estas atingem aproximadamente 60-80 % confluência na cultura.

[00254] Um reagente comumente usado para introduzir oligonucleotídeos anti-sentido em células cultivadas inclui o reagente de transfecção de lipídeo catiônico LIPOFECTINA (Invitrogen, Carlsbad, CA). Os oligonucleotídeos anti-sentido são misturados com LIPOFECTINA em OPTI-MEM 1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) para atingir a concentração final desejada de oligonucleotídeo anti-sentido e uma concentração de LIPOFECTINA que varia tipicamente de 2 a 12 ug/mL

por 100 nM de oligonucleotídeo anti-sentido.

[00255] Um outro reagente usado para introduzir oligonucleotídeos anti-sentido em células cultivadas inclui LIPOFECTAMINA (Invitrogen, Carlsbad, CA). O oligonucleotídeo anti-sentido é misturado com LIPOFECTAMINA em meio de soro reduzido de OPTI-MEM 1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) para atingir a concentração desejada de oligonucleotídeo anti-sentido e uma concentração de LIPOFECTAMINA que varia tipicamente de 2 a 12 ug/mL por 100 nM de oligonucleotídeo anti-sentido.

[00256] Uma outra técnica usada para introduzir oligonucleotídeos anti-sentido em células cultivadas inclui eletroporação.

[00257] As células são tratadas com oligonucleotídeos anti-sentido por métodos de rotina. As células são tipicamente colhidas 16-24 horas após o tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido, no qual os níveis de tempo de RNA ou de proteína dos ácidos nucleicos alvos são medidos por métodos conhecidos na técnica e qui descritos. Em geral, quando os tratamentos são realizados em réplicas múltiplas, os dados são apresentados como a média dos tratamentos em réplica.

[00258] A concentração do oligonucleotídeo anti-sentido usada varia de linhagem celular para linhagem celular. Os métodos para determinar a concentração ideal de oligonucleotídeo anti-sentido para uma linhagem celular particular são bem conhecidos na técnica. Os oligonucleotídeos anti-sentido são usados tipicamente em concentrações que variam de 1 nM a 300 nM quando transfectados com LIPOFECTAMINA. Os oligonucleotídeos anti-sentido são usados em concentrações maiores que variam de 625 a 20.000 nM, quando transfectados usando eletroporação.

#### Isolamento de RNA

[00259] A análise de RNA pode ser realizada no RNA celular total ou poli(A)+ RNAm. Os métodos de isolamento de RNA são bem

conhecidos na técnica. O RNA é preparado usando métodos bem conhecidos na técnica, por exemplo, usando o reagente TRIZOL (Invitrogen, Carlsbad, CA), de acordo com os protocolos recomendados pelo fabricante.

Análise de inibição de níveis ou expressão de alvo

[00260] A inibição de níveis ou expressão de um ácido nucleico do fator 11 pode ser ensaiada em uma variedade de maneiras conhecidas na técnica. Por exemplo, os níveis de ácido nucleico alvo podem ser quantificados, por exemplo, por análise de Northern blot, reação em cadeia da polimerase competitiva (PCR), ou PCR em tempo real quantitativa. A análise de RNA pode ser realizada em RNA celular total ou poli(A)+ RNAm. Os métodos de isolamento de RNA são bem conhecidos na técnica. A análise de Northern blot análise também é de rotina na técnica. PCR em tempo real quantitativa pode ser realizada convenientemente usando o sistema de detecção de sequência ABI PRISM 7600, 7700 ou 7900, disponível comercialmente pela PE-Applied Biosystems, Foster City, CA e usado de acordo com as instruções do fabricante.

Análise de PCR em tempo real quantitativa dos níveis de RNA alvo

[00261] A quantificação dos níveis de RNA alvo pode ser realizada por PCR em tempo real quantitativa usando o sistema de detecção de sequência ABI PRISM 7600, 7700 ou 7900 (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA) de acordo com as instruções do fabricante. Os métodos de PCR em tempo real quantitativa são bem conhecidos na técnica.

[00262] Antes da PCR em tempo real, o RNA isolado é submetido a uma reação com transcriptase reversa (RT), que produz DNA complementar (DNAC) que é então usado como o substrato para a amplificação por PCR em tempo real. As reações de RT e PCR em tempo real são realizadas sequencialmente na mesma amostra de

maneira igual. Os reagentes de RT e PCR em tempo real são obtidos da Invitrogen (Carlsbad, CA). As reações de RT-PCR em tempo real são realizadas por métodos bem conhecidos pelos versados na técnica.

[00263] As quantidades de gene (ou RNA) alvo obtidas por PCR em tempo real são normalizadas usando tanto o nível de expressão de um gene cuja expressão é constante, tal como ciclofilina A, quanto quantificando o RNA total usando RIBOGREEN (Invitrogen, Inc. Carlsbad, CA). A expressão de ciclofilina A é quantificada por PCR em tempo real, sendo corrida simultaneamente com o alvo, em multiplex, ou separadamente. O RNA total é quantificado usando o reagente de quantificação de RNA RIBOGREEN (Invitrogen, Inc. Eugene, OU). Os métodos de quantificação de RNA por RIBOGREEN são preceituados em Jones, L.J., et al, (Analytical Biochemistry, 1998, 265, 368-374). Um instrumento CYTOFLUOR 4000 (PE Applied Biosystems) é usado para medir a fluorescência de RIBOGREEN.

[00264] Sondas e oligonucleotídeos iniciadores são desenhados para hibridizar um ácido nucleico do fator 11. Os métodos para desenhar sondas e oligonucleotídeos iniciadores de PCR em tempo real são bem conhecidos na técnica, e podem incluir o uso de software, tal como o software PRIMER EXPRESS (Applied Biosystems, Foster City, CA).

#### Análise dos níveis de proteína

[00265] A inibição anti-sentido de ácidos nucleicos de fator 11 pode ser avaliada medindo os níveis de proteína do fator 11. Os níveis de proteína de fator 11 podem ser avaliados ou quantificados em uma variedade de maneiras bem conhecidas na técnica, tais como imunoprecipitação, análise por Western blot (immunoblotting), ensaio imunoabsorvente ligado a enzima (ELISA), ensaios quantitativos de proteína, ensaios de atividade protéica (por exemplo, ensaios de

atividade da caspase), imuno-histoquímica, imunocitoquímica ou classificação de célula ativada por fluorescência (FACS). Os anticorpos direcionados a um alvo podem ser identificados e obtidos de uma variedade de fontes, tais como o catálogo MSRS de anticorpos (Aerie Corporation, Birmingham, MI), ou podem ser preparados por meio de métodos de geração convencionais de anticorpo monoclonal ou policlonal bem conhecidos na técnica. Os anticorpos usados para a detecção de fator 11 de camundongo, rato, macaco e humano são disponíveis comercialmente.

*Teste in vivo de compostos anti-sentido*

[00266] Os compostos anti-sentido, por exemplo, oligonucleotídeos anti-sentido, são testados em animais para garantir sua capacidade de inibir a expressão de fator 11 e produzir mudanças fenotípicas, tais como aPTT prolongado, período prolongado de aPTT junto com um PT normal, menor quantidade de fator plaquetário (PF-4), e formação reduzida de trombo ou aumento do tempo para a formação de trombo. O teste pode ser realizado em animais normais, ou em modelos experimentais de doença. Para a administração em animais, os oligonucleotídeos anti-sentido são formulados em um diluente farmacologicamente aceitável, tal como salina tamponada com fosfato. A administração inclui vias de administração parenterais, tais como intraperitoneal, intravenosa e subcutânea. O cálculo de dosagem de oligonucleotídeo anti-sentido e frequência de dose está nas capacidades dos versados na técnica e, depende de fatores tais como via de administração e peso corporal do animal. Após um período de tratamento com oligonucleotídeos anti-sentido, o RNA é isolado do tecido hepático e as mudanças na expressão do ácido nucleico do fator 11 são medidas. As mudanças nos níveis de proteína do fator 11 são também medidas usando um ensaio de geração de trombina. Além do mais, os efeitos nos tempos de coagulação, por exemplo, PT



e aPTT, são determinados usando plasma de animais tratados.

Tolerabilidade

[00267] Em certas modalidades, os compostos aqui fornecidos exibem efeitos colaterais mínimos. Os efeitos colaterais incluem respostas à administração do composto anti-sentido, que são tipicamente não relacionados com o alvejamento do fator 11, tal como uma resposta inflamatória no animal. Em certas modalidades, os compostos são bem tolerados pelo animal. Maior tolerabilidade pode depender de inúmeros fatores, incluindo, mas sem limitação, a sequência de nucleotídeos do composto anti-sentido, modificações químicas nos nucleotídeos, o motivo particular de nucleosídeos modificados e não modificados no composto anti-sentido, ou combinações destes. A tolerabilidade pode ser determinada por inúmeros fatores. Tais fatores incluem peso corporal, peso do órgão, função hepática, função renal, contagem de plaqueta, contagem de célula branca do sangue.

[00268] Em certas modalidades, os compostos aqui fornecidos demonstram efeito mínimo no peso do órgão. Em certas modalidades, os compostos demonstram menos de um aumento de 7 vezes, 6 vezes, 5 vezes, 4 vezes, 3 vezes, 2 vezes ou nenhum no peso do baço e/ou fígado.

[00269] Em certas modalidades, os compostos aqui fornecidos demonstram efeito mínimo na função hepática. Os fatores para a avaliação da função hepática incluem níveis de ALT, níveis de AST, níveis de bilirrubina do plasma e níveis de albumina no plasma. Em certas modalidades, os compostos aqui fornecidos demonstram menos de um aumento significativo de 7 vezes, menos de um de 6 vezes, menos de um de 5 vezes, menos de um de 4 vezes, menos de um de 3 vezes ou menos de um de 2 vezes ou nenhum em ALT ou AST. Em certas modalidades, os compostos aqui fornecidos demonstram menos

de um aumento significativo de 3 vezes, menos de um de 2 vezes ou nenhum nos níveis de bilirrubina no plasma.

[00270] Em certas modalidades, os compostos aqui fornecidos demonstram efeito mínimo na função renal. Em certas modalidades, os compostos aqui fornecidos demonstram menos de um aumento significativo de 3 vezes, menos de um de 2 vezes ou nenhum nas plasma concentrações plasmáticas de nitrogênio-uréia no sangue (BUN). Em certas modalidades, os compostos aqui fornecidos demonstram menos de um aumento significativo de 6 vezes, 5 vezes, 4 vezes, 3 vezes, 2 vezes ou nenhum na razão de proteinúria para creatinina.

[00271] Em certas modalidades, os compostos aqui fornecidos demonstram efeito mínimo nos fatores hematológicos. Em certas modalidades, os compostos aqui fornecidos demonstram menos de um aumento de 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 % ou 5 % na contagem de plaquetas. Em certas modalidades, os compostos aqui fornecidos demonstram menos de um aumento significativo de 4 vezes, menos de um de 3 vezes, menos de um de 2 vezes ou nenhum na contagem de monócito.

[00272] Em certas modalidades, os compostos exibem adicionalmente farmacocinética favorável. Em certas modalidades, os compostos anti-sentido exibem meias vidas relativamente altas nos fluidos ou tecidos biológicos relevantes.

[00273] Em certas modalidades, os compostos ou composições exibem adicionalmente viscosidade favorável. Em certas modalidades, a viscosidade do composto ou composição é não mais que 40cP em uma concentração de 165-185 mg/mL.

[00274] Em outras modalidades, os compostos exibem combinações das características anteriores e reduzem a expressão do RNAm do fator 11 em um modelo animal com alta eficiência.

Certas indicações

[00275] Em certas modalidades, a invenção fornece métodos de tratar um indivíduo compreendendo administrar uma ou mais composições farmacêuticas da presente invenção. Em certas modalidades, o indivíduo apresenta uma complicação tromboembólica. Em certas modalidades, o indivíduo está em risco de um distúrbio de coagulação sanguínea, incluindo, mas sem limitação, infarto, trombose, embolia, tromboembolia tais como trombose venosa profunda, embolia pulmonar, infarto do miocárdio e acidente vascular. Isto inclui indivíduos com um problema, doença ou distúrbio adquirido que leva a um risco de trombose, por exemplo, cirurgia, câncer, imobilidade, sepse, aterosclerose por fibrilação atrial, bem como predisposição genética, por exemplo, síndrome anti-fosfolipídica e a condição dominante autossômica, o fator V de Leiden. Em certas modalidades, o indivíduo foi identificado como aquele que precisa de terapia de anticoagulação. Exemplos de tais indivíduos incluem, mas sem limitação, aqueles que se submetem à principal cirurgia ortopédica (por exemplo, substituição de costela/joelho ou cirurgia de fratura de costela) e pacientes que precisam de tratamento crônico, tais como aqueles que sofrem de fibrilação arterial para prevenir acidente vascular. Em certas modalidades, a invenção fornece métodos para reduzir profilaticamente a expressão do fator 11 em um indivíduo. Certas modalidades incluem tratar um indivíduo que necessita deste, administrando a um indivíduo uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto anti-sentido alvejado em um ácido nucleico do fator 11.

[00276] Em uma modalidade, a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto anti-sentido alvejado em um ácido nucleico do fator 11 é acompanhada pelo monitoramento dos níveis do fator 11 no soro de um indivíduo para determinar a resposta

de um indivíduo à administração do composto anti-sentido. Uma resposta do indivíduo à administração do composto anti-sentido é usada pelo médico para determinar a quantidade e duração da intervenção terapêutica.

[00277] Em certas modalidades, a administração de um composto anti-sentido alvejado em um ácido nucleico do fator 11 resulta na redução da expressão do fator 11 em pelo menos 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 ou 99 %, ou uma faixa definida por qualquer de dois destes valores. Em certas modalidades, a administração de um composto anti-sentido alvejado em um ácido nucleico do fator 11 resulta em uma mudança em uma medida de coagulação sanguínea, da maneira medida por um teste padrão, por exemplo, mas sem limitação, teste de tempo de tromboplastina parcial ativada (aPTT), teste de tempo de protrombina (PT), tempo de trombina (TCT), tempo de hemorragia ou D-dímero. Em certas modalidades, a administração de um composto anti-sentido do fator 11 aumenta a medida em pelo menos 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 ou 99 %, ou uma faixa definida por qualquer de dois destes valores. Em algumas modalidades, a administração de um composto anti-sentido do fator 11 diminui a medida em pelo menos 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 ou 99 %, ou uma faixa definida por qualquer de dois destes valores.

[00278] Em certas modalidades, as composições farmacêuticas compreendendo um composto anti-sentido alvejado pelo fator 11 são usadas para a preparação de um medicamento para tratar um paciente que sofre ou é susceptível a uma complicação tromboembolítica.

#### Certas terapias de combinação

[00279] Em certas modalidades, uma ou mais composições

farmacêuticas da presente invenção são co-administradas com um ou mais outros agentes farmacêuticos. Em certas modalidades, um ou mais outros agentes farmacêuticos como estes são projetados para tratar a mesma doença, distúrbio ou condição assim como a uma ou mais composições farmacêuticas da presente invenção. Em certas modalidades, um ou mais outros agentes farmacêuticos como estes são projetados para tratar uma doença, distúrbio ou condição diferentes, assim como a uma ou mais composições farmacêuticas da presente invenção. Em certas modalidades, um ou mais outros agentes farmacêuticos como estes são projetados para tratar um efeito colateral indesejado de uma ou mais composições farmacêuticas da presente invenção. Em certas modalidades, uma ou mais composições farmacêuticas da presente invenção são co-administradas com um outro agente farmacêutico para tratar um efeito indesejado deste outro agente farmacêutico. Em certas modalidades, uma ou mais composições farmacêuticas da presente invenção são co-administradas com um outro agente farmacêutico para produzir um efeito de combinação. Em certas modalidades, uma ou mais composições farmacêuticas da presente invenção são co-administradas com um outro agente farmacêutico para produzir um efeito sinérgico.

[00280] Em certas modalidades, uma ou mais composições farmacêuticas da presente invenção e um ou mais outros agentes farmacêuticos são administrados ao mesmo tempo. Em certas modalidades, uma ou mais composições farmacêuticas da presente invenção e um ou mais outros agentes farmacêuticos são administrados em períodos diferentes. Em certas modalidades, uma ou mais composições farmacêuticas da presente invenção e um ou mais outros agentes farmacêuticos são preparados juntos em uma única formulação. Em certas modalidades, uma ou mais composições

farmacêuticas da presente invenção e um ou mais outros agentes farmacêuticos são preparados separadamente.

[00281] Em certas modalidades, os agentes farmacêuticos que podem ser co-administrados com uma composição farmacêutica da presente invenção incluem agentes anti-coagulantes ou anti-plaquetários. Em certas modalidades, os agentes farmacêuticos que podem ser co-administrados com uma composição farmacêutica da presente invenção incluem inibidores de NSAID/Ciclo-oxigenase, tal como aspirina. Em certas modalidades, os agentes farmacêuticos que podem ser co-administrados com uma composição farmacêutica da presente invenção incluem inibidores do receptor adenosina difosfato (ADP), tais como clopidogrel (PLAVIX) e ticlopidina (TICLID). Em certas modalidades, os agentes farmacêuticos que podem ser co-administrados com uma composição farmacêutica da presente invenção incluem inibidores de fosfodiesterase, tal como cilostazol (PLETAL). Em certas modalidades, os agentes farmacêuticos que podem ser co-administrados com uma composição farmacêutica da presente invenção incluem, inibidores de glicoproteína IIB/IIIA, tais como abciximab (REOPRO), eptifibatida (INTEGRILINA), tirofiban (AGGRASTAT) e defibrotida. Em certas modalidades, os agentes farmacêuticos que podem ser co-administrados com uma composição farmacêutica da presente invenção incluem inibidores de reabsorção de adenosina, tal como dipiridamol (PERSANTINA). Em certas modalidades, os agentes farmacêuticos que podem ser co-administrados com uma composição farmacêutica da presente invenção incluem, mas sem limitação, varfarina (e coumarinas relacionadas), heparina, inibidores diretos de trombina (tais como lepirudina, bivalirudina), apixaban, LOVENOX, e compostos moleculares pequenos que interferem diretamente com a ação enzimática de fatores de coagulação particulares (por exemplo,

rivaroxaban, que interfere com o fator Xa). Em certas modalidades, os agentes farmacêuticos que podem ser co-administrados com um inibidor específico do fator 11 da presente invenção incluem, mas sem limitação, um inibidor adicional do fator 11. Em certas modalidades, o agente anti-coagulante ou anti-plaquetário é administrado antes da administração de uma composição farmacêutica da presente invenção. Em certas modalidades, o agente anti-coagulante ou anti-plaquetário é administrado após a administração de uma composição farmacêutica da presente invenção. Em certas modalidades o agente anti-coagulante ou anti-plaquetário é administrado ao mesmo tempo que uma composição farmacêutica da presente invenção. Em certas modalidades a dose de um agente anti-coagulante ou anti-plaquetário co-administrado é a mesma dose que seria administrada se o agente anti-coagulante ou anti-plaquetário fosse administrado sozinho. Em certas modalidades a dose de um agente anti-coagulante ou anti-plaquetário co-administrado é menor que a dose que seria administrada se o agente anti-coagulante ou anti-plaquetário fosse administrado sozinho. Em certas modalidades a dose de um agente anti-coagulante ou anti-plaquetário co-administrado é maior que a dose que seria administrada se o agente anti-coagulante ou anti-plaquetário fosse administrado sozinho.

[00282] Em certas modalidades, a co-administração de um segundo composto melhora o efeito anticoagulante de um primeiro composto, de maneira tal que co-administração dos compostos resulte em um efeito anticoagulante que é maior que o efeito de administrar o primeiro composto sozinho. Em outras modalidades, a co-administração resulta em efeitos anticoagulantes que são aditivos dos efeitos dos compostos quando administrados sozinhos. Em certas modalidades, a co-administração resulta em efeitos anticoagulantes que são supra-aditivos dos efeitos dos compostos quando

administrados sozinhos. Em certas modalidades, a co-administração de um segundo composto aumenta a atividade anti-trombótica sem aumentar o risco de hemorragia. Em certas modalidades, o primeiro composto é um composto anti-sentido. Em certas modalidades, o segundo composto é um composto anti-sentido.

[00283] Em certas modalidades, um antídoto é administrado a qualquer momento após a administração de um inibidor específico do fator 11. Em certas modalidades, um antídoto é administrado a qualquer momento após a administração de um oligonucleotídeo anti-sentido que alveja o fator 11. Em certas modalidades, o antídoto é administrado minutos, horas, dias, semanas ou meses após a administração de um composto anti-sentido que alveja o fator 11. Em certas modalidades, o antídoto é um complementar (por exemplo, a fita sentido) ao composto anti-sentido que alveja o fator 11. Em certas modalidades, o antídoto é uma proteína do fator 7, do fator 7a, do fator 11, ou do fator 11a. Em certas modalidades, a proteína do fator 7, do fator 7a, do fator 11 ou do fator 11a é uma proteína do fator 7 humano, fator 7a humano, fator 11 humano ou fator 11a humano. Em certas modalidades, a proteína do fator 7 é NOVOSEVEN.

*Certas terapias anti-plaquetárias co-administradas*

[00284] Em certas modalidades, os inibidores do fator 11 são combinados com terapias anti-plaquetárias. Em certas modalidades, a administração de um inibidor do fator 11 em combinação com uma terapia anti-plaquetária resulta em pouco ou nenhum aumento apreciável ou detectável no risco de hemorragia, comparado à terapia antiplaquetária sozinha. Em certas modalidades, o perfil de risco ou indicações de risco não mudam com relação à terapia anti-plaquetária sozinha.

[00285] A combinação de terapia anti-plaquetária e anti-coagulante é usada na prática clínica mais frequentemente em pacientes



diagnosticados com, por exemplo, tromboembolia, fibrilação atrial, um distúrbio de válvula cardíaca, doença de válvula cardíaca, acidente vascular, CAD e em pacientes com uma válvula mecânica. O benefício da terapia dupla diz respeito ao provável efeito aditivo de suprimir tanto as atividades plaquetárias quanto as do fator de coagulação. O risco da terapia dupla é o potencial para maior risco de hemorragia (Dowd, M. Plenary Sessions/Trombose Research 123 (2008)).

[00286] Combinações prévias de terapia anti-plaquetária e anti-coagulante terem mostraram aumento do risco de hemorragia comparadas com a terapia anti-coagulante ou anti-plaquetária sozinha. Tais combinações incluem, inibidores de FXa (por exemplo, apixiban e rivaroxaban) com receptores de ADP/inibidores de P2Y12 (Tienopiridinas tal como clopidogrel, também conhecida como PLAVIX) e NSAIDs (por exemplo, aspirina e naproxen) (Kubitza, D. *et al.*, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 63:4 (2006); Wong, P.C. *et al. Journal fo Thrombosis and Haemostasis* 6 (2008); FDA Advisory Committee Briefing Document for New Drug Application 22-406 (2009)). Por exemplo, Wong relata que a adição de certas doses de apixaban em aspirina e em aspirina adicionada de clopidogrel produziu um aumento significativo no tempo de hemorragia comparado com aspirina sozinha e aspirina adicionada de clopidogrel. Kubitza reporta que a combinação da administração de rivaroxaban e naproxeno aumentou significativamente o tempo de hemorragia com relação à naproxeno sozinho.

## **EXEMPLOS**

### ***Revelação não limitante e incorporação por referência***

[00287] Embora certos compostos, composições e métodos aqui descritos tenham sido descritos com especificidade de acordo com certas modalidades, os exemplos a seguir servem apenas para ilustrar os compostos aqui descritos e não pretende-se que sejam limitantes

dos mesmos. Cada uma das referências citadas no presente pedido é aqui incorporada pela referência na sua íntegra.

### **Exemplo 1: Inibição anti-sentido de fator 11 humano em células HepG2**

[00288] Os oligonucleotídeos anti-sentido alvejados em um ácido nucleico do fator 11 foram testados com relação a seus efeitos no RNAm do fator 11 *in vitro*. As células HepG2 cultivadas em uma densidade de 10.000 células por poço foram transfectadas usando reagente lipofectina com oligonucleotídeo anti-sentido 75 nM. Após um período de tratamento de aproximadamente 24 horas, o RNA foi isolado das células e os níveis do RNAm do fator 11 foram medidos por PCR em tempo real quantitativa. Os níveis do RNAm do fator 11 foram ajustados de acordo com o teor de RNA total, da maneira medida por RIBOGREEN. Os resultados são apresentados como inibição percentual do fator 11, com relação às células controle não tratadas.

[00289] Os oligonucleotídeos anti-sentido quiméricos nas tabelas 1 e 2 foram designados como Gap-mers 5-10-5 MOE. Os Gap-mers apresentam 20 nucleotídeos de comprimento, em que o segmento central de intervalo é compreendido de 10 2'-desoxinucleotídeos e é flanqueado em ambos os lados (nas direções 5' e 3') por asas compreendendo 5 nucleotídeos cada. Cada nucleotídeo no segmento em asa 5' e cada nucleotídeo no segmento em asa 3' apresentam uma modificação 2'-MOE. As ligações entre nucleosídeos em cada Gap-mer são ligações fosforotioato (P=S). Todos os resíduos de citidina em cada Gap-mer são 5-metilcitidinas. O "sítio inicial alvo" indica o principal nucleotídeo 5' no qual o Gap-mer é alvejado. "Sítio de parada alvo" indica o principal nucleotídeo 3' no qual o Gap-mer é alvejado. Cada Gap-mer listado na tabela 1 é alvejado em SEQ ID NO: 1 (acesso ao GENBANK No. NM\_000128.3) e cada Gap-mer listado na

tabela 2 é alvejado em SEQ ID NO: 2 (acesso ao GENBANK No. NT\_022792.17, truncado de 19598000 a 19624000).

### Tabela 1

[00290] Inibição de níveis de RNAm do fator 11 humano por oligonucleotídeos anti-sentido quiméricos com asas 5-10-5 MOE e intervalo desóxi alvejado em SEQ ID NO: 1

Oligo ID	Sítio inicial alvo	Sítio de parada alvo	Sequência	inibição %	SEQ ID NO
412187	38	57	TTCAAACAAGTGACATACAC	21	15
412188	96	115	TGAGAGAATTGCTTGCTTTC	21	16
412189	106	125	AAATATACCTTGAGAGAATT	8	17
412190	116	135	AGTATGTCAGAAATATACCT	24	18
412191	126	145	TTAAAATCTTAGTATGTCAG	14	19
412192	146	165	CAGCATATTTGTGAAAGTCG	44	20
412193	222	241	TGTGTAGGAAATGGTCACTT	38	21
412194	286	305	TGCAATTCTTAATAAGGGTG	80	22
412195	321	340	AAATCATCCTGAAAAGACCT	22	23
412196	331	350	TGATATAAGAAAATCATCCT	25	24
412197	376	395	ACACATTCAACCAGAAACTGA	45	25
412198	550	569	TTCAGGACACAAGTAAACCA	21	26
412199	583	602	TTCCTCTTGGCAGTGTTTC	66	27
412200	612	631	AAGAATACCCAGAAATCGCT	59	28
412201	622	641	CATTGCTTGAAAGAATACCC	66	29
412202	632	651	TTGGTGTGAGCATTGCTTGA	65	30
412203	656	675	AATGTCTTTGTTGCAAGCGC	91	31
412204	676	695	TTCATGTCTAGGTCCACATA	74	32
412205	686	705	GTTTATGCCCTTCATGTCTA	69	33
412206	738	757	CCGTGCATCTTTCTTGGCAT	87	34
412207	764	783	CGTGAAAAAGTGGCAGTGGA	64	35
412208	811	830	AGACAAATGTTACGATGCTC	73	36
412209	821	840	GTGCTTCAGTAGACAAATGT	91	37
412210	896	915	TGCACAGGATTTCAAGTGAAA	73	38
412211	906	925	GATTAGAAAGTGCACAGGAT	64	39
412212	1.018	1037	CCGGGATGATGAGTGCAGAT	88	40
412213	1028	1047	AAACAAGCAACCGGGATGAT	71	41
412214	1048	1067	TCCTGGGAAAAGAAGGTAAA	58	42
412215	1.062	1081	ATTCTTTGGGCCATTCCTGG	81	43
412216	1077	1096	AAAGATTTCTTTGAGATTCT	43	44
412217	1105	1124	AATCCACTCTCAGATGTTTT	47	45

412218	1146	1165	AACCAGAAAGAGCTTTGCTC	27	46
412219	1188	1207	GGCAGAACTGGGATGCTG	56	47
412220	1204	1223	TGGTAAAATGAAGAATGGCA	58	48
412221	1214	1233	ATCAGTGTCATGGTAAAATG	48	49
412222	1241	1263	AACAATATCCAGTTCTTCTC	5	50
412223	1.275	1294	ACAGTTTCTGGCAGGCCTCG	84	51
412224	1285	1304	GCATTGGTGCACAGTTTCTG	87	52
412225	1295	1314	GCAGCGGACGGCATTGGTGC	86	53
412226	1371	1390	TTGAAGAAAGCTTTAAGTAA	17	54
412227	1391	1410	AGTATTTTAGTTGGAGATCC	75	55
412228	1425	1444	ATGTGTATCCAGAGATGCCT	71	56
412229	1456	1475	GTACACTCATTATCCATTTT	64	57
412230	1466	1485	GATTTTGGTGGTACACTCAT	52	58
412231	1476	1495	TCCTGGGCTTGATTTTGGTG	74	59
412232	1513	1532	GGCCACTCACCACGAACAGA	80	60
412233	1555	1574	TGTCTCTGAGTGGGTGAGGT	64	61
412234	1583	1602	GTTTCCAATGATGGAGCCTC	60	62
412235	1593	1612	ATATCCACTGGTTTCCAATG	57	63
412236	1618	1637	CCATAGAAACAGTGAGCGGC	72	64
412237	1628	1647	TGACTCTACCCCATAGAAAC	48	65
412238	1642	1661	CGCAAAATCTTAGGTGACTC	71	66
412239	1673	1692	TTCAGATTGATTTAAAATGC	43	67
412240	1705	1724	TGAACCCCAAAGAAAGATGT	32	68
412241	1715	1734	TATTATTTCTTGAACCCCAA	41	69
412242	1765	1784	AACAAGGCAATATCATACCC	49	70
412243	1775	1794	TTCCAGTTTCAACAAGGCAA	70	71
412244	1822	1841	GAAGGCAGGCATATGGGTCG	53	72
412245	1936	1955	GTCACTAAGGGTATCTTGGC	75	73
412246	1992	2011	AGATCATCTTATGGGTTATT	68	74
412247	2002	2021	TAGCCGGCACAGATCATCTT	75	75
412248	2082	2101	CCAGATGCCAGACCTCATTG	53	76
412249	2195	2214	CATTCACACTGCTTGAGTTT	55	77
412250	2268	2287	TGGCACAGTGAACCTAACAC	63	78
412251	2326	2345	CTAGCATTTTCTTACAAACA	58	79
412252	2450	2469	TTATGGTAATTCTTGGACTC	39	80
412253	2460	2479	AAATATTGCCTTATGGTAAT	20	81
412254	2485	2504	TATCTGCCTATATAGTAATC	16	82
412255	2510	2529	GCCACTACTTGGTTATTTTC	38	83
412256	2564	2583	AACAAATCTATTTATGGTGG	39	84
412257	2622	2641	CTGCAAAATGGTGAAGACTG	57	85
412258	2632	2651	GTGTAGATTCCTGCAAAATG	44	86
412259	2882	2901	TTTTCAGGAAAGTGTATCTT	37	87
412260	2892	2911	CACAAATCATTTTTTCAGGAA	27	88
412261	2925	2944	TCCAAGATATTTTAAATAA	3	89

412262	3168	3187	AATGAGATAAATATTTGCAC	34	90
412263	3224	3243	TGAAAGCTATGTGGTGACAA	33	91
412264	3259	3278	CACACTTGATGAATTGTATA	27	92
413460	101	120	TACCTTGAGAGAATTGCTTG	40	93
413461	111	130	GTCAGAAATATACCTTGAGA	39	94
413462	121	140	ATCTTAGTATGTCAGAAATA	12	95
413463	381	400	GAGTCACACATTCACCAGAA	74	96
413464	627	646	GTGAGCATTGCTTGAAAGAA	42	97
413465	637	656	CTTATTTGGTGTGAGCATTG	80	98
413466	661	680	ACATAAATGTCTTTGTTGCA	79	99
413467	666	685	GGTCCACATAAATGTCTTTG	91	100
413468	671	690	GTCTAGGTCCACATAAATGT	84	101
413469	681	700	TGCCCTTCATGTCTAGGTCC	84	102
413470	692	711	GTTATAGTTTATGCCCTTCA	72	103
413471	816	835	TCAGTAGACAAATGTTACGA	67	104
413472	826	845	TGGGTGTGCTTCAGTAGACA	99	105
413473	911	930	AGCCAGATTAGAAAGTGCAC	80	106
413474	1023	1.042	AGCAACCGGGATGATGAGTG	84	107
413475	1053	1072	GCCATTCTTGGGAAAAGAAG	80	108
413476	1067	1086	TTGAGATTCTTTGGGCCATT	88	109
413477	1151	1170	ACTGAAACCAGAAAGAGCTT	54	110
413478	1193	1212	AGAATGGCAGAACACTGGGA	53	111
413479	1209	1228	TGTCATGGTAAAATGAAGAA	40	112
413480	1219	1238	AAGAAATCAGTGTCTATGGTA	71	113
413481	1280	1299	GGTGCACAGTTTCTGGCAGG	86	114
413482	1290	1309	GGACGGCATTGGTGCACAGT	85	115
413483	1300	1319	AACTGGCAGCGGACGGCATT	78	116
413484	1430	1449	CCTTAATGTGTATCCAGAGA	74	117
413485	1461	1480	TGGTGGTACACTCATTATCC	68	118
413486	1471	1490	GGCTTGATTTTGGTGGTACA	83	119
413487	1481	1500	AACGATCCTGGGCTTGATTT	57	120
413488	1560	1579	ACAGGTGTCTCTGAGTGGGT	49	121
413489	1588	1607	CACTGGTTTCCAATGATGGA	68	122
413490	1623	1642	CTACCCCATAGAAACAGTGA	57	123
413491	1633	1652	TTAGGTGACTCTACCCCATTA	73	124
413492	1647	1666	AGACACGCAAAATCTTAGGT	68	125
413493	1710	1729	TTTCTTGAACCCCAAAGAAA	65	126
413494	1780	1799	GTGGTTTCCAGTTTCAACAA	70	127
413495	1921	1940	TTGGCTTTCTGGAGAGTATT	58	128
413496	1997	2016	GGCACAGATCATCTTATGGG	72	129
413497	2627	2646	GATTCCTGCAAAATGGTGAA	39	130
413498	2637	2656	GCAGAGTGTAGATTCTTGCA	60	131
413499	2887	2906	ATCATTTTTTCAGGAAAGTGT	52	132

**Tabela 2**

[00291] Inibição de níveis de RNAm do fator 11 humano por oligonucleotídeos anti-sentido quiméricos com asas 5-10-5 MOE e intervalo desóxi alvejado em SEQ ID NO: 2

Oligo ID	Sítio inicial alvo	Sítio de parada alvo	Sequência	inibição %	SEQ ID NO
413500	1658	1677	GTGAGACAAATCAAGACTTC	15	133
413501	2159	2178	TTAGTTTACTGACACTAAGA	23	134
413502	2593	2612	CTGCTTTATGAAAAACCAAC	22	135
413503	3325	3344	ATACCTAGTACAATGTAAAT	29	136
413504	3548	3567	GGCTTGTGTGTGGTCAATAT	54	137
413505	5054	5073	TGGGAAAGCTTTCATATTC	57	138
413506	6474	6493	ATGGAATTGTGCTTATGAGT	57	139
413507	7590	7609	TTTCAAGCTCAGGATGGGAA	55	140
413508	7905	7924	GTTGGTAAAATGCAACCAAA	64	141
413509	8163	8182	TCAGGACACAAGTAAACCTG	66	142
413510	9197	9216	TGCAAGCTGGAAATAAAAGC	17	143
413511	9621	9640	TGCCAATTATAAAAGTGTAGC	43	144
413512	9800	9819	ATATTTCAAATCCAGTATG	39	145
413513	9919	9938	TTCTGAATATACAAATTAAT	27	146
413514	9951	9970	TTTACTATGAAAATCTAAAT	5	147
413515	11049	11068	GGTATCCTGAGTGAGATCTA	36	148
413516	11269	11288	CCAGCTATCAGGAAAATTCC	50	149
413517	12165	12184	AAAGCTATTGGAGACTCAGA	51	150
413518	12584	12603	ATGGAATCTCTTCATTTTCAT	49	151
413519	12728	12747	ATGGAGACATTCATTTCCAC	59	152
413520	13284	13303	GCTCTGAGAGTTCCAATTCA	52	153
413521	14504	14523	CTGGGAAGGTGAATTTTGTAG	62	154
413522	14771	14790	TCAAGAGTCTTCATGCTACC	42	155
413523	15206	15225	TCAGTTTACCTGGGATGCTG	61	156
413524	15670	15689	GACATTATACTCACCATTAT	7	157
413525	15905	15924	GTATAAATGTGTCAAATTAA	43	158
413526	16482	16501	GTAAAGTTTACCTTAACCT	47	159
413527	17298	17317	CCATAATGAAGAAGGAAGGG	52	160
413528	17757	17776	TTAAGTTACATTGTAGACCA	48	161
413529	18204	18223	TGTGTGGGTCTGAAATTCT	52	162
413530	18981	19000	ATCTTGTAATTACACACCCC	27	163
413531	19174	19193	GTACACTCTGCAACAGAAGC	47	164
413532	19604	19623	AGGGAATAACATGAAGGCCC	32	165
413533	20936	20955	ATCCAGTTCACCATTGGAGA	48	166
413534	21441	21460	TTTTCAGAAAGAGACTCTTC	31	167

413535	21785	21804	GTCACATT TAAAATTTCCAA	41	168
413536	23422	23441	TTAATATACTGCAGAGAACC	37	169
413537	25893	25912	AGAAATATCCCCAGACAGAG	16	170

**Exemplo 2: Inibição anti-sentido dose-dependente de fator 11 humano em células HepG2**

[00292] Doze Gap-mers, que exibem em 8 por cento ou mais a inibição de fator 11 humano *in vitro*, foram testados em várias doses em células HepG2. As células foram plaqueadas em uma densidade de 10.000 células por poço e transfectadas usando reagente lipofectina com concentrações de oligonucleotídeo anti-sentido 9,375nM, 18,75 nM, 37,5 nM, 75 nM e 150 nM, da maneira especificada na tabela 3. Após um período de tratamento de aproximadamente 16 horas, o RNA foi isolado das células e os níveis do RNAm do fator 11 foram medidos por PCR em tempo real quantitativa. O conjunto de sonda do oligonucleotídeo iniciador do fator 11 humano RTS 2966 (sequência sentido: CAGCCTGGAGCATCGTAACA, aqui incorporada como SEQ ID NO: 3; sequência reversa: TTTATCGAGCTTCGTTATTCTGGTT, aqui incorporada como SEQ ID NO: 4; sequência da sonda: TTGTCTACTGAAGCACACCCAAACAGGGAX, aqui incorporada como SEQ ID NO: 5) foi usado para medir os níveis de RNAm. Os níveis do RNAm do fator 11 foram ajustados de acordo com o teor de RNA total, da maneira medida por RIBOGREEN. Os resultados são apresentados como inibição percentual do fator 11, com relação às células controle não tratadas. Da maneira ilustrada na tabela 3, os níveis de RNAm do fator 11 foram reduzidos de uma maneira dependente da dose em células tratadas com oligonucleotídeo anti-sentido.

**Tabela 3**

[00293] Inibição anti-sentido dose-dependente de fator 11 humano em células HepG2

	9,375 nM	18,75 nM	37,5 nM	75 nM	150 nM	IC <sub>50</sub> (nM)	SEQ ID No.
412203	29	15	61	77	82	33	31
412206	28	44	68	80	89	22	34
412212	28	45	59	73	88	25	40
412223	33	48	62	76	81	21	51
412224	24	45	57	70	81	28	52
412225	32	42	65	78	73	23	53
413467	2	35	49	61	47	43	100
413468	14	34	56	78	75	35	101
413469	24	33	53	70	84	33	102
413476	26	44	64	73	82	25	109
413481	22	38	56	67	83	32	114
413482	26	39	59	74	82	28	115

**Exemplo 3: Inibição anti-sentido de fator 11 humano em células HepG2 por oligonucleotídeos projetados por micro caminhada**

[00294] Gap-mers adicionais foram projetados com base nos Gap-mers apresentados na tabela 3. Estes Gap-mers foram desenhados criando Gap-mers deslocados levemente à montante e à jusante (isto é, “micro caminhada”) dos Gap-mers originais da tabela 3. Os Gap-mers foram também criados com vários motivos, por exemplo, 5-10-5 MOE, 3-14-3 MOE e 2-13-5 MOE. Estes Gap-mers foram testados *in vitro*. As células HepG2 cultivadas em uma densidade de 10.000 células por poço foram transfectadas usando reagente lipofectina com oligonucleotídeo anti-sentido 75 nM. Após um período de tratamento de aproximadamente 24 horas, o RNA foi isolado das células e os níveis do RNAm do fator 11 foram medidos por PCR em tempo real quantitativa. Os níveis do RNAm do fator 11 foram ajustados de acordo com o teor de RNA total, da maneira medida por RIBOGREEN. Os resultados são apresentados como inibição percentual do fator 11, com relação às células controle não tratadas.



[00295] Os dados de inibição *in vitro* para os Gap-mers designados por micro caminhada foram então comparados com os dados de inibição *in vitro* para os Gap-mers da tabela 3, da maneira indicada nas tabelas 4, 5, 6, 7, e 8. Os oligonucleotídeos são exibidos de acordo com a região no RNAm humano (acesso ao GENBANK No. NM\_000128.3) na qual eles foram mapeados.

[00296] Os oligonucleotídeos anti-sentido quiméricos na tabela 4 foram designados como Gap-mers 5-10-5 MOE, 3-14-3 MOE e 2-13-5 MOE. Os primeiros Gap-mers listados na tabela 4 são os Gap-mers originais (ver tabela 3), a partir dos quais os Gap-mers restantes foram projetados por meio da micro caminhada e são designados por um asterisco. Os Gap-mers 5-10-5 apresentam 20 nucleotídeos de comprimento, em que o segmento central de intervalo é compreendido de 10 2'-desoxinucleotídeos e é flanqueado em ambos os lados (nas direções 5' e 3') por asas compreendendo 5 nucleotídeos cada. Os Gap-mers 3-14-3 apresentam 20 nucleotídeos de comprimento, em que o segmento central de intervalo é compreendido de 14 2'-desoxinucleotídeos e é flanqueado em ambos os lados (nas direções 5' e 3') por asas compreendendo 3 nucleotídeos cada. Os Gap-mers 2-13-5 apresentam 20 nucleotídeos de comprimento, em que o segmento central de intervalo é compreendido de 13 2'-desoxinucleotídeos. O intervalo central é flanqueado na extremidade 5' com uma asa compreendendo 2 nucleotídeos e na extremidade 3' com uma asa compreendendo 5 nucleotídeos. Para cada um dos motivos (5-10-5, 3-14-3 e 2-13-5), cada nucleotídeo no segmento em asa 5' e cada nucleotídeo no segmento em asa 3' apresentam uma modificação 2'-MOE. As ligações entre nucleosídeos em cada Gap-mer são ligações fosforotioato (P=S). Todos os resíduos de citidina em cada Gap-mer são 5-metilcitidinas. "Sítio inicial alvo" indica o principal nucleotídeo 5' no qual o Gap-mer é alvejado. "Sítio de parada alvo"

indica o principal nucleotídeo 3' no qual o Gap-mer é alvejado. Cada Gap-mer listado na tabela 4 é alvejado em SEQ ID NO: 1 (acesso ao GENBANK No. NM\_000128.3).

[00297] Da maneira mostrada na tabela 4, todos os Gap-mers 5-10-5 MOE, Gap-mers 3-14-3 MOE e Gap-mers 2-13-5 MOE alvejados na região alvo, que começam no sítio inicial alvo 656 e que terminam no sítio de parada alvo 704 (isto é, nucleobases 656-704) de SEQ ID NO: 1, exibem pelo menos 20 % de inibição de RNAm do fator 11. Muitos dos Gap-mers exibem pelo menos 60 % de inibição. Vários dos Gap-mers exibem pelo menos 80 % de inibição, incluindo os números ISIS: 416806, 416809, 416811, 416814, 416821, 416825, 416826, 416827, 416828, 416868, 416869, 416878, 416879, 416881, 416883, 416890, 416891, 416892, 416893, 416894, 416895, 416896, 416945, 416946, 416969, 416970, 416971, 416972, 416973, 412203, 413467, 413468, e 413469. Os números ISIS a seguir exibiram pelo menos 90 % de inibição: 412203, 413467, 416825, 416826, 416827, 416868, 416878, 416879, 416892, 416893, 416895, 416896, 416945, 416972, e 416973. Os números ISIS a seguir exibiram pelo menos 95 % de inibição: 416878, 416892, 416895, e 416896.

#### **Tabela 4**

[00298] Inibição de níveis de RNAm do fator 11 humano por oligonucleotídeos anti-sentido quiméricos alvejados nas nucleobases 656 a 704 de SEQ ID NO: 1 (acesso ao GENBANK No. NM\_000128.3)

No ISIS.	Sítio inicial alvo	Sítio de parada alvo	Sequência (5' para 3')	% de inibição	Motivo	SEQ ID No.
*412203	656	675	AATGTCTTTGTTGCAAGCGC	97	5-10-5	31
*413467	666	685	GGTCCACATAAATGTCTTTG	92	5-10-5	100
*413468	671	690	GTCTAGGTCCACATAAATGT	83	5-10-5	101
*413469	681	700	TGCCCTTCATGTCTAGGTCC	86	5-10-5	102
416868	656	675	AATGTCTTTGTTGCAAGCGC	93	3-14-3	31
416945	656	675	AATGTCTTTGTTGCAAGCGC	94	2-13-5	31
416806	657	676	AAATGTCTTTGTTGCAAGCG	86	5-10-5	171
416869	657	676	AAATGTCTTTGTTGCAAGCG	81	3-14-3	171

416946	657	676	AAATGTCTTTGTTGCAAGCG	86	2-13-5	171
416807	658	677	TAAATGTCTTTGTTGCAAGC	51	5-10-5	172
416870	658	677	TAAATGTCTTTGTTGCAAGC	76	3-14-3	172
416947	658	677	TAAATGTCTTTGTTGCAAGC	62	2-13-5	172
416808	659	678	ATAAATGTCTTTGTTGCAAG	55	5-10-5	173
416871	659	678	ATAAATGTCTTTGTTGCAAG	28	3-14-3	173
416948	659	678	ATAAATGTCTTTGTTGCAAG	62	2-13-5	173
416809	660	679	CATAAATGTCTTTGTTGCAA	86	5-10-5	174
416872	660	679	CATAAATGTCTTTGTTGCAA	20	3-14-3	174
416949	660	679	CATAAATGTCTTTGTTGCAA	64	2-13-5	174
416873	661	680	ACATAAATGTCTTTGTTGCA	51	3-14-3	99
416950	661	680	ACATAAATGTCTTTGTTGCA	71	2-13-5	99
416810	662	681	CACATAAATGTCTTTGTTGC	68	5-10-5	175
416874	662	681	CACATAAATGTCTTTGTTGC	49	3-14-3	175
416951	662	681	CACATAAATGTCTTTGTTGC	48	2-13-5	175
416811	663	682	CCACATAAATGTCTTTGTTG	84	5-10-5	176
416875	663	682	CCACATAAATGTCTTTGTTG	75	3-14-3	176
416952	663	682	CCACATAAATGTCTTTGTTG	51	2-13-5	176
416812	664	682	TCCACATAAATGTCTTTGTT	59	5-10-5	177
416876	664	683	TCCACATAAATGTCTTTGTT	37	3-14-3	177
416953	664	683	TCCACATAAATGTCTTTGTT	45	2-13-5	177
416813	665	684	GTCCACATAAATGTCTTTGT	70	5-10-5	178
416877	665	684	GTCCACATAAATGTCTTTGT	51	3-14-3	178
416954	665	684	GTCCACATAAATGTCTTTGT	61	2-13-5	178
416878	666	685	GGTCCACATAAATGTCTTTG	95	3-14-3	100
416955	666	685	GGTCCACATAAATGTCTTTG	75	2-13-5	100
416814	667	686	AGGTCCACATAAATGTCTTT	83	5-10-5	179
416879	667	686	AGGTCCACATAAATGTCTTT	92	3-14-3	179
416956	667	686	AGGTCCACATAAATGTCTTT	61	2-13-5	179
416815	668	687	TAGGTCCACATAAATGTCTT	63	5-10-5	180
416880	668	687	TAGGTCCACATAAATGTCTT	66	3-14-3	180
416957	668	687	TAGGTCCACATAAATGTCTT	59	2-13-5	180
416816	669	688	CTAGGTCCACATAAATGTCT	79	5-10-5	181
416881	669	688	CTAGGTCCACATAAATGTCT	81	3-14-3	181
416958	669	688	CTAGGTCCACATAAATGTCT	43	2-13-5	181
416817	670	689	TCTAGGTCCACATAAATGTC	74	5-10-5	182
416882	670	689	TCTAGGTCCACATAAATGTC	60	3-14-3	182
416959	670	689	TCTAGGTCCACATAAATGTC	25	2-13-5	182
416883	671	690	GTCTAGGTCCACATAAATGT	82	3-14-3	101
416960	671	690	GTCTAGGTCCACATAAATGT	60	2-13-5	101
416818	672	691	TGTCTAGGTCCACATAAATG	76	5-10-5	183
416884	672	691	TGTCTAGGTCCACATAAATG	69	3-14-3	183
416961	672	691	TGTCTAGGTCCACATAAATG	40	2-13-5	183
416819	673	692	ATGTCTAGGTCCACATAAAT	56	5-10-5	184

416885	673	692	ATGTCTAGGTCCACATAAAT	67	3-14-3	184
416962	673	692	ATGTCTAGGTCCACATAAAT	77	2-13-5	184
416820	674	693	CATGTCTAGGTCCACATAAA	77	5-10-5	185
416886	674	693	CATGTCTAGGTCCACATAAA	74	3-14-3	185
416963	674	693	CATGTCTAGGTCCACATAAA	48	2-13-5	185
416821	675	694	TCATGTCTAGGTCCACATAA	84	5-10-5	186
416964	675	694	TCATGTCTAGGTCCACATAA	69	2-13-5	186
412204	676	695	TTCATGTCTAGGTCCACATA	76	5-10-5	32
416888	676	695	TTCATGTCTAGGTCCACATA	76	3-14-3	32
416965	676	695	TTCATGTCTAGGTCCACATA	53	2-13-5	32
416822	677	696	CTTCATGTCTAGGTCCACAT	76	5-10-5	187
416889	677	696	CTTCATGTCTAGGTCCACAT	60	3-14-3	187
416966	677	696	CTTCATGTCTAGGTCCACAT	64	2-13-5	187
416823	678	697	CCTTCATGTCTAGGTCCACA	77	5-10-5	188
416890	678	697	CCTTCATGTCTAGGTCCACA	87	3-14-3	188
416967	678	697	CCTTCATGTCTAGGTCCACA	75	2-13-5	188
416824	679	698	CCCTTCATGTCTAGGTCCAC	64	5-10-5	189
416891	679	698	CCCTTCATGTCTAGGTCCAC	81	3-14-3	189
416968	679	698	CCCTTCATGTCTAGGTCCAC	73	2-13-5	189
416825	680	699	GCCCTTCATGTCTAGGTCCA	92	5-10-5	190
416892	680	699	GCCCTTCATGTCTAGGTCCA	100	3-14-3	190
416969	680	699	GCCCTTCATGTCTAGGTCCA	80	2-13-5	190
416893	681	700	TGCCCTTCATGTCTAGGTCC	90	3-14-3	102
416970	681	700	TGCCCTTCATGTCTAGGTCC	88	2-13-5	102
416826	682	701	ATGCCCTTCATGTCTAGGTC	94	5-10-5	191
416894	682	701	ATGCCCTTCATGTCTAGGTC	85	3-14-3	191
416971	682	701	ATGCCCTTCATGTCTAGGTC	83	2-13-5	191
416827	683	702	TATGCCCTTCATGTCTAGGT	93	5-10-5	192
416895	683	702	TATGCCCTTCATGTCTAGGT	95	3-14-3	192
416972	683	702	TATGCCCTTCATGTCTAGGT	90	2-13-5	192
416828	684	703	TTATGCCCTTCATGTCTAGG	87	5-10-5	193
416896	684	703	TTATGCCCTTCATGTCTAGG	95	3-14-3	193
416973	684	703	TTATGCCCTTCATGTCTAGG	92	2-13-5	193
416829	685	704	TTTATGCCCTTCATGTCTAG	72	5-10-5	194
416897	685	704	TTTATGCCCTTCATGTCTAG	66	3-14-3	194
416974	685	704	TTTATGCCCTTCATGTCTAG	73	2-13-5	194

[00299] Os oligonucleotídeos anti-sentido quiméricos na tabela 5 foram designados como Gap-mers 5-10-5 MOE, 3-14-3 MOE e 2-13-5 MOE. O primeiro Gap-mer listado na tabela 5 é o Gap-mer original (ver tabela 3), a partir dos quais os Gap-mers restantes foram projetados por meio da micro caminhada, e é designado por um asterisco. Os Gap-mers 5-10-5 apresentam 20 nucleotídeos de comprimento, em

que o segmento central de intervalo é compreendido de 10 2'-desoxinucleotídeos e é flanqueado em ambos os lados (nas direções 5' e 3') por asas compreendendo 5 nucleotídeos cada. Os Gap-mers 3-14-3 apresentam 20 nucleotídeos de comprimento, em que o segmento central de intervalo é compreendido de 14 2'-desoxinucleotídeos e é flanqueado em ambos os lados (nas direções 5' e 3') por asas compreendendo 3 nucleotídeos cada. Os Gap-mers 2-13-5 apresentam 20 nucleotídeos de comprimento, em que o segmento central de intervalo é compreendido de 13 2'-desoxinucleotídeos. O intervalo central é flanqueado na extremidade 5' com uma asa compreendendo 2 nucleotídeos e na extremidade 3' com uma asa compreendendo 5 nucleotídeos. Para cada um dos motivos (5-10-5, 3-14-3, e 2-13-5), cada nucleotídeo no segmento em asa 5' e cada nucleotídeo no segmento em asa 3' apresentam uma modificação 2'-MOE. As ligações entre nucleosídeos em cada Gap-mer são ligações fosforotioato (P=S). Todos os resíduos de citidina em cada Gap-mer são 5-metilcitidinas. "Sítio inicial alvo" indica o principal nucleotídeo 5' no qual o Gap-mer é alvejado. "Sítio de parada alvo" indica o principal nucleotídeo 3' no qual o Gap-mer é alvejado. Cada Gap-mer listado na tabela 5 é alvejado em SEQ ID NO: 1 (acesso ao GENBANK No. NM\_000128.3).

[00300] Da maneira mostrada na tabela 5, todos os Gap-mers 5-10-5 MOE, Gap-mers 3-14-3 MOE, e Gap-mers 2-13-5 MOE alvejados na região alvo, que começam no sítio inicial alvo 738 e que terminam no sítio de parada alvo 762 (isto é, nucleobases 738-762) de SEQ ID NO: 1, exibem pelo menos 45 % de inibição de RNAm do fator 11. A maioria dos Gap-mers exibe pelo menos 60 % de inibição. Vários dos Gap-mers exibem pelo menos 80 % de inibição, incluindo os números ISIS: 412206, 416830, 416831, 416898, 416899, 416900, 416903, 416975, 416976, 416977, e 416980. Os números ISIS a seguir

exibiram pelo menos 90 % de inibição: 412206, 416831, e 416900.

### Tabela 5

[00301] Inibição de níveis de RNAm do fator 11 humano por oligonucleotídeos anti-sentido quiméricos alvejados nas nucleobases 738 a 762 de SEQ ID NO: 1 (acesso ao GENBANK No. NM\_000128.3)

No ISIS.	Sítio inicial alvo	Sítio de parada alvo	Sequência (5' para 3')	% de inibição	Motivo	SEQ ID No.
*412206	738	757	CCGTGCATCTTTCTTGGCA T	93	5-10-5	34
416898	738	757	CCGTGCATCTTTCTTGGCA T	88	3-14-3	34
416975	738	757	CCGTGCATCTTTCTTGGCA T	87	2-13-5	34
416830	739	758	TCCGTGCATCTTTCTTGGC A	81	5-10-5	195
416899	739	758	TCCGTGCATCTTTCTTGGC A	86	3-14-3	195
416976	739	758	TCCGTGCATCTTTCTTGGC A	83	2-13-5	195
416831	740	759	ATCCGTGCATCTTTCTTGG C	91	5-10-5	196
416900	740	759	ATCCGTGCATCTTTCTTGG C	90	3-14-3	196
416977	740	759	ATCCGTGCATCTTTCTTGG C	82	2-13-5	196
416832	741	760	CATCCGTGCATCTTTCTTG G	79	5-10-5	197
416901	741	760	CATCCGTGCATCTTTCTTG G	65	3-14-3	197
416978	741	760	CATCCGTGCATCTTTCTTG G	76	2-13-5	197
416833	742	761	TCATCCGTGCATCTTTCTT G	65	5-10-5	198
416902	742	761	TCATCCGTGCATCTTTCTT G	46	3-14-3	198
416979	742	761	TCATCCGTGCATCTTTCTT G	63	2-13-5	198
416834	743	762	GTCATCCGTGCATCTTTCT T	58	5-10-5	199
416903	743	762	GTCATCCGTGCATCTTTCT T	88	3-14-3	199
416980	743	762	GTCATCCGTGCATCTTTCT T	87	2-13-5	199

[00302] Os oligonucleotídeos anti-sentido quiméricos na tabela 6 foram designados como Gap-mers 5-10-5 MOE, 3-14-3 MOE e 2-13-5 MOE. Os primeiros Gap-mers listados na tabela 6 são os Gap-mers originais (ver tabela 3), a partir dos quais os Gap-mers restantes foram projetados por meio da micro caminhada e são designados por um

asterisco. Os Gap-mers 5-10-5 apresentam 20 nucleotídeos de comprimento, em que o segmento central de intervalo é compreendido de 10 2'-desoxinucleotídeos e é flanqueado em ambos os lados (nas direções 5' e 3') por asas compreendendo 5 nucleotídeos cada. Os Gap-mers 3-14-3 apresentam 20 nucleotídeos de comprimento, em que o segmento central de intervalo é compreendido de 14 2'-desoxinucleotídeos e é flanqueado em ambos os lados (nas direções 5' e 3') por asas compreendendo 3 nucleotídeos cada. Os Gap-mers 2-13-5 apresentam 20 nucleotídeos de comprimento, em que o segmento central de intervalo é compreendido de 13 2'-desoxinucleotídeos. O intervalo central é flanqueado na extremidade 5' com uma asa compreendendo 2 nucleotídeos e na extremidade 3' com uma asa compreendendo 5 nucleotídeos. Para cada um dos motivos (5-10-5, 3-14-3, e 2-13-5), cada nucleotídeo no segmento em asa 5' e cada nucleotídeo no segmento em asa 3' apresentam uma modificação 2'-MOE. As ligações entre nucleosídeos em cada Gap-mer são ligações fosforotioato (P=S). Todos os resíduos de citidina em cada Gap-mer são 5-metilcitidinas. "Sítio inicial alvo" indica o principal nucleotídeo 5' no qual o Gap-mer é alvejado. "Sítio de parada alvo" indica o principal nucleotídeo 3' no qual o Gap-mer é alvejado. Cada Gap-mer listado na tabela 6 é alvejado em SEQ ID NO: 1 (acesso ao GENBANK No. NM\_000128.3).

[00303] Da maneira mostrada na tabela 6, todos os Gap-mers 5-10-5 MOE, Gap-mers 3-14-3 MOE, e Gap-mers 2-13-5 MOE alvejados na região alvo, que começam no sítio inicial alvo 1.018 e que terminam no sítio de parada alvo 1.042 (isto é, nucleobases 1.018-1.042) de SEQ ID NO: 1, exibem pelo menos 80 % de inibição de RNAm do fator 11. Os números ISIS a seguir exibiram pelo menos 90 % de inibição: 413474, 416837, 416838, 416904, 416907, e 416908.

**Tabela 6**

[00304] Inibição de níveis de RNAm do fator 11 humano por oligonucleotídeos anti-sentido quiméricos alvejados nas nucleobases 1.018 a 1.042 de SEQ ID NO: 1 (acesso ao GENBANK No. NM\_000128.3)

No ISIS.	Sítio inicial alvo	Sítio de parada alvo	Sequência (5' para 3')	% inibição	Motiv o	SEQ ID No.
*412212	1018	1037	CCGGGATGATGAGTGCAGA T	89	5-10-5	40
416904	1018	1037	CCGGGATGATGAGTGCAGA T	90	3-14-3	40
416981	1018	1037	CCGGGATGATGAGTGCAGA T	87	2-13-5	40
416835	1019	1038	ACCGGGATGATGAGTGCAG A	83	5-10-5	200
416905	1019	1038	ACCGGGATGATGAGTGCAG A	85	3-14-3	200
416982	1019	1038	ACCGGGATGATGAGTGCAG A	84	2-13-5	200
416836	1020	1039	AACCGGGATGATGAGTGCA G	89	5-10-5	201
416906	1020	1039	AACCGGGATGATGAGTGCA G	88	3-14-3	201
416983	1020	1039	AACCGGGATGATGAGTGCA G	86	2-13-5	201
416837	1021	1040	CAACCGGGATGATGAGTGC A	90	5-10-5	202
416907	1021	1040	CAACCGGGATGATGAGTGC A	90	3-14-3	202
416984	1021	1040	CAACCGGGATGATGAGTGC A	89	2-13-5	202
416838	1022	1041	GCAACCGGGATGATGAGTG C	94	5-10-5	203
416908	1022	1041	GCAACCGGGATGATGAGTG C	98	3-14-3	203
416985	1022	1041	GCAACCGGGATGATGAGTG C	88	2-13-5	203
413474	1023	1042	AGCAACCGGGATGATGAGT G	93	5-10-5	107

[00305] Os oligonucleotídeos anti-sentido quiméricos na tabela 7 foram designados como Gap-mers 5-10-5 MOE, 3-14-3 MOE e 2-13-5 MOE. O primeiro Gap-mer listado na tabela 7 é o Gap-mer original (ver tabela 3), a partir dos quais os Gap-mers restantes foram projetados por meio da micro caminhada, e é designado por um asterisco. Os Gap-mers 5-10-5 apresentam 20 nucleotídeos de comprimento, em que o segmento central de intervalo é compreendido de 10 2'-



desoxinucleotídeos e é flanqueado em ambos os lados (nas direções 5' e 3') por asas compreendendo 5 nucleotídeos cada. Os Gap-mers 3-14-3 apresentam 20 nucleotídeos de comprimento, em que o segmento central de intervalo é compreendido de 14 2'-desoxinucleotídeos e é flanqueado em ambos os lados (nas direções 5' e 3') por asas compreendendo 3 nucleotídeos cada. Os Gap-mers 2-13-5 apresentam 20 nucleotídeos de comprimento, em que o segmento central de intervalo é compreendido de 13 2'-desoxinucleotídeos. O intervalo central é flanqueado na extremidade 5' com uma asa compreendendo 2 nucleotídeos e na extremidade 3' com uma asa compreendendo 5 nucleotídeos. Para cada um dos motivos (5-10-5, 3-14-3, e 2-13-5), cada nucleotídeo no segmento em asa 5' e cada nucleotídeo no segmento em asa 3' apresentam uma modificação 2'-MOE. As ligações entre nucleosídeos em cada Gap-mer são ligações fosforotioato (P=S). Todos os resíduos de citidina em cada Gap-mer são 5-metilcitidinas. "Sítio inicial alvo" indica o principal nucleotídeo 5' no qual o Gap-mer é alvejado. "Sítio de parada alvo" indica o principal nucleotídeo 3' no qual o Gap-mer é alvejado. Cada Gap-mer listado na tabela 7 é alvejado em SEQ ID NO: 1 (acesso ao GENBANK No. NM\_000128.3).

[00306] Da maneira mostrada na tabela 7, todos os Gap-mers 5-10-5 MOE, Gap-mers 3-14-3 MOE, e Gap-mers 2-13-5 MOE alvejados na região alvo, que começam no sítio inicial alvo 1.062 e que terminam no sítio de parada alvo 1.091 (isto é, nucleobases 1.062-1.091) de SEQ ID NO: 1, exibem pelo menos 20 % de inibição de RNAm do fator 11. Muitos dos Gap-mers exibem pelo menos 50 % de inibição, incluindo: 412215, 413476, 413476, 416839, 416840, 416841, 416842, 416843, 416844, 416845, 416846, 416847, 416909, 416910, 416911, 416912, 416913, 416914, 416915, 416916, 416917, 416918, 416986, 416987, 416988, 416989, 416990, 416991, 416992, 416993, 416994, 416995.

Os números ISIS a seguir exibiram pelo menos 80 % de inibição: 412215, 413476, 413476, 416839, 416840, 416841, 416842, 416843, 416844, 416845, 416910, 416911, 416912, 416913, 416914, 416916, 416917, 416986, 416987, 416989, 416991, 416992, 416993, e 416994. Os números ISIS a seguir exibiram pelo menos 90 % de inibição: 413476, 413476, 416842, 416844, 416910, 416911, 416912, 416913, 416916, 416917, e 416993.

### Tabela 7

[00307] Inibição de níveis de RNAm do fator 11 humano por oligonucleotídeos anti-sentido quiméricos alvejados nas nucleobases 1.062 a 1.091 de SEQ ID NO: 1 (acesso ao GENBANK No. NM\_000128.3)

No ISIS.	Sítio inicial alvo	Sítio de parada alvo	Sequência (5' para 3')	% de inibição	Motivo	SEQ ID No.
*413476	1067	1086	TTGAGATTCTTTGGGCCATT	93	5-10-5	109
412215	1062	1081	ATTCTTTGGGCCATTCTGG	82	5-10-5	43
416909	1062	1081	ATTCTTTGGGCCATTCTGG	78	3-14-3	43
416986	1062	1081	ATTCTTTGGGCCATTCTGG	88	2-13-5	43
416839	1063	1082	GATTCTTTGGGCCATTCTG	89	5-10-5	204
416910	1063	1082	GATTCTTTGGGCCATTCTG	90	3-14-3	204
416987	1063	1082	GATTCTTTGGGCCATTCTG	80	2-13-5	204
416840	1064	1083	AGATTCTTTGGGCCATTCT	85	5-10-5	205
416911	1064	1083	AGATTCTTTGGGCCATTCT	90	3-14-3	205
416988	1064	1083	AGATTCTTTGGGCCATTCT	76	2-13-5	205
416841	1065	1084	GAGATTCTTTGGGCCATTCC	87	5-10-5	206
416912	1065	1084	GAGATTCTTTGGGCCATTCC	92	3-14-3	206
416989	1065	1084	GAGATTCTTTGGGCCATTCC	88	2-13-5	206
416842	1066	1085	TGAGATTCTTTGGGCCATTC	94	5-10-5	207
416913	1066	1085	TGAGATTCTTTGGGCCATTC	93	3-14-3	207
416990	1066	1085	TGAGATTCTTTGGGCCATTC	76	2-13-5	207
413476	1067	1086	TTGAGATTCTTTGGGCCATT	93	5-10-5	109
416914	1067	1086	TTGAGATTCTTTGGGCCATT	87	3-14-3	109
416991	1067	1086	TTGAGATTCTTTGGGCCATT	87	2-13-5	109
416843	1068	1087	TTTGAGATTCTTTGGGCCAT	89	5-10-5	208
416915	1068	1087	TTTGAGATTCTTTGGGCCAT	79	3-14-3	208
416992	1068	1087	TTTGAGATTCTTTGGGCCAT	84	2-13-5	208
416844	1069	1088	CTTTGAGATTCTTTGGGCCA	90	5-10-5	209
416916	1069	1088	CTTTGAGATTCTTTGGGCCA	91	3-14-3	209

416993	1069	1088	CTTTGAGATTCTTTGGGCCA	91	2-13-5	209
416845	1070	1089	TCTTTGAGATTCTTTGGGCC	86	5-10-5	210
416917	1070	1089	TCTTTGAGATTCTTTGGGCC	92	3-14-3	210
416994	1070	1089	TCTTTGAGATTCTTTGGGCC	83	2-13-5	210
416846	1071	1090	TTCTTTGAGATTCTTTGGGC	72	5-10-5	211
416918	1071	1090	TTCTTTGAGATTCTTTGGGC	63	3-14-3	211
416995	1071	1090	TTCTTTGAGATTCTTTGGGC	64	2-13-5	211
416847	1072	1091	TTTCTTTGAGATTCTTTGGG	50	5-10-5	212
416919	1072	1091	TTTCTTTGAGATTCTTTGGG	27	3-14-3	212
416996	1072	1091	TTTCTTTGAGATTCTTTGGG	22	2-13-5	212

[00308] Os oligonucleotídeos anti-sentido quiméricos na tabela 8 foram designados como Gap-mers 5-10-5 MOE, 3-14-3 MOE e 2-13-5 MOE. Os primeiros Gap-mers listados na tabela 8 são os Gap-mers originais (ver tabela 3), a partir dos quais os Gap-mers restantes foram projetados por meio da micro caminhada e são designados por um asterisco. Os Gap-mers 5-10-5 apresentam 20 nucleotídeos de comprimento, em que o segmento central de intervalo é compreendido de 10 2'-desoxinucleotídeos e é flanqueado em ambos os lados (nas direções 5' e 3') por asas compreendendo 5 nucleotídeos cada. Os Gap-mers 3-14-3 apresentam 20 nucleotídeos de comprimento, em que o segmento central de intervalo é compreendido de 14 2'-desoxinucleotídeos e é flanqueado em ambos os lados (nas direções 5' e 3') por asas compreendendo 3 nucleotídeos cada. Os Gap-mers 2-13-5 apresentam 20 nucleotídeos de comprimento, em que o segmento central de intervalo é compreendido de 13 2'-desoxinucleotídeos. O intervalo central é flanqueado na extremidade 5' com uma asa compreendendo 2 nucleotídeos e na extremidade 3' com uma asa compreendendo 5 nucleotídeos. Para cada um dos motivos (5-10-5, 3-14-3, e 2-13-5), cada nucleotídeo no segmento em asa 5' e cada nucleotídeo no segmento em asa 3' apresentam uma modificação 2'-MOE. As ligações entre nucleosídeos em cada Gap-mer são ligações fosforotioato (P=S). Todos os resíduos de citidina em cada Gap-mer são 5-metilcitidinas. "Sítio inicial alvo" indica o principal

nucleotídeo 5' no qual o Gap-mer é alvejado. "Sítio de parada alvo" indica o principal nucleotídeo 3' no qual o Gap-mer é alvejado. Cada Gap-mer listado na tabela 8 é alvejado em SEQ ID NO: 1 (acesso ao GENBANK No. NM\_000128.3).

[00309] Da maneira mostrada na tabela 8, todos os Gap-mers 5-10-5 MOE, Gap-mers 3-14-3 MOE, e Gap-mers 2-13-5 MOE alvejados na região alvo, que começam no sítio inicial alvo 1.275 e que terminam no sítio de parada alvo 1.318 (isto é, nucleobases 1.275-1.318) de SEQ ID NO: 1, exibem pelo menos 70 % de inibição de RNAm do fator 11. Muitos dos Gap-mers exibem pelo menos 80 % de inibição, incluindo: 412223, 412224, 412225, 413482, 416848, 416849, 416850, 416851, 416852, 416853, 416854, 416855, 416856, 416857, 416858, 416859, 416860, 416861, 416862, 416863, 416864, 416865, 416866, 416867, 416920, 416921, 416922, 416923, 416924, 416925, 416926, 416927, 416928, 416929, 416930, 416931, 416932, 416933, 416934, 416935, 416936, 416937, 416938, 416939, 416940, 416941, 416942, 416943, 416944, 416997, 416998, 416999, 417000, 417001, 417002, 417003, 417004, 417006, 417007, 417008, 417009, 417010, 417011, 417013, 417014, 417015, 417016, 417017, 417018, 417019, e 417020. Os números ISIS a seguir exibiram pelo menos 90 % de inibição: 412224, 416850, 416853, 416856, 416857, 416858, 416861, 416862, 416864, 416922, 416923, 416924, 416925, 416926, 416928, 416931, 416932, 416933, 416934, 416935, 416937, 416938, 416940, 416941, 416943, 416999, 417002, 416854, e 416859.

### **Tabela 8**

[00310] Inibição de níveis de RNAm do fator 11 humano por oligonucleotídeos anti-sentido quiméricos alvejados nas nucleobases 1.275 a 1.318 de SEQ ID NO: 1 (acesso ao GENBANK No. NM\_000128.3)

No ISIS.	Sítio inicial alvo	Sítio de parada alvo	Sequência (5' para 3')	% de inibição	Motivo	SEQ ID No.
*412223	1275	1294	ACAGTTTCTGGCAGGCCTCG	85	5-10-5	51

*412224	1285	1304	GCATTGGTGCACAGTTTCTG	93	5-10-5	52
*413482	1290	1309	GGACGGCATTGGTGCACAGT	89	5-10-5	115
*412225	1295	1314	GCACGGACGGCATTGGTGC	86	5-10-5	53
416920	1275	1294	ACAGTTTCTGGCAGGCCTCG	88	3-14-3	51
416997	1275	1294	ACAGTTTCTGGCAGGCCTCG	84	2-13-5	51
416848	1276	1295	CACAGTTTCTGGCAGGCCTC	86	5-10-5	213
416921	1276	1295	CACAGTTTCTGGCAGGCCTC	88	3-14-3	213
416998	1276	1295	CACAGTTTCTGGCAGGCCTC	88	2-13-5	213
416849	1277	1296	GCACAGTTTCTGGCAGGCCT	88	5-10-5	214
416922	1277	1294	GCACAGTTTCTGGCAGGCCT	94	3-14-3	214
416999	1277	1296	GCACAGTTTCTGGCAGGCCT	92	2-13-5	214
416850	1278	1297	TGCACAGTTTCTGGCAGGCC	93	5-10-5	215
416923	1278	1297	TGCACAGTTTCTGGCAGGCC	96	3-14-3	215
417000	1278	1297	TGCACAGTTTCTGGCAGGCC	89	2-13-5	215
416851	1279	1298	GTGCACAGTTTCTGGCAGGC	88	5-10-5	216
416924	1279	1298	GTGCACAGTTTCTGGCAGGC	96	3-14-3	216
417001	1279	1298	GTGCACAGTTTCTGGCAGGC	83	2-13-5	216
416925	1280	1299	GGTGCACAGTTTCTGGCAGG	98	3-14-3	114
417002	1280	1299	GGTGCACAGTTTCTGGCAGG	92	2-13-5	114
416852	1281	1300	TGGTGCACAGTTTCTGGCAG	84	5-10-5	217
416926	1281	1300	TGGTGCACAGTTTCTGGCAG	93	3-14-3	217
417003	1281	1300	TGGTGCACAGTTTCTGGCAG	89	2-13-5	217
416853	1282	1301	TTGGTGCACAGTTTCTGGCA	91	5-10-5	218
416927	1282	1301	TTGGTGCACAGTTTCTGGCA	87	3-14-3	218
417004	1282	1301	TTGGTGCACAGTTTCTGGCA	86	2-13-5	218
416854	1283	1302	ATTGGTGCACAGTTTCTGGC	90	5-10-5	219
416928	1283	1302	ATTGGTGCACAGTTTCTGGC	91	3-14-3	219
417005	1283	1302	ATTGGTGCACAGTTTCTGGC	79	2-13-5	219
416855	1.284	1303	CATTGGTGCACAGTTTCTGG	87	5-10-5	220
416929	1.284	1303	CATTGGTGCACAGTTTCTGG	83	3-14-3	220
417006	1.284	1303	CATTGGTGCACAGTTTCTGG	81	2-13-5	220
416930	1285	1304	GCATTGGTGCACAGTTTCTG	87	3-14-3	52
417007	1285	1304	GCATTGGTGCACAGTTTCTG	82	2-13-5	52
416856	1286	1305	GGCATTGGTGCACAGTTTCT	95	5-10-5	221
416931	1286	1305	GGCATTGGTGCACAGTTTCT	96	3-14-3	221
417008	1286	1305	GGCATTGGTGCACAGTTTCT	82	2-13-5	221
416857	1287	1306	CGGCATTGGTGCACAGTTTC	92	5-10-5	222
416932	1287	1306	CGGCATTGGTGCACAGTTTC	92	3-14-3	222
417009	1287	1306	CGGCATTGGTGCACAGTTTC	85	2-13-5	222
416858	1288	1307	ACGGCATTGGTGCACAGTTT	93	5-10-5	223
416933	1288	1307	ACGGCATTGGTGCACAGTTT	92	3-14-3	223
417010	1288	1307	ACGGCATTGGTGCACAGTTT	81	2-13-5	223
416859	1289	1308	GACGGCATTGGTGCACAGTT	90	5-10-5	224
416934	1289	1308	GACGGCATTGGTGCACAGTT	90	3-14-3	224

417011	1289	1308	GACGGCATTGGTGCACAGTT	86	2-13-5	224
416935	1290	1309	GGACGGCATTGGTGCACAGT	92	3-14-3	115
417012	1290	1309	GGACGGCATTGGTGCACAGT	72	2-13-5	115
416860	1.291	1310	CGGACGGCATTGGTGCACAG	88	5-10-5	225
416936	1.291	1310	CGGACGGCATTGGTGCACAG	89	3-14-3	225
417013	1.291	1310	CGGACGGCATTGGTGCACAG	86	2-13-5	225
416861	1292	1311	GCGGACGGCATTGGTGCACA	92	5-10-5	226
416937	1292	1311	GCGGACGGCATTGGTGCACA	93	3-14-3	226
417014	1292	1311	GCGGACGGCATTGGTGCACA	87	2-13-5	226
416862	1293	1312	AGCGGACGGCATTGGTGCAC	90	5-10-5	227
416938	1293	1312	AGCGGACGGCATTGGTGCAC	90	3-14-3	227
417015	1293	1312	AGCGGACGGCATTGGTGCAC	87	2-13-5	227
416863	1294	1313	CAGCGGACGGCATTGGTGCA	83	5-10-5	228
416939	1294	1313	CAGCGGACGGCATTGGTGCA	88	3-14-3	228
417016	1294	1313	CAGCGGACGGCATTGGTGCA	85	2-13-5	228
416940	1295	1314	GCAGCGGACGGCATTGGTGC	92	3-14-3	53
417017	1295	1314	GCAGCGGACGGCATTGGTGC	82	2-13-5	53
416864	1296	1315	GGCAGCGGACGGCATTGGTG	93	5-10-5	229
416941	1296	1315	GGCAGCGGACGGCATTGGTG	95	3-14-3	229
417018	1296	1315	GGCAGCGGACGGCATTGGTG	82	2-13-5	229
416865	1297	1316	TGGCAGCGGACGGCATTGGT	88	5-10-5	230
416942	1297	1316	TGGCAGCGGACGGCATTGGT	85	3-14-3	230
417019	1297	1316	TGGCAGCGGACGGCATTGGT	84	2-13-5	230
416866	1298	1317	CTGGCAGCGGACGGCATTGG	88	5-10-5	231
416943	1298	1317	CTGGCAGCGGACGGCATTGG	92	3-14-3	231
417020	1298	1317	CTGGCAGCGGACGGCATTGG	84	2-13-5	231
416867	1299	1318	ACTGGCAGCGGACGGCATTG	83	5-10-5	232
416944	1299	1318	ACTGGCAGCGGACGGCATTG	83	3-14-3	232
417021	1299	1318	ACTGGCAGCGGACGGCATTG	74	2-13-5	232

#### **Exemplo 4: Inibição anti-sentido dose-dependente de fator 11 humano em células HepG2**

[00311] Os Gap-mers do exemplo 3 (ver tabelas 4, 5, 6, 7, e 8), que exibem inibição *in vitro* de fator 11 humano, foram testados em várias doses em células HepG2. As células foram plaqueadas em uma densidade de 10.000 células por poço e transfectadas usando reagente lipofectina com concentrações de oligonucleotídeo anti-sentido 9,375 nM, 18,75 nM, 37,5 nM e 75 nM, da maneira especificada na tabela 9. Após um período de tratamento de aproximadamente 16 horas, o RNA foi isolado das células e os níveis

do RNAm do fator 11 foram medidos por PCR em tempo real quantitativa. O conjunto de sonda do oligonucleotídeo iniciador do fator 11 humano RTS 2966 foi usado para medir os níveis de RNAm. Os níveis do RNAm do fator 11 foram ajustados de acordo com o teor de RNA total, da maneira medida por RIBOGREEN. Os resultados são apresentados como inibição percentual do fator 11, com relação às células controle não tratadas. Da maneira ilustrada na tabela 9, os níveis de RNAm do fator 11 foram reduzidos de uma maneira dependente da dose em células tratadas com oligonucleotídeo anti-sentido.

### **Tabela 9**

[00312] Inibição anti-sentido dose-dependente de fator 11 humano em células HepG2 por meio da transfecção de oligonucleotídeos com lipofectina

	9,375 nM	18,75 nM	37,5 nM	75 nM	Motivo	IC <sub>50</sub> (nM)	SEQ ID No.
412203	33	40	62	74	5-10-5	24	31
412206	24	47	69	86	5-10-5	21	34
413467	35	51	62	69	5-10-5	20	100
413474	29	44	57	67	5-10-5	28	107
413476	24	58	62	77	5-10-5	21	109
416825	23	52	73	92	5-10-5	20	190
416826	8	36	58	84	5-10-5	29	191
416827	31	42	62	77	5-10-5	23	192
416838	31	51	64	86	5-10-5	19	203
416842	18	33	62	71	5-10-5	31	207
416850	4	30	67	84	5-10-5	29	215
416856	21	45	58	74	5-10-5	27	221
416858	0	28	54	82	5-10-5	33	223
416864	18	43	62	78	5-10-5	26	229
416878	22	34	60	82	5-10-5	27	100
416892	16	50	70	85	3-14-3	23	190
416895	39	57	66	71	3-14-3	15	192
416896	22	39	57	81	3-14-3	27	193
416908	36	57	67	76	3-14-3	16	203
416922	14	25	49	75	3-14-3	36	214
416923	36	47	60	67	3-14-3	23	215
416924	25	38	56	59	3-14-3	36	216

416925	13	38	59	75	3-14-3	30	114
416926	31	43	63	82	3-14-3	22	217
416931	44	39	57	71	3-14-3	22	221
416941	33	54	63	78	3-14-3	19	229
416945	34	45	62	65	2-13-5	24	31
416969	17	39	61	76	2-13-5	28	190
416972	32	40	60	69	2-13-5	26	192
416973	60	75	85	87	2-13-5	3	193
416984	26	50	62	81	2-13-5	22	202
416985	17	30	47	57	2-13-5	49	203
416989	18	41	62	83	2-13-5	26	206
416993	15	37	50	68	2-13-5	36	209
416999	24	37	55	73	2-13-5	30	214
417000	35	47	58	70	2-13-5	23	215
417002	35	52	67	70	2-13-5	19	114
417003	26	44	60	56	2-13-5	33	217

[00313] Os Gap-mers foram também transfectados por meio de eletroporação e sua inibição dose dependente de RNAm do fator 11 humano foi medida. As células foram plaqueadas em uma densidade de 20.000 células por poço e transfectadas por meio de eletroporação com concentrações de oligonucleotídeo anti-sentido 0,7  $\mu$ M, 2,2  $\mu$ M, 6,7  $\mu$ M e 20  $\mu$ M, da maneira especificada na tabela 10. Após um período de tratamento de aproximadamente 16 horas, o RNA foi isolado das células e os níveis do RNAm do fator 11 foram medidos por PCR em tempo real quantitativa. O conjunto de sonda do oligonucleotídeo iniciador do fator 11 humano RTS 2966 foi usado para medir os níveis de RNAm. Os níveis do RNAm do fator 11 foram ajustados de acordo com o teor de RNA total, da maneira medida por RIBOGREEN. Os resultados são apresentados como inibição percentual do fator 11, com relação às células controle não tratadas. Da maneira ilustrada na tabela 10, os níveis de RNAm do fator 11 foram reduzidos de uma maneira dependente da dose em células tratadas com oligonucleotídeo anti-sentido.

**Tabela 10**



[00314] Inibição anti-sentido dose-dependente de fator 11 humano em células HepG2 por meio da transfecção de oligonucleotídeos com eletroporação

	0,7 $\mu$ M	2,2 $\mu$ M	6,7 $\mu$ M	20 $\mu$ M	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	SEQ ID No.
412203	11	60	70	91	2,7	31
412206	22	39	81	94	2,7	34
413467	5	31	65	89	4,2	100
413474	0	5	52	81	6,9	107
413476	40	69	88	93	0,9	109
416825	27	74	92	98	1,3	190
416826	2	47	86	82	3,2	191
416827	37	68	87	92	1,1	192
416838	5	30	55	83	5,1	203
416842	0	10	66	92	5,0	207
416850	14	25	81	91	3,4	215
416856	0	29	47	93	5,1	221
416858	5	20	56	86	5,3	223
416864	32	65	78	90	1,4	229
416878	1	26	75	85	4,3	100
416892	14	52	82	92	2,5	190
416895	0	62	70	91	3,0	192
416896	12	35	81	89	3,2	193
416908	7	58	74	89	2,8	203
416922	35	51	77	91	1,7	214
416923	15	30	60	90	4,0	215
416924	22	40	63	70	4,1	216
416925	0	40	76	80	3,9	114
416926	47	71	91	94	0,6	217
416931	7	24	60	82	5,1	221
416941	16	38	79	89	3,0	229
416945	48	70	81	88	0,6	31
416969	25	34	86	92	2,5	190
416972	25	30	48	88	4,3	192
416973	20	48	86	93	2,3	193
416984	43	54	88	90	1,1	202
416985	12	48	45	69	5,8	203
416989	32	65	88	94	1,3	206
416993	22	48	87	92	2,2	209
416999	20	42	77	88	2,8	214
417000	46	73	76	89	0,6	215
417002	32	38	82	91	2,2	114
417003	0	34	75	89	3,9	217

**Exemplo 5: Seleção e confirmação de inibição anti-sentido eficaz dose-dependente de fator 11 humano em células HepG2**

[00315] Gap-mers que exibem inibição dose-dependente significativa de fator 11 humano no exemplo 4 foram selecionados e testados em várias doses em células HepG2. As células foram plaqueadas em uma densidade de 10.000 células por poço e transfectadas usando reagente lipofectina com concentrações de oligonucleotídeo anti-sentido 2,34 nM, 4,69 nM, 9,375 nM, 18,75 nM, 37,5 nM e 75 nM, da maneira especificada na tabela 11. Após um período de tratamento de aproximadamente 16 horas, o RNA foi isolado das células e níveis de RNAm do fator 11 humano foram medidos por PCR em tempo real quantitativa. O conjunto de sonda do oligonucleotídeo iniciador do fator 11 humano RTS 2966 foi usado para medir os níveis de RNAm. Os níveis do RNAm do fator 11 foram ajustados de acordo com o teor de RNA total, da maneira medida por RIBOGREEN. Os resultados são apresentados como inibição percentual do fator 11 humano, com relação às células controle não tratadas. Da maneira ilustrada na tabela 11, os níveis de RNAm do fator 11 foram reduzidos de uma maneira dependente da dose em células tratadas com oligonucleotídeo anti-sentido, comparados com o controle.

**Tabela 11**

[00316] Inibição anti-sentido dose-dependente de fator 11 humano em células HepG2 por meio da transfecção de oligonucleotídeos com lipofectina

	2,34 nM	4,69 nM	9,375 nM	18,75 nM	37,5 nM	75 nM	Motivo	IC50 (nM)	SEQ ID No.
416825	4	22	39	57	79	89	5-10-5	13	190
416826	15	22	32	54	76	90	5-10-5	15	191
416838	21	37	50	63	74	83	5-10-5	10	203
416850	24	31	49	55	70	77	5-10-5	13	215
416858	11	35	46	61	75	77	5-10-5	11	223

416864	13	34	42	65	68	80	5-10-5	15	229
416892	14	34	49	70	84	93	3-14-3	9	190
416925	24	34	45	56	67	72	3-14-3	13	114
416999	10	26	42	62	72	80	2-13-5	14	214
417002	17	26	49	61	81	84	2-13-5	12	114
417003	6	29	48	64	73	82	2-13-5	11	217

[00317] Os Gap-mers foram também transfectados por meio de eletroporação e sua inibição dose dependente de RNAm do fator 11 humano foi medida. As células foram plaqueadas em uma densidade de 20.000 células por poço e transfectadas por meio de eletroporação com concentrações de oligonucleotídeo anti-sentido 625 nM, 1.250 nM, 2.500 nM, 5.000 nM, 10.000 nM e 20.000 nM, da maneira especificada na tabela 12. Após um período de tratamento de aproximadamente 16 horas, o RNA foi isolado das células e níveis de RNAm do fator 11 humano foram medidos por PCR em tempo real quantitativa. O conjunto de sonda do oligonucleotídeo iniciador do fator 11 humano RTS 2966 foi usado para medir os níveis de RNAm. Os níveis do RNAm do fator 11 foram ajustados de acordo com o teor de RNA total, da maneira medida por RIBOGREEN. Os resultados são apresentados como inibição percentual do fator 11 humano, com relação às células controle não tratadas. Da maneira ilustrada na tabela 12, os níveis de RNAm do fator 11 foram reduzidos de uma maneira dependente da dose em células tratadas com oligonucleotídeo anti-sentido comparados com o controle.

### **Tabela 12**

[00318] Inibição anti-sentido dose-dependente de fator 11 humano em células HepG2 por meio da transfecção de oligonucleotídeos com eletroporação

	625 nM	1.250 nM	2.500 nM	5.000 nM	10.000 nM	20.000 nM	IC50 (µM)	SEQ ID No.
416825	69	84	91	94	96	97	19	190
416826	67	82	89	92	95	97	33	191
416838	66	79	87	90	93	96	43	203
416850	69	80	87	90	93	96	25	215

416858	65	77	87	89	93	93	44	223
416864	45	74	84	87	92	94	338	229
416892	66	86	96	97	100	100	31	190
416925	64	80	88	91	95	96	51	114
416999	61	82	89	94	94	97	67	214
417002	59	72	86	90	94	96	156	114
417003	60	74	86	90	95	95	123	217

**Exemplo 6: Seleção e confirmação de inibição anti-sentido dose-dependente eficaz de fator 11 humano em hepatócitos principais de ciano**

[00319] Gap-mers do exemplo 4 que exibem significativa inibição *in vitro* dose dependente de fator 11 humano também foram testados em várias doses em hepatócitos principais de ciano. As células foram plaqueadas em uma densidade de 35.000 células por poço e transfectadas por meio de eletroporação com concentrações de oligonucleotídeo anti-sentido 0,74 nM, 2,2 nM, 6,7 nM, 20 nM, 60 nM e 180 nM, da maneira especificada na tabela 13. Após um período de tratamento de aproximadamente 16 horas, o RNA foi isolado das células e níveis de RNAm do fator 11 humano foram medidos por PCR em tempo real quantitativa. O conjunto de sonda do oligonucleotídeo iniciador do fator 11 humano RTS 2966 foi usado para medir os níveis de RNAm. Os níveis do RNAm do fator 11 foram ajustados de acordo com o teor de RNA total, da maneira medida por RIBOGREEN. Os resultados são apresentados como inibição percentual do fator 11 humano, com relação às células controle não tratadas. Da maneira ilustrada na tabela 13, os níveis de RNAm do fator 11 foram reduzidos de uma maneira dependente da dose em células tratadas com oligonucleotídeo anti-sentido comparados com o controle.

**Tabela 13**

[00320] Inibição anti-sentido dose-dependente de fator 11 humano em hepatócitos principais de ciano

	0,74 nM	2,2 nM	6,7 nM	20 nM	60 nM	180 nM	IC <sub>50</sub> (μM)	SEQ ID No.
41682 5	5	22	51	61	77	84	1,0	190
41682 6	13	24	34	67	69	71	1,3	191
41683 8	0	0	21	34	48	62	6,9	203
41685 0	2	20	24	65	69	67	1,6	215
41685 8	2	13	22	44	63	68	3,7	223
41686 4	0	1	15	23	47	64	7,7	229
41689 2	20	20	43	62	88	92	1,0	190
41692 5	0	9	1	48	55	76	4,4	114
41699 9	3	40	36	62	67	82	1,3	214
41700 2	32	16	28	38	55	71	4,0	114
41700 3	12	18	19	39	58	74	4,1	217

**Exemplo 7: Seleção e confirmação de inibição anti-sentido dose dependente eficaz de fator 11 humano em células HepB3 por Gap-mers**

[00321] Os Gap-mers que exibem inibição de fator 11 humano *in vitro* no exemplo 4 foram testados em várias doses em células HepB3 humanas. As células foram plaqueadas em uma densidade de 4.000 células por poço e transfectadas usando reagente lipofectina com concentrações de oligonucleotídeo anti-sentido 2,3 nM, 4,7 nM, 9,4 nM, 18,75 nM, 37,5 nM e 75 nM, da maneira especificada na tabela 14. Após um período de tratamento de aproximadamente 16 horas, o RNA foi isolado das células e níveis de RNAm do fator 11 humano foram medidos por PCR em tempo real quantitativa. O conjunto de

sonda do oligonucleotídeo iniciador do fator 11 humano RTS 2966 foi usado para medir os níveis de RNAm. Os níveis do RNAm do fator 11 foram ajustados de acordo com o teor de RNA total, da maneira medida por RIBOGREEN. Os resultados são apresentados como inibição percentual do fator 11, com relação às células controle não tratadas. Da maneira ilustrada na tabela 14, os níveis de RNAm do fator 11 foram reduzidos de uma maneira dependente da dose em células tratadas com oligonucleotídeo anti-sentido comparados com o controle.

**Tabela 14**

[00322] Inibição anti-sentido dose-dependente de fator 11 humano em células HepB3

No ISIS,	2,3 nM	4,7 nM	9,4 nM	18,75 nM	37,5 nM	75 nM	IC <sub>50</sub> (nM)	SEQ ID No,
416825	0	15	34	36	53	59	35	190
416826	16	28	38	55	64	66	16	191
416838	23	34	43	59	71	56	11	203
416850	22	32	43	56	75	60	13	215
416858	17	34	43	57	74	62	12	223
416864	24	37	42	66	76	63	9	229
416892	28	34	50	68	82	72	9	190
416925	26	33	45	59	72	60	12	114
416999	19	33	42	60	71	59	12	214
417002	24	30	46	57	71	65	13	114
417003	11	28	40	40	63	58	17	217

[00323] Os Gap-mers foram também transfectados por meio de eletroporação e sua inibição dose dependente de RNAm do fator 11 humano foi medida. As células foram plaqueadas em uma densidade de 20.000 células por poço e transfectadas por meio de eletroporação com concentrações de oligonucleotídeo anti-sentido 41,15 nM, 123,457 nM, 370,37 nM, 1.111,11 nM, 3.333,33 nM e 10.000 nM, da maneira especificada na tabela 15. Após um período de tratamento de aproximadamente 16 horas, o RNA foi isolado das células e níveis de RNAm do fator 11 humano foram medidos por PCR em tempo real

quantitativa. O conjunto de sonda do oligonucleotídeo iniciador do fator 11 humano RTS 2966 foi usado para medir os níveis de RNAm. Os níveis do RNAm do fator 11 foram ajustados de acordo com o teor de RNA total, da maneira medida por RIBOGREEN. Os resultados são apresentados como inibição percentual do fator 11 humano, com relação às células controle não tratadas. Da maneira ilustrada na tabela 15, os níveis de RNAm do fator 11 foram reduzidos de uma maneira dependente da dose em células tratadas com oligonucleotídeo anti-sentido comparados com o controle.

**Tabela 15**

[00324] Inibição anti-sentido dose-dependente de fator 11 humano em células HepB3

	41,15 nM	123,45 7 nM	370,37 nM	1111,1 1 nM	3333,3 3 nM	10000 nM	IC <sub>50</sub> (μM)	SEQ ID No,
416825	32	40	48	75	90	92	0,16	190
416826	0	0	34	61	87	92	0,78	191
416838	12	9	28	40	77	88	1,20	203
416850	26	38	51	73	90	95	0,30	215
416858	23	45	52	64	87	92	0,30	223
416864	4	3	6	35	75	87	2,20	229
416892	9	12	28	65	89	98	0,61	190
416925	27	39	50	73	88	96	0,20	114
416999	31	45	62	78	94	97	0,16	214
417002	19	0	31	47	86	93	1,20	114
417003	31	0	15	43	84	92	1,50	217

**Exemplo 8: Inibição anti-sentido de fator 11 de murino em hepatócitos primários de camundongo**

[00325] Os oligonucleotídeos anti-sentido quiméricos que alvejam o fator 11 de murino foram designados como Gap-mers 5-10-5 MOE que alvejam o fator 11 de murino (acesso ao GENBANK No. NM\_028066.1, aqui incorporado como SEQ ID NO: 6). Os Gap-mers apresentam 20 nucleotídeos de comprimento, em que o segmento central de intervalo é compreendido de 10 2'-desoxinucleotídeos e é flanqueado em ambos os lados (nas direções 5' e 3') por asas

compreendendo 5 nucleotídeos cada. Cada nucleotídeo em cada segmento em asa apresenta uma modificação 2'-MOE. As ligações entre nucleosídeos em cada gaper são ligações fosforotioato (P=S). Todos os resíduos de citidina em cada Gap-mer são 5-metilcitidinas. Os oligonucleotídeos anti-sentido foram avaliados por sua capacidade de reduzir RNAm do fator 11 de murino em hepatócitos primários de camundongo.

[00326] Os hepatócitos primários de camundongo foram tratados com oligonucleotídeos anti-sentido 6,25 nM, 12,5 nM, 25 nM, 50 nM, 100 nM e 200 nM por um período de aproximadamente 24 horas. O RNA foi isolado das células e os níveis do RNAm do fator 11 de murino foram medidos por PCR em tempo real quantitativa. O conjunto de sonda do fator 11 de murino RTS 2898 (sequência sentido ACATGACAGGCGCGATCTCT, aqui incorporada como SEQ ID NO: 7; sequência reversa TCTAGGTTACGTACACATCTTTGC, aqui incorporada como SEQ ID NO: 8; sequência da sonda TTCCTTCAAGCAATGCCCTCAGCAATX, aqui incorporada como SEQ ID NO: 9) foi usado para medir os níveis de RNAm. Os níveis do RNAm do fator 11 foram ajustados de acordo com o teor de RNA total da maneira medida por RIBOGREEN. Vários dos oligonucleotídeos anti-sentido de murino reduziram os níveis do RNAm do fator 11 de uma maneira dependente da dose.

#### **Exemplo 9: Inibição anti-sentido com reação cruzada de fator 11 de murino em hepatócitos primários de camundongo**

[00327] Os oligonucleotídeos anti-sentido alvejados em um ácido nucleico do fator 11 de murino foram testados com relação a seus efeitos no RNAm do fator 11 *in vitro*. Os hepatócitos primários de camundongo cultivados em uma densidade de 10.000 células por poço foram tratados com oligonucleotídeo anti-sentido 100 nM. Após um período de tratamento de aproximadamente 24 horas, o RNA foi



isolado das células e os níveis do RNAm do fator 11 de camundongo foram medidos por PCR em tempo real quantitativa. Os níveis do RNAm do fator 11 foram ajustados de acordo com o teor de RNA total, da maneira medida por RIBOGREEN. Os resultados são apresentados como inibição percentual do fator 11, com relação às células controle não tratadas.

[00328] Os oligonucleotídeos anti-sentido quiméricos nas tabelas 16 foram designados como Gap-mers 5-10-5 MOE. Os Gap-mers apresentam 20 nucleotídeos de comprimento, em que o segmento central de intervalo é compreendido de 10 2'-desoxinucleotídeos e é flanqueado em ambos os lados (nas direções 5' e 3') por asas compreendendo 5 nucleotídeos cada. Cada nucleotídeo no segmento em asa 5' e cada nucleotídeo no segmento em asa 3' apresentam uma modificação 2'-MOE. As ligações entre nucleosídeos em cada Gap-mer são ligações fosforotioato (P=S). Todos os resíduos de citidina em cada Gap-mer são 5-metilcitidinas. "Sítio inicial alvo de camundongo" indica o principal nucleotídeo 5' no qual o Gap-mer é alvejado. "Sítio de parada alvo de camundongo" indica o principal nucleotídeo 3' no qual o Gap-mer é alvejado. Todos os oligonucleotídeos de camundongos listados mostram reatividade cruzada entre o RNAm do fator 11 de camundongo (acesso ao GENBANK No. NM\_028066.1), aqui incorporado como SEQ ID NO: 6 e o RNAm do fator 11 humano (acesso ao GENBANK No. NM\_000128.3), aqui incorporado como SEQ ID NO: 1. "Sítio inicial alvo humano" indica o principal nucleotídeo 5' no RNAm humano (acesso ao GENBANK No. NM\_000128.3) no qual o oligonucleotídeo anti-sentido é alvejado. "Sítio de parada alvo humano" indica o principal nucleotídeo 3' no RNAm humano (acesso ao GENBANK No. NM\_000128.3) no qual o oligonucleotídeo anti-sentido é alvejado. "Número de incompatibilidades" indica as incompatibilidades entre o oligonucleotídeo de camundongo e a

sequência RNAm de humano.

### **Tabela 16**

[00329] Inibição de os níveis do RNAm do fator 11 de camundongo por oligonucleotídeos anti-sentido quiméricos com asas 5-10-5 MOE e intervalo desóxi alvejado em SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 6

No ISIS	Sítio inicial alvo de camundongo	Sítio de parada de camundongo	Sequência (5' para 3')	% de inibição	SEQ ID No.	Sítio inicial alvo de humano	Sítio de parada de humano	No. de incompatibilidades
404050	379	398	TGCTTGAAGGAATATCCAGA	82	233	619	638	2
404054	448	467	TAGTTCATGCCCTTCATGTC	45	234	688	707	1
404055	453	472	TGTTATAGTTCATGCCCTTC	27	235	693	712	1
404066	686	705	AATGTCCCTGATACAAGCCA	37	236	926	945	1
404067	691	710	GGGAAAATGTCCCTGATACA	39	237	931	950	1
404083	1299	1.318	TGTGCAGAGTCACCTGCCAT	47	238	1533	1552	2
404087	1466	1485	TTCTTGAACCCTGAAGAAAG	29	239	1709	1728	2
404089	1477	1496	TGAATTATCATTCTTGAAC	6	240	1720	1739	2
404090	1483	1502	TGATCATGAATTATCATTTTC	42	241	1726	1745	2

### **Exemplo 10: Inibição anti-sentido *in vivo* de fator 11 de murino**

[00330] Vários oligonucleotídeos anti-sentido alvejados em RNAm do fator 11 de murino (acesso ao GENBANK No. NM\_028066.1, aqui incorporado como SEQ ID NO: 6) que mostram inibição dose-dependente estatisticamente significativa foram avaliados *in vivo*. Camundongos BALB/c foram tratados com ISIS 404057 (TCCTGGCATTCTCGAGCATT, sítio inicial alvo 487, aqui incorporado como SEQ ID NO: 10) e ISIS 404071 (TGGTAATCCACTTTTCAGAGG, sítio inicial alvo 869, aqui incorporado como SEQ ID NO: 11).

### Tratamento

[00331] Os camundongos BALB/c foram injetados com 5 mg/kg, 10 mg/kg, 25 mg/kg, ou 50 mg/kg de ISIS 404057 ou ISIS 404071 duas vezes por semana, por 3 semanas. Um grupo controle de camundongos foi injetado com salina tamponada com fosfato (PBS) duas vezes por semana, por 3 semanas. Os camundongos foram sacrificados 5 dias após receberem a última dose. Todo o fígado foi coletado para análise do RNA e o plasma foi coletado para análise de coagulação (PT e aPTT) e análise de proteína.

### Análise de RNA

[00332] O RNA foi extraído do tecido hepático para análise por PCR em tempo real do fator 11. Da maneira mostrada na tabela 17, os oligonucleotídeos anti-sentido atingiram redução dose-dependente de fator 11 de murino com relação ao controle com PBS. Os resultados são apresentados como inibição percentual do fator 11, com relação ao controle.

**Tabela 17**

[00333] Inibição anti-sentido dose-dependente de RNAm do fator 11 de murino em camundongos BALB/c

	mg/kg	% de inibição
404057	5	40
	10	64
	25	85
	50	95
404071	5	72
	10	82
	25	93
	50	96

**Ensaio PT e aPTT**

[00334] O tempo de protrombina (PT) e tempo de tromboplastina parcial ativada (aPTT) foram medidos usando plasma pobre em plaquetas (PPP) de camundongos tratados com ISIS 404057 e ISIS 404071. Os valores PT e aPTT fornecidos na tabela 18 são relatados como valores de razão normalizada internacional (INR). Os valores INR para PT e aPTT foram determinados dividindo o valor PT ou aPTT para cada grupo experimental (isto é, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 25 mg/kg, e 50 mg/kg de tratamento com ISIS 404057 ou ISIS 404071) pelo PT ou aPTT para o grupo tratado com PBS. Esta razão foi então originada com relação à energia do índice de sensibilidade internacional (ISI) do fator do tecido usado. Da maneira mostrada na tabela 18, PT não se prolongou significativamente em camundongos tratados com ISIS 404057 ou ISIS 404071. Entretanto, aPTT prolongou-se de uma maneira dependente da dose em camundongos tratados com ISIS

404057 e ISIS 404071. Estes dados sugerem que a redução anti-sentido do fator 11 afeta a via de ativação de contato, mas não a via extrínseca de coagulação do sangue.

**Tabela 18**

[00335] Efeito de ISIS 404071 e 404057 em PT e aPTT em camundongos BALB/c

	Dose em mg/kg	PT INR	aPTT INR
ISIS 404057	5	1,00	1,07
	10	0,94	1,19
	25	1,02	1,27
	50	1,00	1,37
ISIS 404071	5	1,06	1,09
	10	1,08	1,13
	25	1,06	1,35
	50	1,02	2,08

**Análise protéica**

[00336] A pro-enzima do fator 11 do plasma de camundongos tratados com ISIS 404071 foi medida usando um ensaio de F11 com base no tempo de coagulação. Os tempos de coagulação foram determinados em duplicata com um instrumento de coagulação semi-automatizado ST4 (Diagnostica Stago, NJ). Trinta µL de amostra de plasma citratada diluída 1/20 em tampão HEPES-NaCl com BSA foram incubados com 30 µL de reagente aPTT (Reagente do fator plaquetário 3 adicionado de ativador particulado) e 30 µL de plasma citratado deficiente de fator 11 (congênito humano, George King Bio-Medical Inc.) a 37°C para iniciar a coagulação. Os resultados foram interpolados em uma curva padrão de plasma de murino controle citratado diluído em série.

[00337] Da maneira mostrada na tabela 19, o tratamento com ISIS 404071 resultou em uma redução dose-dependente significativa de proteína do fator 11. Os resultados são apresentados como inibição percentual do fator 11, com relação ao controle com PBS.

**Tabela 19**

[00338] Inibição dose-dependente de proteína do fator 11 de murino por ISIS 404071 em camundongos BALB/c

Dose em mg/kg	% de inibição
5	39
10	67
25	89
50	96

**Exemplo 11: Efeito *in vivo* da inibição anti-sentido do fator 11 de murino no modelo de trombose venosa induzida por FeCl<sub>3</sub> (VT) comparado à varfarina**

Tratamento

[00339] ISIS 404071 e varfarina (COUMADIN) foram avaliados em o modelo de camundongo com VT induzida por FeCl<sub>3</sub>. Seis grupos de camundongos BALB/c foram tratados com 1,25 mg/kg, 2,5 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 20 mg/kg ou 40 mg/kg de ISIS 404071 administradas subcutaneamente duas vezes por semana, por 3 semanas. Dois dias após receberem a última dose de ISIS 404071, os camundongos foram anestesiados com 150 mg/kg de cetamina misturada com 10 mg/kg de xilazina, administrada por injeção intraperitoneal. 6 grupos adicionais de camundongos BALB/c foram tratados com 0,5 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg e 5 mg/kg de varfarina, administrada por via intraperitoneal diariamente por 6 dias. Quatro horas após a última dose de varfarina, os camundongos foram anestesiados com 150 mg/kg de cetamina misturada com 10 mg/kg de xilazina, administrada por injeção intraperitoneal. Dois grupos controle de camundongos BALB/c foram tratados com PBS, administrado subcutaneamente duas vezes por semana, por 3 semanas. Dois dias após a última dose de PBS, os camundongos em ambos os grupos foram anestesiados com 150 mg/kg de cetamina misturada com 10 mg/kg de xilazina, administrada por injeção intraperitoneal. A formação do trombo foi induzida com FeCl<sub>3</sub> em todos os grupos de

camundongos, exceto o primeiro grupo controle.

[00340] Em camundongos submetidos ao tratamento com  $\text{FeCl}_3$ , a formação do trombo foi induzida aplicando um pedaço de filtro de papel (2 x 4 mm) pré-saturado com 10 % de solução de  $\text{FeCl}_3$  diretamente na veia cava. Após 3 minutos de exposição, o papel de filtro foi removido. Trinta minutos após a aplicação do papel de filtro, um tamanho fixo da veia contendo o trombo foi dissecado para análise de plaquetas. O fígado foi coletado para análise de RNA.

#### Análise de RNA

[00341] O RNA foi extraído do tecido hepático para análise por PCR em tempo real do fator 11. Os resultados são apresentados como inibição percentual do fator 11, com relação ao controle com PBS. Da maneira mostrada na tabela 20, o tratamento com ISIS 404071 resultou em redução dose-dependente significativa de RNAm do fator 11 em comparação ao controle com PBS. De maneira inversa, o tratamento com varfarina não resultou em redução significativa de fator 11 comparado ao controle com PBS.

#### **Tabela 20**

[00342] Redução dose-dependente de RNAm do fator 11 no modelo de trombose venosa induzida por  $\text{FeCl}_3$

Tratamento	Dose em mg/kg	% de inibição
Varfarina	0,5	0
	1	0
	2	1
	3	5
	4	8
	5	11
ISIS 404071	1.25	0
	2.5	8
	5	62
	10	78
	20	92
	40	96

#### Quantificação de composição plaquetária

[00343] A quantificação por PCR em tempo real de fator plaquetário 4 (PF-4) foi usada para quantificar plaquetas na veia cava como uma medida da formação do trombo. Os resultados são apresentados como um percentual de PF-4 em Camundongos tratados com ISIS 404071 ou varfarina, comparados aos dois grupos controle tratados com PBS. Da maneira mostrada na tabela 21, o tratamento com ISIS 404071 resultou em uma redução dose-dependente de PF-4 em comparação ao controle com PBS para dosagens de 5 mg/kg e maiores. O tratamento com varfarina resultou em uma redução de PF-4 em comparação ao controle com PBS para dosagens de 2 mg/kg e maiores. Portanto, a redução de fator 11 pelos compostos aqui fornecidos é usada para inibir a formação de trombo e coágulo.

#### **Tabela 21**

[00344] Análise da formação do trombo pela quantificação por PCR em tempo real de PF-4 no modelo de trombose venosa induzida por  $\text{FeCl}_3$

	Dose em mg/kg	PF-4
PBS- $\text{FeCl}_3$		0
PBS+ $\text{FeCl}_3$		100
Varfarina	0,5	128
	1	124
	2	80
	3	21
	4	12
	5	33
ISIS 404071	1.25	143
	2.5	120
	5	95
	10	21
	20	37
	40	20

**Exemplo 12: Efeito *In vivo* da inibição anti-sentido do fator 11 de murino comparado à varfarina em um ensaio de sangramento na cauda**

#### Tratamento

[00345] O sangramento na cauda foi medido para observar se o tratamento com ISIS 404071 ou varfarina causa hemorragia interna em camundongos. ISIS 404071 e varfarina (COUMADIN) foram avaliados no ensaio de sangramento na cauda. Seis grupos de camundongos BALB/c foram tratados com 1,25 mg/kg, 2,5 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 20 mg/kg ou 40 mg/kg de ISIS 404071, administrados subcutaneamente duas vezes por semana, por 3 semanas. 6 grupos adicionais de camundongos BALB/c foram tratados com 0,5 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, e 5 mg/kg de varfarina, administrada por via intraperitoneal diariamente por 6 dias. Um grupo controle separado de camundongos BALB/c foi tratado com PBS, administrada subcutaneamente duas vezes por semana, por 3 semanas.

#### Ensaio de sangramento na cauda

[00346] Dois dias após o tratamento final de ISIS 404071, varfarina, ou PBS, os camundongos foram colocados em uma câmara para sangrar a cauda. Os camundongos foram anestesiados na câmara com isoflurano e um pedaço pequeno da cauda (aproximadamente 4mm a partir da ponta) foi cortado com tesouras estéreis. O corte da cauda foi colocado imediatamente em um tubo Falcon de 15 mL preenchido com aproximadamente 10 mL de solução de tampão de NaCl a 0,9 % aquecida a 37°C. O sangue foi coletado durante 40 minutos. Os tubos com salina foram pesados tanto antes quanto após o sangramento. Os resultados são fornecidos na tabela 22.

[00347] O tratamento com ISIS 404071 não afetou o sangramento, comparado aos camundongos tratados com PBS. Entretanto, varfarina não aumentou o sangramento em camundongos comparado ao controle com PBS. Doses maiores de varfarina correlacionaram positivamente com o aumento da perda sanguínea. Estes dados sugerem que o potencial hemorrágico dos compostos aqui fornecidos



é baixo, especialmente em comparação com varfarina. Estes dados obtidos com os resultados fornecidos no exemplo 11 sugerem que a inibição de fator 11 com os compostos aqui descritos é usada para fornecer atividade anti-trombótica sem risco de sangramento associado.

### **Tabela 22**

[00348] Ensaio de sangramento na cauda no modelo de trombose venosa induzida por  $\text{FeCl}_3$

Tratamento	Dose em mg/kg	Sangue (g)
PBS	0	0,01
Varfarina	0,5	0,07
	1	0,35
	2	0,39
	3	0,51
	4	0,52
	5	0,76
ISIS 404071	1,25	0,00
	2,5	0,00
	5	0,03
	10	0,00
	20	0,06
	40	0,03

**Exemplo 13: Efeito *in vivo* de inibição anti-sentido de fator 11 de murino comparado à varfarina em PT e aPTT**

#### Tratamento

[00349] PT e aPTT foram medidos usando PPP de camundongos tratados com ISIS 404071 ou varfarina. Seis grupos de camundongos BALB/c foram tratados com 1,25 mg/kg, 2,5 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 20 mg/kg ou 40 mg/kg de ISIS 404071, administradas subcutaneamente duas vezes por semana, por 3 semanas. 6 grupos adicionais de camundongos BALB/c foram tratados com 0,5 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg e 5 mg/kg de varfarina, administrada por via intraperitoneal diariamente por 6 dias. Em um grupo controle, os camundongos BALB/c foram tratados com PBS, administrada subcutaneamente nos camundongos duas vezes por semana, por 3

semanas. Dois dias após a dose final ser administrada, o PPP foi coletado e os ensaios de PT e aPTT foram realizados.

#### Ensaio de PT e aPTT

[00350] Os valores PT e aPTT fornecidos na tabela 16 são relatados como os valores de razão normalizada internacional (INR). Os valores de INR para PT e aPTT foram determinados dividindo o valor PT ou aPTT para cada grupo experimental (isto é, tratamento com 5 mg/kg, 10 mg/kg, 25 mg/kg, e 50 mg/kg de ISIS 404071) pelo PT ou aPTT para o grupo tratado com PBS. Esta razão foi então originada com relação à energia do índice de sensibilidade internacional (ISI) do fator do tecido usado. Da maneira mostrada na tabela 23, PT em camundongos tratados com varfarina é prolongado significativamente a cada dosagem. O aPTT em camundongos tratados com varfarina foi prolongado, particularmente em dosagens de 1 mg/kg e maiores. ISIS 404071 não afetou significativamente PT, mas não prolongou aPTT; entretanto, não foi tão significativamente quanto em camundongos tratados com varfarina. Estes dados sugerem que ISIS 404071 afeta a via de ativação de contato, mas não a via extrínseca de coagulação do sangue, ao passo que a varfarina afeta tanto a via de ativação de contato quanto a via extrínseca de coagulação do sangue.

#### **Tabela 23**

[00351] Efeito de ISIS 404071 e varfarina em PT e aPTT em camundongos BALB/c

Tratamento	Dose em mg/kg	PT INR	aPTT INR
Varfarina	0,5	1,41	1,10
	1	2,03	1,31
	2	2,77	1,54
	3	22,76	2,90
	4	6,74	2,18
	5	9,20	2,29
ISIS 404071	1,25	0,99	0,98
	2,5	1,01	1,03

	5	1,07	1,09
	10	1,08	1,29
	20	1,09	1,32
	40	0,98	1,64

**Exemplo 14: Efeito *in vivo* de inibição anti-sentido de fator 11 de murino no modelo de trombose venosa induzida por FeCl<sub>3</sub> (VT) comparado à Apixaban**

Tratamento

[00352] ISIS 404071 e Apixaban foram avaliados no modelo de camundongo com VT induzida por FeCl<sub>3</sub>. Seis grupos de camundongos BALB/c foram tratados com 1,25 mg/kg, 2,5 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 20 mg/kg ou 40 mg/kg de ISIS 404071, administradas subcutaneamente duas vezes por semana, por 3 semanas. Dois dias após receberem a última dose de ISIS 404071, os camundongos foram anestesiados com 150 mg/kg de cetamina misturada com 10 mg/kg de xilazina, administrada por injeção intraperitoneal. 6 grupos adicionais de camundongos BALB/c foram tratados com 0,5 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, e 5 mg/kg de Apixaban, administradas subcutaneamente uma vez. Vinte minutos após receber Apixaban, os camundongos foram anestesiados com 150 mg/kg de cetamina misturada com 10 mg/kg de xilazina, administrada por injeção intraperitoneal. Dois grupos controle de camundongos BALB/c foram tratados com PBS, administrada subcutaneamente duas vezes por semana, por 3 semanas. Dois dias após a última dose de PBS, os camundongos em ambos os grupos foram anestesiados com 150 mg/kg de cetamina misturada com 10 mg/kg de xilazina, administrada por injeção intraperitoneal. A formação do trombo foi induzida com FeCl<sub>3</sub> em todos os camundongos, exceto o primeiro grupo controle.

[00353] Em camundongos que se submetem ao tratamento com FeCl<sub>3</sub>, a formação do trombo foi induzida aplicando um pedaço de filtro de papel (2 x 4 mm) pré-saturado com solução de FeCl<sub>3</sub> 10 %

diretamente na veia cava. Após 3 minutos de exposição, o papel de filtro foi removido. Trinta minutos após a aplicação do papel de filtro, um tamanho fixo da veia contendo o trombo foi dissecado para análise de plaquetas. O fígado foi coletado para análise de RNA.

#### Análise de RNA

[00354] O RNA foi extraído do tecido hepático para análise por PCR em tempo real do fator 11. Os resultados são apresentados como inibição percentual do fator 11, com relação ao controle com PBS. Da maneira mostrada na tabela 24, o tratamento com ISIS 404071 resultou na redução dose-dependente significativa de RNAm do fator 11 em comparação ao controle com PBS. De maneira inversa, o tratamento com Apixaban não resultou em redução significativa de fator 11 comparado ao controle com PBS.

**Tabela 24**

[00355] Redução dose-dependente de RNAm do fator 11 no modelo de trombose venosa induzida por FeCl<sub>3</sub>

	Dose em mg/kg	% de inibição
Apixaban	0,5	5
	2	8
	5	12
	10	2
	20	0
ISIS 404071	1,25	15
	2,5	44
	5	63
	10	76
	25	91
	50	95

#### Quantificação de composição plaquetária

[00356] A quantificação por PCR em tempo real de fator plaquetário 4 (PF-4) foi usada para quantificar plaquetas na veia cava como uma medida da formação do trombo. Da maneira mostrada na tabela 25, o tratamento com ISIS 404071 resultou na redução de PF-4 em comparação ao controle com PBS. O tratamento com Apixaban

também resultou na redução de PF-4, em comparação ao controle com PBS. Os resultados são apresentados como um percentual de PF-4 em camundongos tratados com ISIS 404071 ou Apixaban, comparados aos dois grupos controle tratados com PBS.

### **Tabela 25**

[00357] Análise da formação do trombo pela quantificação por PCR em tempo real de PF-4 no modelo de trombose venosa induzida por  $\text{FeCl}_3$

Tratamento	Dose em mg/kg	PF-4
PBS- $\text{FeCl}_3$		0
PBS+ $\text{FeCl}_3$		100
Apixaban	0,5	67
	2	46
	5	15
	10	5
	20	26
ISIS 404071	1,25	42
	2,5	87
	5	60
	10	28
	25	14
	50	4

**Exemplo 15: *In vivo* efeito de inibição anti-sentido de fator 11 de murino comparado à Apixaban no ensaio de sangramento na cauda**

#### Tratamento

[00358] O sangramento da cauda foi medido para observar se o tratamento com ISIS 404071 ou varfarina causa hemorragia interna em camundongos. ISIS 404071 e Apixaban foram avaliados no modelo de sangramento de cauda. Seis grupos de camundongos BALB/c foram tratados com 1,25 mg/kg, 2,5 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 20 mg/kg ou 40 mg/kg de ISIS 404071, administradas subcutaneamente duas vezes por semana, por 3 semanas. 6 grupos adicionais de camundongos BALB/c foram tratados com 0,5 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, e 5 mg/kg de Apixaban, administrados em

uma dose subcutânea única. Um grupo controle separado de camundongos BALB/c foi tratado com PBS, administrada subcutaneamente duas vezes por semana, por 3 semanas.

**Ensaio de sangramento na cauda**

[00359] Dois dias após o tratamento final com ISIS 404071, Apixaban ou PBS, os camundongos foram colocados em uma câmara para sangrar a cauda. Os camundongos foram anestesiados na câmara e um pedaço pequeno da cauda (aproximadamente 4 mm a partir da ponta) foi cortado com tesouras estéreis. A cauda cortada foi imediatamente colocada em um tubo Falcon de 15 mL preenchido com aproximadamente 10 mL de solução tampão de NaCl a 09 % aquecida a 37 °C. O sangue foi coletado durante 40 minutos. Os tubos com salina foram pesados antes e após o sangramento.

[00360] Da maneira mostrada na tabela 26, o tratamento com ISIS 404071 não afetou o sangramento comparado aos camundongos tratados com PBS. Entretanto, Apixaban não aumentou o sangramento em camundongos comparado ao controle com PBS. Doses maiores de Apixaban correlacionaram positivamente com o aumento da perda sanguínea. Estes dados sugerem que o potencial hemorrágico dos compostos aqui fornecidos é baixo, especialmente em comparação com Apixaban. Estes dados obtidos com os resultados fornecidos no exemplo 14 sugerem que a inibição de fator 11 com os compostos aqui descritos é usada para fornecer risco anti-trombótico sem sangramento associado.

**Tabela 26**

[00361] Ensaio de sangramento na cauda em camundongos BABL/c

	mg/kg	Sangue (g)
PBS	0	0,06
Apixaban	0,5	0,03
	2	0,34
	5	0,37

	10	0,40
	20	0,52
ISIS 404071	1,25	0,00
	2,5	0,03
	5	0,00
	10	0,04
	25	0,01
	50	0,01

**Exemplo 16: Efeito ex vivo de inibição anti-sentido de fator 11 de murino em combinação com LOVENOX**

Tratamento

[00362] Três grupos de camundongos BALB/c foram tratados com 10 mg/kg, 20 mg/kg, ou 40 mg/kg de ISIS 404071, administradas subcutaneamente duas vezes por semana, por 3 semanas. Um grupo de camundongo controle foi tratado com PBS, administrada duas vezes por semana, por 3 semanas. Cinco dias após a última dose, os camundongos foram sacrificados e plasma foi coletado. A heparina de baixo peso molecular (LMW), LOVENOX, foi administrada no plasma ex vivo em concentrações variadas de 0 µg/ml, 2,5 µg/ml, 5,0 µg/ml e 7,5 µg/ml. PT e aPTT foram medidos 20 minutos após o LOVENOX ser administrado.

Ensaio de PT e aPTT

[00363] Da maneira mostrada na tabela 27, o tratamento com LOVENOX aumenta o PT de uma maneira dependente da dose. O tratamento com ISIS 404071 não aumenta significativamente o PT. O PT não é significativamente afetado pelo tratamento com ISIS 404071. Não existe nenhuma evidência de um efeito combinacional no PT no plasma tratado com ISIS 404071 e LOVENOX.

**Tabela 27**

[00364] Efeito de combinação de ISIS 404071 e LOVENOX em PT INR no plasma de murino

ISIS 404071 (mg/kg)	LOVENOX (mg/ml)			
	0	2,5	5,0	7,5
0	1,00	1,02	1,10	1,12
10	0,97	1,07	1,10	1,12
20	1,00	1,10	1,07	1,10
40	0,97	1,02	1,07	1,10

[00365] Da maneira mostrada na tabela 28, o tratamento com LOVENOX aumenta o aPTT de uma maneira dependente da dose. O tratamento com ISIS 404071 também aumenta o aPTT de uma maneira dependente da dose. Além do mais, o tratamento combinado de ISIS 404071 e LOVENOX parece ter um efeito sinérgico no aPTT.

**Tabela 28**

[00366] Efeito de combinação de ISIS 404071 e LOVENOX no aPTT INR no plasma de murino

ISIS 404071 mg/kg	LOVENOX (mg/ml)			
	0	2,5	5,0	7,5
0	1,00	1,53	2,10	2,70
10	1,14	1,76	2,39	3,20
20	1,28	1,95	2,83	3,65
40	1,52	2,66	n.d.	4,78

n.d.= sem dados

**Exemplo 17: Efeito *in vivo* de inibição anti-sentido de fator 11 de murino em combinação com LOVENOX no modelo de trombose venosa induzida por FeCl<sub>3</sub> (VT)**

**Tratamento**

[00367] A combinação de ISIS 404071 e LOVENOX foi avaliada no modelo de camundongo com VT induzido por FeCl<sub>3</sub>. Quatro grupos de camundongos BALB/c foram tratados com 15 mg/kg, 30 mg/kg, 45



mg/kg ou 60 mg/kg de LOVENOX, administradas subcutaneamente uma vez por dia durante 3 dias. 4 grupos adicionais de camundongos BALB/c foram tratados com 20 mg/kg de ISIS 404071, administrada subcutaneamente duas vezes por semana, durante 3 semanas. Após a última dose de ISIS 404071, os camundongos foram tratados com 15 mg/kg, 30 mg/kg, 45 mg/kg ou 60 mg/kg de LOVENOX, administradas subcutaneamente uma vez ao dia, durante 3 dias. Dois grupos controle de camundongos BALB/c foram tratados com PBS, administrada subcutaneamente duas vezes por semana, por 3 semanas. A formação do trombo foi induzida com  $\text{FeCl}_3$  em todos os camundongos, exceto o primeiro grupo controle. Todos os camundongos foram anestesiados com 150 mg/kg de cetamina misturada com 10 mg/kg de xilazina administrada por injeção intraperitoneal.

[00368] Em camundongos que se submetem ao tratamento com  $\text{FeCl}_3$ , a formação do trombo foi induzida aplicando um pedaço de filtro de papel (2 x 4 mm) pré-saturado com solução de  $\text{FeCl}_3$  a 10 % diretamente na veia cava. Após 3 minutos de exposição, o papel de filtro foi removido. Trinta minutos após a aplicação do papel de filtro, um tamanho fixo da veia contendo o trombo foi dissecado para análise de plaquetas.

#### Quantificação de Composição plaquetária

[00369] A quantificação por PCR em tempo real de PF-4 foi usada para quantificar plaquetas na veia cava como uma medida da formação do trombo. Da maneira mostrada na tabela 29, o tratamento com LOVENOX resultou em uma redução de PF-4 em comparação ao controle com PBS. O tratamento com LOVENOX em combinação com ISIS 404071 resultou em uma maior redução de PF-4 em comparação ao LOVENOX sozinho.

**Tabela 29**

[00370] Análise da formação do trombo pela quantificação por PCR em tempo real de PF-4 no modelos de trombose venosa induzida por  $\text{FeCl}_3$

Tratamento	mg/kg	PF-4
PBS- $\text{FeCl}_3$		0
PBS+ $\text{FeCl}_3$		100
LOVENOX	15	57
	30	33
	45	10
	60	5
LOVENOX (+ ISIS 404071)	15	0
	30	0
	45	11
	60	5

**Exemplo 18: Efeito *in vivo* de inibição anti-sentido de fator 11 de murino em combinação com LOVENOX no sangramento**

Tratamento

[00371] O sangramento na cauda foi medido para observar se o tratamento com ISIS 404071 e LOVENOX causa hemorragia interna em camundongos. ISIS 404071 foi administrado subcutaneamente em uma dosagem de 20 mg/kg duas vezes por semana, por 3 semanas em 4 grupos de camundongos BALB/c, e LOVENOX foi administrada subcutaneamente em dosagens variadas de 15 mg/kg, 30 mg/kg, 45 mg/kg e 60 mg/kg uma vez por dia nos três últimos dias de tratamento com ISIS 404071. Em um quinto grupo, ISIS 404071 foi administrado subcutaneamente em camundongos BALB/c em uma dosagem de 20 mg/kg duas vezes por semana, por 3 semanas. Em um sexto grupo, PBS foi administrada subcutaneamente duas vezes por semana por três semanas em camundongos BALB/c, como um controle.

Ensaio de sangramento na cauda

[00372] Dois dias após receber seu tratamento final, os camundongos foram colocados em uma câmara para sangrar a cauda. Os camundongos foram anestesiados na câmara com isoflurano e um

pedaço pequeno da cauda (aproximadamente 4 mm a partir da ponta) foi cortado com tesouras estéreis. A cauda cortada foi imediatamente colocada em um tubo Falcon de 15 mL preenchido com aproximadamente 10 mL de solução tampão de NaCl a 09 % aquecida a 37 °C. O sangue foi coletado durante 40 minutos. Os tubos com salina foram pesados tanto antes quanto após o sangramento.

[00373] Da maneira mostrada na tabela 30, LOVENOX aumentou o sangramento em camundongos, comparado aos camundongos tratados com PBS. Doses maiores de LOVENOX correlacionaram positivamente com o aumento da perda sanguínea. ISIS 404071 combinada com LOVENOX não aumentou significativamente o sangramento, além da maior perda sanguínea mostrada em camundongos tratados apenas com LOVENOX.

### **Tabela 30**

[00374] Ensaio de sangramento na cauda comparando LOVENOX e a combinação de LOVENOX e ISIS 404071

	Dose em mg/kg	Sangue (g)
PBS		0,05
LOVENOX	15	0,11
	30	0,20
	45	0,27
	60	0,47
LOVENOX (+ISIS 404071)	15	0,14
	30	0,19
	45	0,36
	60	0,61

**Exemplo 19: Efeito *in vivo* de inibição anti-sentido de fator 11 de murino em combinação com LOVENOX em PT e aPTT**

### Tratamento

[00375] PT e aPTT foram medidos usando PPP de camundongos tratados com ISIS 404071 em combinação com LOVENOX. No primeiro grupo, ISIS 404071 foi administrado subcutaneamente em camundongos BALB/c em uma dosagem de 25 mg/kg duas vezes por

semana, por 3 semanas. O plasma foi coletado destes camundongos 5 dias após receberem a última dose de ISIS 404071. No segundo grupo, LOVENOX foi administrada subcutaneamente em camundongos BALB/c em uma dosagem de 20 mg/kg uma vez por dia durante três dias. O plasma foi coletado destes camundongos 4 horas após receberem a última dose de LOVENOX. No terceiro grupo, ISIS 404071 foi administrado subcutaneamente em camundongos BALB/c em uma dosagem de 20 mg/kg duas vezes por semana, por 3 semanas, e 2 dias após receberem a última dose de ISIS 404071, LOVENOX foi administrado subcutaneamente em uma dosagem de 20 mg/kg uma vez ao dia. O plasma foi coletado destes camundongos 4 horas após a última dose de LOVENOX. O quarto grupo, PBS foi administrada subcutaneamente duas vezes por semana por três semanas, como um controle. O plasma foi coletado destes camundongos 5 dias após a última dose.

#### Ensaio de PT e aPTT

[00376] Os valores de PT e aPTT fornecidos na tabela 31 são relatados como os valores da razão normalizada internacional (INR). Da maneira mostrada na tabela 31, PT não é significativamente afetado pelo tratamento com ISIS 404071, LOVENOX, ou tratamento com ISIS 40471 combinado com LOVENOX. Estes dados sugerem que não existe nenhum efeito combinado em PT por ISIS 404071 combinado com LOVENOX. É também mostrado na tabela 31 que o tratamento com LOVENOX e o tratamento com ISIS 404071 combinado com LOVENOX aumenta o aPTT. Estes dados sugerem que o tratamento combinado de ISIS 404071 e LOVENOX apresenta um efeito adicional no aPTT.

**Tabela 31**

[00377] Efeito de combinação de ISIS 404071 e LOVENOX no PT e aPTT em plasma de murino

	PT INR	aPTT INR
ISIS 404071	0,95	1,31
LOVENOX	1,04	2,04
404071+LOVENOX	1,04	2,58

**Exemplo 20: Efeito *in vivo* de inibição anti-sentido de fator 11 de murino em combinação com Apixaban em PT e aPTT**

Tratamento

[00378] PT e aPTT foram medidos usando PPP de camundongos tratados com ISIS 404071 em combinação com Apixaban. No primeiro grupo, ISIS 404071 foi administrado subcutaneamente em camundongos BALB/c em uma dosagem de 25 mg/kg duas vezes por semana, por 3 semanas. O plasma foi coletado destes camundongos 5 dias após receberem a última dose de ISIS 404071. No segundo grupo, Apixaban foi administrada subcutaneamente em camundongos BALB/c em uma dosagem de 6 mg/kg duas vezes ao dia durante três dias. O plasma foi coletado destes camundongos 20 minutos após receberem a última dose de Apixaban. No terceiro grupo, ISIS 404071 foi administrado subcutaneamente em camundongos BALB/c em uma dosagem de 20 mg/kg duas vezes por semana, por 3 semanas, e Apixaban foi administrado subcutaneamente em uma dosagem de 6 mg/kg duas vezes ao dia nos últimos três dias de tratamento com ISIS 404071. O plasma foi coletado destes camundongos 20 minutos após receberem a última dose de Apixaban. No quarto grupo, PBS foi administrada subcutaneamente duas vezes por semana por três semanas, como um controle. O plasma foi coletado 5 dias após a última dose de PBS.

Ensaio de PT e aPTT

[00379] Os valores de PT e aPTT fornecidos na tabela 32 são relatados como valores da razão normalizada internacional (INR). Da

maneira mostrada na tabela 32, PT não é significativamente afetado pelo tratamento com ISIS 404071. Entretanto, Apixaban e Apixaban combinado com ISIS 404071 aumentou o PT. É também mostrado na tabela 32 que Apixaban, ISIS 404071, e ISIS 404071 combinada com Apixaban aumentam o aPTT.

### **Tabela 32**

[00380] Efeito de combinação de ISIS 404071 e Apixaban no PT e aPTT em plasma de murino

	PT INR	aPTT INR
ISIS 404071	0,95	1,31
Apixaban	3,25	1,44
404071+Apixaban	3,50	2,26

**Exemplo 21: Efeito *in vivo* de inibição anti-sentido de fator 11 de murino em combinação com varfarina em PT e aPTT**

#### Tratamento

[00381] PT e aPTT foram medidos usando PPP de camundongos tratados com ISIS 404071 em combinação com varfarina. Dois grupos de camundongos BALB/c foram tratados tanto com 25 mg/kg quanto com 50 mg/kg de ISIS 404071, administrados subcutaneamente duas vezes por semana, por 3 semanas. O plasma foi coletado de cada grupo 5 dias após a última dose ser administrada. Em um terceiro grupo, os camundongos BALB/c foram tratados com 2 mg/kg de varfarina uma vez ao dia por 5 dias. O plasma foi coletado 6 horas após a última dose de varfarina ser administrada. Dois grupos adicionais de camundongos BALB/c foram tratados tanto com 25 mg/kg quanto com 50 mg/kg de ISIS 404071, administrados subcutaneamente duas vezes por semana, por 3 semanas e a varfarina foi administrada subcutaneamente em uma dosagem de 2 mg/kg uma vez ao dia nos últimos 5 dias de tratamento com ISIS 404071. O plasma foi coletado de cada grupo 6 horas após o último tratamento com varfarina. Em um grupo final de camundongos BALB/c, PBS foi administrada subcutaneamente duas vezes por

semana por três semanas, como um controle. O plasma foi coletado 5 dias após o último tratamento com PBS.

#### Ensaio de PT e aPTT

[00382] Os valores de PT e aPTT fornecidos na tabela 33 são relatados como os valores da razão normalizada internacional (INR). Da maneira mostrada na tabela 33, PT não é afetado pelo tratamento com PBS ou ISIS 404071 em nenhuma dosagem. Entretanto, o tratamento com 2 mg/kg de varfarina, 25 mg/kg de ISIS 404071 em combinação com 2 mg/kg de varfarina, e 50 mg/kg de ISIS 404071 em combinação com 2 mg/kg de varfarina aumenta o PT. Estes dados sugerem que o tratamento combinado de ISIS 404071 e varfarina apresenta um efeito aditivo no PT. É também mostrado na tabela 33 que aPTT é afetado pelo tratamento com ISIS 404071 e varfarina. A combinação de ISIS 404071 e varfarina mostra um aumento em aPTT maior que ambos os medicamentos sozinhos. Estes dados sugerem que o tratamento combinado de ISIS 404071 e varfarina apresenta um efeito sinérgico no aPTT.

#### **Tabela 33**

[00383] Efeito de combinação de ISIS 404071 e varfarina no PT e aPTT em plasma de murino

	Dose em mg/kg	PT INR	aPTT INR
ISIS 404071	25	0,98	1,37
	50	0,93	1,49
Varfarina	2	21,33	2,52
ISIS 404071(+Varfarina)	25	25,77	4,45
	50	36,33	4,75

**Exemplo 22: Efeito anti-trombótico *in vivo* de inibição anti-sentido de fator 11 de murino na trombose de veia mesentérica em camundongos**

#### Tratamento

[00384] Em um primeiro grupo, ISIS 404071 foi administrado subcutaneamente em camundongos C57BL/6 duas vezes por semana

por três semanas em uma dose de 50 mg/kg. Em um segundo grupo, um oligonucleotídeo controle, ISIS 405277 (AAGGACCTACACTATGGAAT; oligonucleotídeo anti-sentido para fator 2), aqui incorporado como SEQ ID NO: 12 foi administrado subcutaneamente em camundongos C57BL/6 duas vezes por semana por três semanas em uma dose de 50 mg/kg.

#### Preparação plaquetária

[00385] O sangue foi coletado do plexo venoso retro-orbital de camundongos C57BL/6 naïve por punção e coletado em tubos de polipropileno contendo 300 µL de heparina (30U/mL). O plasma rico em plaquetas (PRP) foi obtido por centrifugação a 1.000 rpm por 5 minutos. O PRP foi transferido para tubos novos contendo 2 µL de prostaglandina I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>) (2 µg/mL) e incubados a 37 °C por 5 minutos. Após a centrifugação a 2.600 rpm, os precipitados foram re-suspensos em 1 mL de tampão HEPES modificado para tireóide (NaCl 137 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,3 mM, KCl 2 mM, NaHCO<sub>3</sub> 12 mM, HEPES 5 mM, glicose 5 mM, BSA a 0,35 %, pH 7,2) contendo 2 µL de PGI<sub>2</sub> e incubados a 37 °C por 5 minutos. O precipitado suspenso foi centrifugado a 2.600 rpm por 5 minutos. Para remover o PGI<sub>2</sub>, a etapa de lavagem foi repetida duas vezes e as plaquetas foram marcadas de maneira fluorescente com calceína AM 2,5 µg/mL (Molecular Probes, Eugene, OU) por 10 minutos em temperatura ambiente.

#### Microscopia intravital para trombose

[00386] As plaquetas marcadas de maneira fluorescentes foram injetadas intravenosamente em camundongos C57BL/6 tratados com ISIS 404071 e tratados com oligonucleotídeo controle. Os camundongos foram anestesiados com avertina 2,5 %, e uma incisão foi feita por meio da parede abdominal para expor as veias mesentéricas com 250-300-µm de diâmetro e com uma taxa de cisalhamento de aproximadamente 150 s<sup>-1</sup>. O mesentério exposto foi



mantido úmido em todo o experimento por perfusão periódica com PBS aquecido (37°C). O mesentério foi transluminado com uma fonte de 12V, 100W, DC estabilizada. As veias foram visualizadas usando um microscópio invertido Zeiss (Alemanha) Axiovert 135 (Objetiva 32X) conectado a um gravador de vídeo SVHS (AG-6730; Panasonic, Tóquio, Japão) usando uma câmera de vídeo CCD (Hamamatsu Fotonic Systems, Hamamatsu City, Japão). A velocidade do eritrócito da linha central ( $V_{rbc}$ ) foi medida usando um velocímetro ótico Doppler (Microcirculation Research Institute, Texas A&M College of Medicine, College Station, TX). A taxa de cisalhamento venular ( $\tau$ ) foi calculada com base na lei de Poiseuille para um fluido newtoniano,  $\tau=8(V_{média}/D_v)$ , onde  $D_v$  é o diâmetro da vênula e  $V_{média}$  é estimada a partir da  $V_{rbc}$  medida usando a correlação empírica  $V_{média}=V_{rbc}/1,6$ .

#### Análise dos resultados

[00387] A trombose de veia mesentérica foi realizada dois dias após a última injeção de oligonucleotídeo anti-sentido. A trombose foi induzida aplicando papel de Whatman encharcado em uma solução de  $FeCl_3$  a 10 % por 5 minutos na veia mesentérica. A veia foi monitorada por 40 minutos, ou até a oclusão. O tempo decorrido antes do primeiro trombo de 30-50  $\mu m$  em diâmetro e o tempo decorrido antes do sangue parara de fluir por 30 segundos foram observados.

[00388] A formação do trombo (30  $\mu m$  em diâmetro) ocorreu em camundongos tratados com ISIS 404071 em  $14,8 \pm 1,7$  minutos. A formação do trombo (30  $\mu m$  em diâmetro) ocorreu em camundongos controle em  $8,9 \pm 0,6$  minutos. Os tromboses oclusivos se formaram em camundongos controle em  $19,3 \pm 0,8$  minutos e todas as vênulas lesadas fecharam. Ao contrário, a maioria das veias em camundongos tratados com ISIS 404071 não fecharam quando a observação terminou 40 minutos após a lesão e aquelas veias mostraram oclusão. Apenas a veia que mostra oclusão nos camundongos tratados com

ISIS 404071 ocluíram em 29,5 minutos e reabriram após 5 minutos, antes do final do estudo.

**Exemplo 23: Antídoto de oligonucleotídeo sentido *in vivo* para a inibição anti-sentido de fator 11 de murino em camundongos BALB/c**

Tratamento

[00389] O efeito dos oligonucleotídeo sentido específicos para ISIS 404071 como um antídoto foi testado em camundongos BALB/c. Em um primeiro grupo, ISIS 404071 foi administrado subcutaneamente em camundongos BALB/c duas vezes por semana por três semanas em uma dose de 40 mg/kg. Em um segundo grupo, ISIS 404057 foi administrado subcutaneamente em camundongos BALB/c duas vezes por semana por três semanas em uma dose de 40 mg/kg. O antídoto específico de ISIS 404071, ISIS 418026 (CCTCTGAAAGTGGATTACCA; complementar a ISIS 404071), aqui incorporado como SEQ ID NO: 13, foi administrado em ambos os grupos subcutaneamente em uma injeção única de 90 mg/kg, 48 horas após o tratamento final de ISIS 404071 ou 404057. Em um terceiro grupo, ISIS 404071 foi administrado subcutaneamente em camundongos BALB/c duas vezes por semana por três semanas em uma dose de 40 mg/kg. Após o último tratamento de ISIS 404071, os camundongos foram injetados subcutaneamente com PBS. Em um quarto grupo, ISIS 404057 foi administrado subcutaneamente em camundongos BALB/c duas vezes por semana por três semanas em uma dose de 40 mg/kg. Após o último tratamento de ISIS 404057, os camundongos foram injetados subcutaneamente com PBS. Após a administração do antídoto, um conjunto de 4 camundongos de cada grupo foi sacrificado em 12 horas, 1 dia, 2 dias, 3 dias, 7 dias e 14 dias. Todo o fígado foi coletado para análise de RNA e PPP foi coletado para a análise de aPTT.

### Análise de RNA

[00390] O RNA foi extraído do tecido hepático para análise por PCR em tempo real do fator 11. Os resultados são apresentados como inibição percentual do fator 11, com relação ao controle com PBS. Da maneira mostrada na tabela 34, os camundongos tratados com ISIS 404071 sem antídoto mostraram diminuição progressiva na inibição pelo período de observação de 14 dias. Entretanto, os camundongos tratados com ISIS 404071 e antídoto mostraram uma diminuição acelerada pelo período de observação de 14 dias em comparação com camundongos que não receberam antídoto. É também mostrado na tabela 34 que o tratamento com ISIS 418026 não apresentou nenhum efeito na inibição de RNAm do fator 11 expressão em camundongos tratados com ISIS 404057.

#### **Tabela 34**

[00391] Inibição percentual de RNAm do fator 11 de camundongo comparada ao controle com PBS

	12 horas	1 dia	2 dias	3 dias	7 dias	14 dias
ISIS 404071	93	90	89	88	81	67
ISIS 404071 + ISIS 418026	90	87	72	66	57	31
ISIS 404057	n.d.	n.d.	n.d.	95	n.d.	n.d.
ISIS 404057 + ISIS 418026	n.d.	n.d.	n.d.	97	n.d.	n.d.

n.d.= sem dados

### Ensaio de aPTT

[00392] Da maneira mostrada na tabela 35, os camundongos tratados com ISIS 404071 e antídoto (ISIS 418026) mostraram diminuição progressiva de aPTT pelo período de observação de 14 dias, comparados aos camundongos tratados com ISIS 404071 sem antídoto.

**Tabela 35**

[00393] Efeito de tratamento com antídoto na INR de aPTT

	12 horas	1 dia	2 dias	3 dias	7 dias	14 dias
ISIS 404071	1,51	1,30	1,35	1,27	1,18	1,05
ISIS 404071 + ISIS 418026	1,45	1,23	1,16	1,15	1,10	0,95

**Exemplo 24: Antídoto da proteína do fator 7a *in vivo* para a inibição anti-sentido de fator 11 de murino em camundongos BALB/c**

Tratamento

[00394] O efeito das proteínas do fator 7a humano (Fator VIIa) como um antídoto para ISIS 404071 foi testado em camundongos BALB/c. Dois grupos Two experimentais de camundongos BALB/c foram tratados com 20 mg/kg de ISIS 404071, administrados subcutaneamente duas vezes por semana, por 3 semanas. Dois grupos controle de camundongos BALB/c foram tratados com PBS, administrados subcutaneamente duas vezes por semana, por 3 semanas. A formação do trombo foi induzida com FeCl<sub>3</sub> em todos os camundongos, exceto no primeiro grupo controle. Quinze minutos antes do tratamento com FeCl<sub>3</sub>, o primeiro grupo experimental foi tratado com 5 µg/kg de antídoto de proteína do fator 7a humano (produto no. 407act, American Diagnostic Inc.). Dois dias após sua última dose, todos os camundongos foram anestesiados com 150 mg/kg de cetamina misturada com 10 mg/kg de xilazina administrada por injeção intraperitoneal.

[00395] Em camundongos que se submetem ao tratamento com FeCl<sub>3</sub>, a formação do trombo foi induzida aplicando um pedaço de filtro de papel (2 x 4 mm) pré-saturado com solução de FeCl<sub>3</sub> a 10 % diretamente na veia cava. Após 3 minutos de exposição, o papel de filtro foi removido. Trinta minutos após a aplicação do papel de filtro, um tamanho fixo da veia contendo o trombo foi dissecado para análise de plaquetas.

Quantificação da composição plaquetária

[00396] A quantificação por PCR em tempo real do fator plaquetário 4 (PF-4) foi usada para quantificar plaquetas na veia cava como uma medida da formação do trombo. Os resultados são apresentados como um percentual de PF-4 em camundongos tratados e não tratados com antídoto, comparados aos dois grupos controle tratados com PBS. Da maneira mostrada na tabela 36, os animais tratados com o antídoto de proteína do fator 7a humano expressaram mais PF-4 em comparação aos animais tratados com ISIS 404071 sozinho. Estes dados indicam que o fator 7a humano é satisfatório em resgatar o efeito da inibição do oligonucleotídeo anti-sentido.

**Tabela 36**

[00397] Análise da formação do trombo pela quantificação por PCR em tempo real de PF-4 no modelo de trombose venosa induzida por FeCl<sub>3</sub>

Tratamento	PF-4
PBS-FeCl <sub>3</sub>	0
PBS+FeCl <sub>3</sub>	100
ISIS 404071	18
ISIS 404071+hFV7a	68

**Exemplo 25: Inibição anti-sentido *in vivo* de fator 11 de murino no modelo de hemorragia cerebral induzida por collagenase**

Tratamento

[00398] ISIS 404071 e varfarina (COUMADIN) foram examinados no modelo de hemorragia cerebral induzida por collagenase. Em um primeiro grupo, ISIS 404071 foi administrado subcutaneamente em camundongos BALB/c duas vezes por semana, por duas semanas, em uma dose 40 mg/kg. Em um segundo grupo, varfarina foi administrada

intraperitonealmente em camundongos duas vezes por semana, por duas semanas, em uma dose de 2 mg/kg. Em um terceiro grupo, ISIS 421208 (TCGGAAGCGACTCTTATATG, 8 incompatibilidades no fator 11 de murino, aqui incorporado como SEQ ID NO: 14) foi administrado subcutaneamente em camundongos BALB/c duas vezes por semana, por duas semanas, em uma dose 40 mg/kg. Em um quarto grupo, o PBS foi administrado aos camundongos BALB/c duas vezes por semana, por duas semanas.

[00399] Dois dias após receber sua dose final, todos os camundongos em todos os grupos foram anestesiados com 5 µg/g de avertina. A seguir, os camundongos foram injetados em -1 mm AP, 1 mm R ML, -4 mm DV do bregma do crânio plano com uma seringa Hamilton de 10 µL contendo 0,075 U de collagenase (150 U/mL). A collagenase foi distribuída por 5 minutos e a agulha foi mantida no local por mais 5 minutos para evitar o refluxo. Os camundongos foram então analisados quanto à extensão da hemorragia, pontuação de déficit neurológico e mortalidade.

[00400] A tabela 37 apresenta o volume de hemorragia detectado em camundongos após tratamento com a collagenase, a tabela 38 apresenta a pontuação de déficit neurológico dos camundongos, e a tabela 39 apresenta a taxa de mortalidade dos camundongos. O déficit neurológico é medido por um sistema de pontuação padrão, onde nenhuma deficiência é zero e o déficit grave é cinco. Coletivamente, os dados sugerem que ISIS 404071 não apresentou um efeito significativo no tamanho da hemorragia, pontuação de déficit neurológico ou mortalidade dos camundongos. Assim, o risco de hemorragia intracerebral (um fator de risco para indivíduos tratados com varfarina) é significativamente reduzido em camundongos tratados com ISIS 404071, em comparação aos camundongos tratados com varfarina.

**Tabela 37**

[00401] Volume hemorrágico após tratamento com collagenase

	Volume (mm <sup>3</sup> )
PBS	51
ISIS 421208	41
ISIS 404071	38

**Tabela 38**

[00402] Pontuação de déficit neurológico após tratamento com collagenase

	Pontuação
PBS	2,4
ISIS 421208	2,0
ISIS 404071	3,8

**Tabela 39**

[00403] Mortalidade após tratamento com collagenase

	% de mortalidade
PBS	0
ISIS 421208	0
ISIS 404071	20
Varfarina	80

**Exemplo 26: Efeito *in vivo* de inibição anti-sentido de fator 11 de murino em combinação com PLAVIX no modelo de trombose venosa (VT) induzida por FeCl<sub>3</sub>**

**Tratamento**

[00404] A combinação de ISIS 404071 e PLAVIX foi avaliada no modelo de camundongo com VT induzida por FeCl<sub>3</sub>. Quatro grupos de oito camundongos BALB/c, pesando aproximadamente 25 g cada, foram tratados com 6,25 mg/kg, 12,50 mg/kg, 25,00 mg/kg ou 50,00 mg/kg de PLAVIX. Os camundongos receberam duas doses de PLAVIX no dia um e uma dose de PLAVIX no dia dois, duas horas antes da cirurgia.

[00405] Quatro grupos adicionais de oito camundongos BALB/c, pesando aproximadamente 25 g cada, foram tratados com 20 mg/kg de ISIS 404071, administrado subcutaneamente duas vezes por

semana, durante três semanas. Após a última dose de ISIS 404071, os camundongos foram tratados com 6,25 mg/kg, 12,50 mg/kg, 25,00 mg/kg ou 50,00 mg/kg de PLAVIX. Duas doses de PLAVIX foram administradas aos camundongos no dia um e uma dose de PLAVIX foi administrada no dia dois, duas horas antes da cirurgia.

[00406] Dois grupos controle de oito camundongos BALB/c, pesando aproximadamente 25 g cada, não foram tratados com ISIS 404071 ou PLAVIX. Dois grupos controle adicionais de oito camundongos BALB/c, pesando aproximadamente 25 g cada, foram tratados com 20 mg/kg de ISIS 404071, administrado subcutaneamente duas vezes por semana por três semanas, mas não foram tratados com PLAVIX. A formação do trombo foi induzida com  $\text{FeCl}_3$  em todos os camundongos, exceto o primeiro e terceiro grupos controle. Todos os camundongos foram anestesiados com 150 mg/kg de cetamina misturada com 10 mg/kg de xilazina administrada por injeção intraperitoneal.

[00407] Em camundongos que se submetem ao tratamento com  $\text{FeCl}_3$ , a formação do trombo foi induzida aplicando um pedaço de filtro de papel (2 x 4 mm) pré-saturado com solução de  $\text{FeCl}_3$  a 10 % diretamente na veia cava inferior. Após 3 minutos de exposição, o papel de filtro foi removido. Trinta minutos após a aplicação do papel de filtro, um tamanho fixo da veia contendo o trombo foi dissecado para análise de plaquetas.

#### Quantificação da composição plaquetária

[00408] A quantificação por PCR em tempo real de PF-4 foi usada para quantificar plaquetas na veia cava como uma medida da formação do trombo. Da maneira mostrada na tabela 40, o tratamento com PLAVIX resultou em uma redução de PF-4 em comparação ao controle com PBS. O tratamento com PLAVIX em combinação com ISIS 404071 resultou em uma maior redução de PF-4 em comparação



ao PLAVIX sozinho. Portanto, a combinação de terapia antiplaquetária com ASO do fator 11 aumenta a atividade anti-trombótica. Os dados são apresentados como percentual de PF-4 RNAm, comparados ao controle PBS+ FeCl<sub>3</sub>.

#### **Tabela 40**

[00409] Análise da formação do trombo pela quantificação por PCR em tempo real de PF-4 no modelo de trombose venosa induzida por FeCl<sub>3</sub>

Tratamento	ISIS 404071 mg/kg	PLAVIX mg/kg	PF-4
PBS- FeCl <sub>3</sub>	0	0	29
PBS+ FeCl <sub>3</sub>	0	0	100
PLAVIX apenas	0	6,25	59
	0	12,50	37
	0	25,00	30
	0	50,00	30
ISIS 404071-FeCl <sub>3</sub>	20	0	27
ISIS 404071+FeCl <sub>3</sub>	20	0	40
PLAVIX (+ ISIS 404071)	20	6,25	35
	20	12,50	38
	20	25,00	25
	20	50,00	35

**Exemplo 27: Efeito *in vivo* de inibição anti-sentido de fator 11 de murino em combinação com PLAVIX no sangramento**

#### Tratamento

[00410] O sangramento na cauda foi medido para observar se o tratamento com ISIS 404071 em combinação com PLAVIX causa um aumento na tendência ao sangramento. ISIS 404071 foi administrado subcutaneamente em uma dosagem de 20 mg/kg duas vezes por semana, por 3 semanas a 5 grupos de oito camundongos BALB/c. Após a última dose de ISIS 404071, os camundongos foram tratados com 0 mg/kg, 6,25 mg/kg, 12,50 mg/kg, 25,00 mg/kg ou 50,00 mg/kg de PLAVIX. Duas doses de PLAVIX foram administradas aos camundongos no dia um e uma dose de PLAVIX foi administrada no dia dois, duas horas antes do sangramento.

[00411] 5 grupos adicionais de oito camundongos BALB/c foram

tratados de maneira similar, com a exceção de que eles não receberam injeções de ISIS 404071.

#### Ensaio de sangramento na cauda

[00412] Duas horas após receber seu tratamento final, os camundongos foram colocados em uma câmara para sangrar a cauda. Os camundongos foram anestesiados na câmara com isoflurano e um pedaço pequeno da cauda (aproximadamente 4 mm a partir da ponta) foi cortado com tesouras estéreis. A cauda cortada foi imediatamente colocada em um tubo Falcon de 15 mL preenchido com aproximadamente 10 mL de solução tampão de NaCl a 0,9 % aquecida a 37°C. O sangue foi coletado durante 40 minutos. Os tubos com salina foram pesados tanto antes quanto após o sangramento.

[00413] Obtidos com os resultados do exemplo 26, estes dados mostram que a combinação de terapia anti-plaquetária com o fator 11 ASO aumenta a atividade anti-trombótica sem aumentar o risco de sangramento.

#### **Tabela 41**

[00414] Ensaio de sangramento na cauda comparando PLAVIX e a combinação de PLAVIX e ISIS 404071

Tratamento	ISIS 404071 mg/kg	PLAVIX mg/kg	Sangue (g)
Sem tratamento	0	0	0,040
PLAVIX apenas	0	6,25 mg/kg	0,075
	0	12,50 mg/kg	0,205
	0	25,00 mg/kg	0,524
	0	50,00 mg/kg	0,628
ISIS 404071 apenas	20 mg/kg	0	0
PLAVIX (+ ISIS 404071)	20 mg/kg	6,25 mg/kg	0,065
	20 mg/kg	12,50 mg/kg	0,300
	20 mg/kg	25,00 mg/kg	0,401
	20 mg/kg	50,00 mg/kg	0,577

**Exemplo 28: Efeito *in vivo* de um inibidor de molécula pequena do fator Xa em combinação com PLAVIX no sangramento**

#### Tratamento

[00415] O sangramento na cauda foi medido para observar se o

tratamento com uma molécula pequena do fator 10a em combinação com PLAVIX causa um aumento na tendência ao sangramento. Cinco grupos de oito camundongos BALB/c foram tratados com 0 mg/kg, 6,25 mg/kg, 12,50 mg/kg, 25,00 mg/kg ou 50,00 mg/kg de PLAVIX. Os camundongos receberam duas doses de PLAVIX no dia um e uma dose de PLAVIX no dia dois, duas horas antes do sangramento.

[00416] Cinco grupos adicionais de oito camundongos BALB/c foram tratados com 0 mg/kg, 6,25 mg/kg, 12,50 mg/kg, 25,00 mg/kg ou 50,00 mg/kg de PLAVIX. Os camundongos receberam duas doses de PLAVIX no dia um e uma dose de PLAVIX no dia dois, duas horas antes do sangramento. Estes camundongos também foram tratados com 0,5 mg/kg de Apixaban, um inibidor da molécula pequena do fator 10a, intraperitonialmente uma vez, 20 minutos antes do sangramento.

#### Ensaio de sangramento na cauda

[00417] Duas horas após receber seu tratamento final, os camundongos foram colocados em uma câmara para sangrar a cauda. Os camundongos foram anestesiados na câmara com isoflurano e um pedaço pequeno da cauda (aproximadamente 4 mm a partir da ponta) foi cortado com tesouras estéreis. A cauda cortada foi imediatamente colocada em um tubo Falcon de 15 mL preenchido com aproximadamente 10 mL de solução tampão de NaCl a 09 % aquecida a 37°C. O sangue foi coletado durante 40 minutos. Os tubos com salina foram pesados tanto antes quanto após o sangramento.

[00418] Da maneira mostrada a seguir na tabela 42, estes dados mostram que a combinação de terapia anti-plaquetária com um inibidor de molécula pequena do fator 10a, tal como Apixaban, aumenta o risco de sangramento. Portanto, o tratamento com a combinação de terapia anti-plaquetária com um fator 11 ASO fornece um melhor perfil de segurança, em comparação ao perfil de segurança de uma combinação de terapia anti-plaquetária com um inibidor de molécula

pequena do fator 10a.

#### **Tabela 42**

[00419] Ensaio de sangramento na cauda comparando PLAVIX, Apixaban e a combinação de PLAVIX e Apixaban

Tratamento	Apixaban mg/kg	PLAVIX mg/kg	Sangue (g)
Sem tratamento	0	0	0,002
PLAVIX apenas	0	6,25 mg/kg	0,061
	0	12,50 mg/kg	0,149
	0	25,00 mg/kg	0,246
	0	50,00 mg/kg	0,258
Apixaban apenas	0,5 mg/kg	0	0,004
PLAVIX (+ Apixaban)	0,5 mg/kg	6,25 mg/kg	0,258
	0,5 mg/kg	12,50 mg/kg	0,252
	0,5 mg/kg	25,00 mg/kg	0,361
	0,5 mg/kg	50,00 mg/kg	0,363

**Exemplo 29: Duração da redução mediada por anti-sentido *in vivo* do fator 11 de murino e anticoagulação correspondente no sangue**

#### Tratamento

[00420] A duração da redução mediada por anti-sentido de RNAm do fator 11 de murino foi observada em camundongos BALB/c. Uma dose de 50 mg/kg de ISIS 404071 foi administrada subcutaneamente em camundongos BALB/c. Após a administração de ISIS 404071, os camundongos foram sacrificados em 12 horas, 1 dia, 2 dias, 3 dias, 4 dias, 7 dias, 14 dias, 28 dias e 56 dias. Todo o fígado foi coletado para análise de RNA e PPP foi coletado análise de aPTT. Um grupo controle de camundongos foi tratado com uma dose subcutânea de PBS.

#### Análise de RNA

[00421] O RNA foi extraído do tecido hepático para análise por PCR em tempo real do fator 11. Os resultados são apresentados com relação ao controle com PBS. Os camundongos tratados com ISIS 404071 mostraram infra-regulação significativa do RNAm do fator 11 no dia 1. Os camundongos começam a recuperação da expressão do

RNA<sub>m</sub> do fator 11 no dia 14. Os camundongos recuperaram completamente a expressão do RNA<sub>m</sub> do fator 11 no dia 28 e os resultados do dia 56 indicam que o RNA<sub>m</sub> do fator foi mantido nos níveis de pre-tratamentos. Portanto, os camundongos tratados com ISIS 404071 não experimenta um efeito rebote.

[00422] O efeito rebote foi previamente observado na redução mediada por anticorpo do fator 11 (Sangue, First Edition Paper, prepublicado na rede em 22 de outubro de 2008; Prevention of vascular graft occlusion and trombo-associated thrombin generation by inhibition of fator XI). Em decorrência de a super expressão do fator 11 poder ser prejudicial levando à maior coagulação, estes dados sugerem que a inibição mediada por anti-sentido do fator 11 é mais segura que a inibição mediada por anticorpo do fator 11, uma vez que a inibição mediada por anti-sentido do fator 11 não apresenta rebote.

#### Ensaio de aPTT

[00423] Os valores aPTT fornecidos na tabela 43 são relatados como os valores da razão normalizada internacional (INR). Os valores de INR para aPTT foram determinados dividindo o valor de aPTT para camundongos tratados com ISIS 404071 pelo aPTT para o grupo tratado com PBS. Esta razão foi então originada com relação à energia do índice de sensibilidade internacional (ISI) do fator do tecido usado. Da maneira mostrada na tabela 43, os camundongos tratados com ISIS 404071 mostraram diminuição progressiva de aPTT até o dia 4 e, a seguir, aumento progressivo nos níveis de pré-tratamentos níveis do dia 7 ao dia 28.

#### **Tabela 43**

[00424] Efeito do tratamento com ISIS 404071 em INR de aPTT\*

	12 horas	dia 1	dia 2	dia 3	dia 4	dia 7	dia 14	dia 28	dia 56
ISIS 404071	0	1,02	1,12	1,29	1,30	1,25	1,11	1,02	0

\*valores na tabela 43 são aproximados

**Exemplo 30: Inibição anti-sentido de fator 11 humano em células HepG2 por oligonucleotídeos projetados por micro caminhada**

[00425] Os Gap-mers adicionais foram projetados com base em ISIS 416850 e ISIS 416858 (ver tabela 8 anterior). Estes Gap-mers foram deslocados levemente à montante e à jusante (isto é, “micro caminhada”) de ISIS 416850 e ISIS 416858. Os Gap-mers de micro caminhada foram desenhados tanto com motivos 5-8-5 MOE quanto com 6-8-6 MOE.

[00426] Estes Gap-mers de micro caminhada foram testados *in vitro*. As células HepG2 cultivadas em uma densidade de 20.000 células por poço foram transfectadas usando eletroporação com oligonucleotídeo anti-sentido 8.000 nM. Após um período de tratamento de aproximadamente 24 horas, o RNA foi isolado das células e os níveis do RNAm do fator 11 foram medidos por PCR em tempo real quantitativa. Os níveis do RNAm do fator 11 foram ajustados de acordo com o teor de RNA total, da maneira medida por RIBOGREEN. Os resultados são apresentados como inibição percentual do fator 11, com relação às células controle não tratadas.

[00427] ISIS 416850 e ISIS 416858, bem como Gap-mers selecionados das tabelas 1 e 8 (isto é, ISIS 412206, ISIS 412223, ISIS 412224, ISIS 412225, ISIS 413481, ISIS 413482, ISIS 416825, ISIS 416848, ISIS 416849, ISIS 416850, ISIS 416851, ISIS 416852, ISIS 416853, ISIS 416854, ISIS 416855, ISIS 416856, ISIS 416857, ISIS 416858, ISIS 416859, ISIS 416860, ISIS 416861, ISIS 416862, ISIS 416863, ISIS 416864, ISIS 416865, ISIS 416866, e ISIS 416867) foram testados novamente *in vitro* junto com os Gap-mers de micro caminhada na mesma condição da maneira descrita anteriormente.

[00428] Os oligonucleotídeos anti-sentido quiméricos na tabela 44 foram designados como Gap-mers 5-10-5 MOE, 5-8-5 e 6-8-6 MOE. Os dois primeiros Gap-mers listados na tabela 44 são os Gap-mers

originais (ISIS 416850 e ISIS 416858), dos quais ISIS 445493-445543 foram desenhados por meio de micro caminhada, e são designados por um asterisco. Os Gap-mers 5-10-5 apresentam 20 nucleotídeos de comprimento, em que o segmento central de intervalo é compreendido de dez 2'-desoxinucleotídeos e é flanqueado em ambos os lados (nas direções 5' e 3') por asas compreendendo cinco nucleotídeos cada. Os Gap-mers 5-8-5 apresentam 18 nucleotídeos de comprimento, em que o segmento central de intervalo é compreendido de oito 2'-desoxinucleotídeos e é flanqueado em ambos os lados (nas direções 5' e 3') por asas compreendendo cinco nucleotídeos cada. Os Gap-mers 6-8-6 apresentam 20 nucleotídeos de comprimento, em que o segmento central de intervalo é compreendido de oito 2'-desoxinucleotídeos e é flanqueado em ambos os lados (nas direções 5' e 3') por asas compreendendo seis nucleotídeos cada. Para cada um dos motivos (5-10-5, 5-8-5 e 6-8-6), cada nucleotídeo no segmento em asa 5' e cada nucleotídeo no segmento em asa 3' apresentam uma modificação 2'-MOE. As ligações entre nucleosídeos em cada Gap-mer são ligações fosforotioato (P=S). Todos os resíduos de citidina em cada Gap-mer são 5-metilcitidinas. "Sítio inicial alvo humano" indica o principal nucleotídeo 5' no qual o Gap-mer é alvejado na sequência humana. "Sítio de parada alvo humano" indica o principal nucleotídeo 3' no qual o Gap-mer é alvejado na sequência humana. Cada Gap-mer listado na tabela 44 é alvejado em SEQ ID NO: 1 (acesso ao GENBANK No. NM\_000128.3). Cada Gap-mer da tabela 44 também apresenta reatividade completamente cruzada com o a sequência do gene do fator 11 de macaco reso, aqui representada como a SEQ ID NO: 274 (exons 1-15 acesso ao GENBANK No. NW\_001118167.1). "Sítio inicial de macaco reso" indica o principal nucleotídeo 5' no qual o Gap-mer é alvejado na sequência de macaco reso. "Sítio de parada de macaco reso" indica o principal nucleotídeo 3' no qual o Gap-mer é

alvejado na sequência de macaco reso.

[00429] Da maneira mostrada na tabela 44, todos os Gap-mers designados a partir da micro caminhada alvejados na região alvo, que começam no sítio inicial alvo 1.275 e que terminam no sítio de parada alvo 1.317 (isto é, nucleobases 1.275-1.317) de SEQ ID NO: 1, exibiram pelo menos 60 % de inibição de RNAm do fator 11. De maneira similar, todos os Gap-mers que foram testados novamente das tabelas 1 e 8 exibiram pelo menos 60 % de inibição.

[00430] Vários dos Gap-mers exibiram pelo menos 70 % de inibição, incluindo os números ISIS: ISIS 412206, 412224, 412225, 413481, 413482, 416825, 416848, 416849, 416850, 416851, 416852, 416853, 416854, 416855, 416856, 416857, 416858, 416859, 416860, 416861, 416862, 416863, 416864, 416865, 416866, 416867, 445494, 445495, 445496, 445497, 445498, 445499, 445500, 445501, 445502, 445503, 445504, 445505, 445506, 445507, 445508, 445509, 445510, 445511, 445512, 445513, 445514, 445515, 445516, 445517, 445518, 445519, 445520, 445521, 445522, 445523, 445524, 445525, 445526, 445527, 445528, 445529, 445530, 445531, 445532, 445533, 445534, 445535, 445536, 445537, 445538, 445539, 445540, 445541, 445542 e 445543.

[00431] Vários dos Espaçâmeros exibiram pelo menos 80 % de inibição, incluindo os números ISIS: ISIS 412206, 412224, 412225, 413481, 413482, 416825, 416848, 416849, 416850, 416851, 416852, 416853, 416854, 416855, 416856, 416857, 416858, 416859, 416860, 416861, 416862, 416863, 416864, 416865, 416866, 416867, 445494, 445495, 445496, 445497, 445498, 445500, 445501, 445502, 445503, 445504, 445505, 445506, 445507, 445508, 445509, 445510, 445513, 445514, 445519, 445520, 445521, 445522, 445525, 445526, 445529, 445530, 445531, 445532, 445533, 445534, 445535, 445536, 445538, 445541 e 445542.



[00432] Vários dos Espaçâmeros exibiram pelo menos 90 % de inibição, incluindo os números ISIS: ISIS 412206, 416825, 416850, 416857, 416858, 416861, 445522 e 445531.

#### Tabela 44

[00433] Inibição de níveis de RNAm do fator 11 humano por oligonucleotídeos anti-sentido quiméricos alvejados em SEQ ID NO: 1 (acesso ao GENBANK No. NM\_000128.3)

No ISIS.	Sítio inicial humano	Sítio de parada humano	Sequência (5' para 3')	Inibição percentual	Motivo	SEQ ID No.	Sítio inicial de macaco rhesus	Sítio de parada de macaco rhesus
*416850	1278	1297	TGCACAGTTTCTGGCAGGCC	91	5-10-05	215	1277	1296
*416858	1288	1307	ACGGCATTGGTGCACAGTTT	90	5-10-05	223	1287	1306
416825	680	699	GCCCTTCATGTCTAGGTCCA	90	5-10-05	190	679	698
4126	738	757	CCGTGCATCTTTCTTGGCAT	91	5-10-05	34	737	756
412223	1.275	1294	ACAGTTTCTGGCAGGCCTCG	62	5-10-05	51	1274	1293
445493	1.275	1294	ACAGTTTCTGGCAGGCCTCG	69	6-8-06	51	1274	1293
445518	1.275	1292	AGTTTCTGGCAGGCCTCG	75	5-8-05	242	1274	1.291
416848	1.276	1295	CACAGTTTCTGGCAGGCCTC	87	5-10-05	213	1.275	1294
445494	1.276	1295	CACAGTTTCTGGCAGGCCTC	85	6-8-06	213	1.275	1294
445519	1.276	1293	CAGTTTCTGGCAGGCCTC	81	5-8-05	243	1.275	1292
416849	1277	1296	GCACAGTTTCTGGCAGGCCT	88	5-10-05	214	1.276	1295
445495	1277	1296	GCACAGTTTCTGGCAGGCCT	89	6-8-06	214	1.276	1295
4455	1277	1294	ACAGTTTCTGGCAGGCCT	82	5-8-05	244	1.276	1293
445496	1278	1297	TGCACAGTTTCTGGCAGGCC	87	6-8-06	215	1277	1296
445521	1278	1295	CACAGTTTCTGGCAGGCC	87	5-8-05	245	1277	1294
416851	1279	1298	GTGCACAGTTTCTGGCAGGC	89	5-10-05	216	1278	1297
445497	1279	1298	GTGCACAGTTTCTGGCAGGC	81	6-8-06	216	1278	1297
445522	1279	1296	GCACAGTTTCTGGCAGGC	91	5-8-05	246	1278	1295
413481	1280	1299	GGTGCACAGTTTCTGGCAGG	82	5-10-05	114	1279	1298
445498	1280	1299	GGTGCACAGTTTCTGGCAGG	83	6-8-06	114	1279	1298
445523	1280	1297	TGCACAGTTTCTGGCAGG	73	5-8-05	267	1279	1296
416852	1281	1300	TGGTGCACAGTTTCTGGCAG	87	5-10-05	217	1280	1299
445499	1281	1300	TGGTGCACAGTTTCTGGCAG	75	6-8-06	217	1280	1299
445524	1281	1298	GTGCACAGTTTCTGGCAG	75	5-8-05	247	1280	1297
416853	1282	1.301	TTGGTGCACAGTTTCTGGCA	84	5-10-05	218	1281	1300
445500	1282	1.301	TTGGTGCACAGTTTCTGGCA	81	6-8-06	218	1281	1300
445525	1282	1299	GGTGCACAGTTTCTGGCA	85	5-8-05	248	1281	1298
416854	1283	1302	ATTGGTGCACAGTTTCTGGC	86	5-10-05	219	1282	1.301
445501	1283	1302	ATTGGTGCACAGTTTCTGGC	83	6-8-06	219	1282	1.301
445526	1283	1300	TGGTGCACAGTTTCTGGC	81	5-8-05	249	1282	1299
416855	1.284	1303	CATTGGTGCACAGTTTCTGG	85	5-10-05	2	1283	1302
445502	1.284	1303	CATTGGTGCACAGTTTCTGG	83	6-8-06	2	1283	1302
445527	1.284	1.301	TTGGTGCACAGTTTCTGG	70	5-8-05	250	1283	1300
412224	1285	1304	GCATTGGTGCACAGTTTCTG	84	5-10-05	52	1.284	1303
445503	1285	1304	GCATTGGTGCACAGTTTCTG	89	6-8-06	52	1.284	1303
445528	1285	1302	ATTGGTGCACAGTTTCTG	73	5-8-05	251	1.284	1.301
416856	1286	1305	GGCATTGGTGCACAGTTTCT	84	5-10-05	221	1285	1304
445504	1286	1305	GGCATTGGTGCACAGTTTCT	87	6-8-06	221	1285	1304
445529	1286	1303	CATTGGTGCACAGTTTCT	85	5-8-05	252	1285	1302
416857	1287	1306	CGGCATTGGTGCACAGTTTC	91	5-10-05	222	1286	1305
445505	1287	1306	CGGCATTGGTGCACAGTTTC	89	6-8-06	222	1286	1305

445530	1287	1304	GCATTGGTGCACAGTTTC	83	5-8-05	253	1286	1303
445506	1288	1307	ACGGCATTGGTGCACAGTTT	86	6-8-06	223	1287	1306
445531	1288	1305	GGCATTGGTGCACAGTTT	90	5-8-05	254	1287	1304
416859	1289	1.308	GACGGCATTGGTGCACAGTT	85	5-10-05	224	1288	1307
445507	1289	1.308	GACGGCATTGGTGCACAGTT	85	6-8-06	224	1288	1307
445532	1289	1306	CGGCATTGGTGCACAGTT	89	5-8-05	255	1288	1305
413482	1290	1309	GGACGGCATTGGTGCACAGT	88	5-10-05	115	1289	1.308
445508	1290	1309	GGACGGCATTGGTGCACAGT	81	6-8-06	115	1289	1.308
445533	1290	1307	ACGGCATTGGTGCACAGT	87	5-8-05	256	1289	1306
416860	1.291	1310	CGGACGGCATTGGTGCACAG	89	5-10-05	225	1290	1309
445509	1.291	1310	CGGACGGCATTGGTGCACAG	84	6-8-06	225	1290	1309
445534	1.291	1.308	GACGGCATTGGTGCACAG	82	5-8-05	257	1290	1307
416861	1292	1311	GCGGACGGCATTGGTGCACA	90	5-10-05	226	1.291	1310
445510	1292	1311	GCGGACGGCATTGGTGCACA	88	6-8-06	226	1.291	1310
445535	1292	1309	GGACGGCATTGGTGCACA	83	5-8-05	258	1.291	1.308
416862	1293	1312	AGCGGACGGCATTGGTGCAC	89	5-10-05	227	1292	1311
445511	1293	1312	AGCGGACGGCATTGGTGCAC	77	6-8-06	227	1292	1311
445536	1293	1310	CGGACGGCATTGGTGCAC	82	5-8-05	259	1292	1309
416863	1294	1313	CAGCGGACGGCATTGGTGCA	86	5-10-05	228	1293	1312
445512	1294	1313	CAGCGGACGGCATTGGTGCA	79	6-8-06	228	1293	1312
445537	1294	1311	GCGGACGGCATTGGTGCA	78	5-8-05	260	1293	1310
412225	1295	1314	GCAGCGGACGGCATTGGTGC	86	5-10-05	53	1294	1313
445513	1295	1314	GCAGCGGACGGCATTGGTGC	85	6-8-06	53	1294	1313
445538	1295	1312	AGCGGACGGCATTGGTGC	80	5-8-05	261	1294	1311
416864	1296	1315	GGCAGCGGACGGCATTGGTG	88	5-10-05	229	1295	1314
445514	1296	1315	GGCAGCGGACGGCATTGGTG	81	6-8-06	229	1295	1314
445539	1296	1313	CAGCGGACGGCATTGGTG	79	5-8-05	262	1295	1312
416865	1297	1316	TGGCAGCGGACGGCATTGGT	86	5-10-05	230	1296	1315
445515	1297	1316	TGGCAGCGGACGGCATTGGT	75	6-8-06	230	1296	1315
445540	1297	1314	GCAGCGGACGGCATTGGT	74	5-8-05	263	1296	1313
416866	1298	1.317	CTGGCAGCGGACGGCATTGG	84	5-10-05	231	1297	1316
445516	1298	1.317	CTGGCAGCGGACGGCATTGG	79	6-8-06	231	1297	1316
445541	1298	1315	GGCAGCGGACGGCATTGG	80	5-8-05	264	1297	1314
416867	1299	1.318	ACTGGCAGCGGACGGCATTG	85	5-10-05	232	1298	1.317
445517	1299	1.318	ACTGGCAGCGGACGGCATTG	74	6-8-06	232	1298	1.317
445542	1299	1316	TGGCAGCGGACGGCATTG	83	5-8-05	265	1298	1315
445543	1300	1.317	CTGGCAGCGGACGGCATT	74	5-8-05	266	1299	1316

### **Exemplo 31: Inibição anti-sentido dose-dependente de fator 11 humano em células HepG2**

[00434] Os Espaçâmeros do exemplo 30 que exibem inibição *in vitro* de fator 11 humano foram testados em várias doses em células HepG2. As células foram colocadas em placas em uma densidade de 20.000 células por poço e transfectadas usando eletroporação com concentrações de oligonucleotídeo anti-sentido 123,46 nM, 370,37 nM, 1.111,11 nM, 3.333,33 nM e 10.000 nM, da maneira especificada na tabela 45. Após um período de tratamento de aproximadamente 16 horas, o RNA foi isolado das células e os níveis do RNAm do fator 11 foram medidos por PCR em tempo real quantitativa. O conjunto de

sonda do oligonucleotídeo iniciador do fator 11 humano RTS 2966 foi usado para medir os níveis de RNAm. Os níveis do RNAm do fator 11 foram ajustados de acordo com o teor de RNA total, da maneira medida por RIBOGREEN. Os resultados são apresentados como inibição percentual do fator 11, com relação às células de controle não tratadas. Da maneira ilustrada na tabela 45, os níveis de RNAm do fator 11 foram reduzidos de uma maneira dependente da dose em células tratadas com oligonucleotídeo anti-sentido.

[00435] A metade da concentração inibitória máxima (IC<sub>50</sub>) de cada oligonucleotídeo foi calculada representando graficamente as concentrações de oligonucleotídeos anti-sentido usadas versus a inibição percentual da expressão do RNAm do fator 11 atingida em cada concentração, e anotando a concentração do oligonucleotídeo anti-sentido em que 50 % da expressão da inibição de RNAm do fator 11 expressão foi atingida, comparada ao controle com PBS. Os valores IC<sub>50</sub> são apresentados na tabela 45.

#### **Tabela 45**

[00436] Inibição anti-sentido dose-dependente de fator 11 humano em células HepG por meio da transfecção de oligonucleotídeos usando eletroporação

No ISIS.	123,47 nM	370,37 nM	1.111,11 nM	3.333,33 nM	10.000.0 nM	IC <sub>50</sub> (μM)
416849	5	5	26	57	68	2,7
416850	0	12	36	74	73	2,8
416851	13	35	36	64	72	1,5
416856	12	23	35	59	83	1,6
416857	2	20	35	62	72	2,3
416858	0	27	36	64	70	2,2
416860	0	28	39	41	40	n.d.
416861	0	15	27	66	80	2,0
445498	3	1	27	50	58	4,8
445503	0	0	22	36	60	5,9
445504	8	20	38	53	68	2,7
445505	12	30	39	59	77	1,8
445522	0	0	44	63	74	2,9

445531	8	16	52	61	77	1,8
445532	5	12	39	60	70	2,0

n.d. =sem dados

**Exemplo 32: Inibição anti-sentido dose-dependente de fator 11 humano em células HepG2 por oligonucleotídeos projetados por micro caminhada**

[00437] Os Gap-mers adicionais foram projetados com base em ISIS 416850 e ISIS 416858 (ver tabela 8 anterior). Estes Gap-mers são deslocados levemente à montante e à jusante (isto é, micro caminhada) de ISIS 416850 e ISIS 416858. Os Gap-mers designados por micro caminhada apresentam motivos 3-8-3 MOE, 4-8-4 MOE, 2-10-2 MOE, 3-10-3 MOE ou 4-10-4 MOE.

[00438] Estes Gap-mers foram testados em várias doses em células HepG2. As células foram plaqueadas em uma densidade de 20.000 células por poço e transfectadas usando eletroporação com concentrações de oligonucleotídeo anti-sentido 375 nM, 750 nM, 1.500 nM, 3.000 nM, 6.000 nM e 12.000 nM, da maneira especificada na tabela 47. Após um período de tratamento de aproximadamente 16 horas, o RNA foi isolado das células e os níveis do RNAm do fator 11 foram medidos por PCR em tempo real quantitativa. O conjunto de sonda do oligonucleotídeo iniciador do fator 11 humano RTS 2966 foi usado para medir os níveis de RNAm. Os níveis do RNAm do fator 11 foram ajustados de acordo com o teor de RNA total, da maneira medida por RIBOGREEN. Os resultados são apresentados como inibição percentual do fator 11, com relação às células controle não tratadas.

[00439] ISIS 416850, ISIS 416858, ISIS 445522 e ISIS 445531 (ver tabela 45 anterior) foram testados novamente *in vitro* junto com os Gap-mers de micro caminhada nas mesmas condições descritas anteriormente.

[00440] Os oligonucleotídeos anti-sentido quiméricos na tabela 46

foram designados como Gap-mers 3-8-3 MOE, 4-8-4 MOE, 2-10-2 MOE, 3-10-3 MOE, ou 4-10-4 MOE. O Gap-mer 3-8-3 apresenta 14 nucleotídeos de comprimento, em que o segmento central de intervalo é compreendido de oito 2'-desoxinucleotídeos e é flanqueado em ambos os lados (nas direções 5' e 3') por asas compreendendo três nucleotídeos cada. O Gap-mer 4-8-4 apresenta 16 nucleotídeos de comprimento, em que o segmento central de intervalo é compreendido de oito 2'-desoxinucleotídeos e é flanqueado em ambos os lados (nas direções 5' e 3') por asas compreendendo quatro nucleotídeos cada. O Gap-mer 2-10-2 apresenta 14 nucleotídeos de comprimento, em que o segmento central de intervalo é compreendido de dez 2'-desoxinucleotídeos e é flanqueado em ambos os lados (nas direções 5' e 3') por asas compreendendo dois nucleotídeos cada. O Gap-mer 3-10-3 apresenta 16 nucleotídeos de comprimento, em que o segmento central de intervalo é compreendido de dez 2'-desoxinucleotídeos e é flanqueado em ambos os lados (nas direções 5' e 3') por asas compreendendo três nucleotídeos cada. O Gap-mer 4-10-4 apresenta 18 nucleotídeos de comprimento, em que o segmento central de intervalo é compreendido de dez 2'-desoxinucleotídeos e é flanqueado em ambos os lados (nas direções 5' e 3') por asas compreendendo quatro nucleotídeos cada. Para cada um dos motivos (3-8-3, 4-8-4, 2-10-2, 3-10-3, e 4-10-4), cada nucleotídeo no segmento em asa 5' e cada nucleotídeo no segmento em asa 3' apresentam uma modificação 2'-MOE. As ligações entre nucleosídeos em cada Gap-mer são ligações fosforotioato (P=S). Todos os resíduos de citidina em cada Gap-mer são 5-metilcitidinas. "Sítio inicial alvo humano" indica o principal nucleotídeo 5' no qual o Gap-mer é alvejado na sequência humana. "Sítio de parada alvo humano" indica o principal nucleotídeo 3' no qual o Gap-mer é alvejado na sequência humana. Cada Gap-mer listado na tabela 46 é

alvejado em SEQ ID NO: 1 (acesso ao GENBANK No. NM\_000128.3). Cada Gap-mer apresentado na tabela 46 também apresenta reatividade completamente cruzada com a sequência do gene do fator 11 de macaco reso, representado aqui como a SEQ ID NO: 274 (exons 1-15 acesso ao GENBANK No. NW\_001118167.1). “Sítio inicial de macaco reso” indica o principal nucleotídeo 5’ no qual o Gap-mer é alvejado na sequência de macaco reso. “Sítio de parada de macaco reso” indica o principal nucleotídeo 3’ no qual o Gap-mer é alvejado na sequência de macaco reso.

**Tabela 46**

[00441] Oligonucleotídeos anti-sentido quiméricos alvejado em SEQ ID NO: 1 (acesso ao GENBANK No. NM\_000128.3) e projetados por micro caminhada de ISIS 416850 e ISIS 416858

No ISIS.	Sítio inicial alvo humano	Sítio de parada alvo humano	Sequência (5’ para 3’)	Motivo	SEQ ID No.	Sítio inicial alvo de macaco reso	Sítio de parada alvo de macaco reso
449707	1280	1295	CACAGTTT CTGGCAGG	4-8-4	268	1279	1294
449708	1281	1294	ACAGTTT CTGGCAG	3-8-3	269	1280	1293
449709	1279	1296	GCACAGTT TCTGGCAGGC	4-10-4	246	1278	1295
449710	1280	1295	CACAGTTT CTGGCAGG	3-10-3	268	1279	1294
449711	1281	1294	ACAGTTT CTGGCAG	2-10-2	269	1280	1293

[00442] Os dados de inibição dose-resposta são fornecidos na tabela 47. Da maneira ilustrada na tabela 47, os níveis de RNAm do fator 11 foram reduzidos de uma maneira dependente da dose em células tratadas com oligonucleotídeo anti-sentido. A IC<sub>50</sub> de cada oligonucleotídeo anti-sentido também foi calculada e apresentada na tabela 47. Os primeiros dois Gap-mers listados na tabela 47 são os Gap-mers originais (ISIS 416850 e ISIS 416858) a partir dos quais os Gap-mers restantes foram projetados por meio da micro caminhada e

são designados por um asterisco.

**Tabela 47**

[00443] Inibição anti-sentido dose-dependente de fator 11 humano em células HepG2 por meio da transfecção de oligonucleotídeos usando eletroporação

No ISIS.	375 nM	750 nM	1.500 nM	3.000 nM	6.000 nM	12.000 nM	IC <sub>50</sub> (μM)
*416850	40	59	69	87	90	95	0,56
*416858	31	35	78	85	90	93	0,83
445522	59	71	83	82	81	92	n.d.
445531	44	64	78	86	91	93	0,44
449707	7	35	63	73	85	91	1,26
449708	0	0	22	33	61	85	4,46
449709	52	71	80	87	92	95	0,38
449710	2	21	52	70	82	87	1,59
449711	6	14	1	7	32	52	11,04

n.d. =sem dados

**Exemplo 33: Tolerabilidade de oligonucleotídeos anti-sentido que alvejam o fator 11 humano em camundongos CD1**

[00444] Os camundongos CD1 foram tratados com oligonucleotídeos anti-sentido ISIS que alvejam fator 11 humano e avaliados com relação à mudanças nos níveis de vários marcadores metabólicos.

Tratamento

[00445] Grupos de cinco camundongos CD1 cada foram injetados subcutaneamente duas vezes por semana por 2, 4, ou 6 semanas com 50 mg/kg de ISIS 416825, ISIS 416826, ISIS 416838, ISIS 416850, ISIS 416858, ISIS 416864, ISIS 416892, ISIS 416925, ISIS 416999, ISIS 417002 ou ISIS 417003. Um grupo controle de cinco camundongos foi injetado subcutaneamente com PBS por 2 semanas. Todos os grupos experimentais (isto é, camundongos tratados com ASO em 2, 4, 6 semanas) foram comparados ao grupo controle (isto é, PBS, 2 semanas).

[00446] Três dias após a última dose ser administrada a todos os

grupos, os camundongos foram sacrificados. O peso dos órgãos foi medido e o sangue foi coletado para análise adicional.

**Peso do órgão**

[00447] Os pesos do fígado, baço e rim foram medidos no final do estudo, e são apresentados nas tabelas 48, 49 e 50 como um percentual do controle com PBS, normalizado com o peso corporal. Aqueles oligonucleotídeos anti-sentido que não afetaram o aumento mais de seis vezes no peso do fígado e baço abaixo do controle com PBSs foram selecionados para estudos adicionais.

**Tabela 48**

[00448] Mudança percentual no peso do fígado de camundongos CD1 após o tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido

No ISIS.	2 semanas	4 semanas	6 semanas
416825	+5	+22	+13
416826	+10	+32	+33
416838	+8	-6	0
416850	+5	+3	+6
416858	+7	+1	+10
416864	-2	+2	-5
416925	+14	+14	+33
416999	+13	+30	+47
417002	+14	+8	+35
416892	+35	+88	+95
417003	+8	+42	+32

**Tabela 49**

[00449] Mudança percentual no peso do baço de camundongos CD1 após o tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido

No ISIS.	2 semanas	4 semanas	6 semanas
416825	-12	+19	+21
416826	-12	-5	+22
416838	+21	-8	+9
416850	-4	+6	+48
416858	-2	+8	+28
416864	-10	-2	-6
416925	-7	+33	+78
416999	+7	+22	+38
417002	+29	+26	+108



416892	+24	+30	+65
417003	+12	+101	+98

**Tabela 50**

[00450] Mudança percentual no peso do rim de camundongos CD1 após o tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido

No ISIS.	2 semanas	4 semanas	6 semanas
416825	-12	-12	-11
416826	-13	-7	-22
416838	-2	-12	-8
416850	-10	-12	-11
416858	+1	-18	-10
416864	-4	-9	-15
416925	-4	-14	-2
416999	-9	-6	-7
417002	+3	-5	-2
416892	+2	-3	+19
417003	-9	-2	-1

**Função hepática**

[00451] Para avaliar o efeito de oligonucleotídeos ISIS na função hepática, concentrações plasmáticas de transaminases foram medidas usando um analisador químico clínico automatizado (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). As medições de alanina transaminase (ALT) e aspartato transaminase (AST) são expressas em IU/L e os resultados são apresentados nas tabelas 51 e 52. Os níveis plasmáticos de bilirrubina e albumina também foram medidos usando o mesmo analisador químico clínico e expressos em mg/dL. Os resultados são apresentados nas tabelas 53 e 54. Aqueles oligonucleotídeos anti-sentido que não afetaram um aumento nos níveis de ALT/AST anteriores sete vezes a partir dos níveis controle foram selecionados para estudos adicionais. Aqueles oligonucleotídeos anti-sentido que não aumentaram os níveis de bilirrubina mais de duas vezes a partir dos níveis de controle foram selecionados para estudos adicionais.

**Tabela 51**

[00452] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido em ALT (IU/L) em camundongos CD1

	2 semanas	4 semanas	6 semanas
PBS	36	n.d.	n.d.
ISIS 416825	64	314	507
ISIS 416826	182	126	1954
ISIS 416838	61	41	141
ISIS 416850	67	58	102
ISIS 416858	190	57	216
ISIS 416864	44	33	92
ISIS 416925	160	284	1284
ISIS 416999	61	160	1302
ISIS 417002	71	138	2579
ISIS 416892	66	1526	1939
ISIS 417003	192	362	2214

n.d.= sem dados

### **Tabela 52**

[00453] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido em AST (IU/L) em camundongos CD1

	2 semanas	4 semanas	6 semanas
PBS	68	n.d.	n.d.
ISIS 416825	82	239	301
ISIS 416826	274	156	1.411
ISIS 416838	106	73	107
ISIS 416850	72	88	97
ISIS 416858	236	108	178
ISIS 416864	58	46	101
ISIS 416925	144	206	712
ISIS 416999	113	130	671
ISIS 417002	96	87	1.166
ISIS 416892	121	1347	1.443
ISIS 417003	152	249	839

n.d.= sem dados

### **Tabela 53**

[00454] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido em bilirrubina (mg/dL) em camundongos CD1

	2 semanas	4 semanas	6 semanas
PBS	0,28	n.d.	n.d.
ISIS 416825	0,41	0,69	0,29
ISIS 416826	0,39	0,20	0,37
ISIS 416838	0,57	0,24	0,20
ISIS 416850	0,46	0,23	0,22
ISIS 416858	0,57	0,24	0,16
ISIS 416864	0,40	0,26	0,22

ISIS 416925	0,45	0,25	0,25
ISIS 416999	0,48	0,18	0,28
ISIS 417002	0,50	0,25	0,29
ISIS 416892	0,38	2,99	0,50
ISIS 417003	0,33	0,15	0,24

n.d.= sem dados

#### **Tabela 54**

[00455] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido em albumina (mg/dL) em camundongos CD1

	2 semanas	4 semanas	6 semanas
PBS	3,7	n.d.	n.d.
ISIS 416825	3,6	3,4	3,5
ISIS 416826	3,3	3,4	3,4
ISIS 416838	3,5	3,8	3,6
ISIS 416850	3,6	3,5	3,1
ISIS 416858	3,4	3,5	2,8
ISIS 416864	3,5	3,6	3,5
ISIS 416925	3,5	3,5	3,2
ISIS 416999	3,4	3,3	3,2
ISIS 417002	3,2	3,4	3,4
ISIS 416892	3,2	4,0	4,4
ISIS 417003	3,4	3,4	3,2

n.d.= sem dados

#### **Função renal**

[00456] Para avaliar o efeito de oligonucleotídeos ISIS na função renal, concentrações plasmáticas de nitrogênio e uréia no sangue (BUN) e creatinina foram medidas usando um analisador químico clínico automatizado (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Os resultados são apresentados nas tabelas 55 e 56, expressos em mg/dL. Os oligonucleotídeos anti-sentido que não afetaram mais de duas vezes o aumento nos níveis de BUN, comparados ao controle com PBS, foram selecionados para estudos adicionais.

**Tabela 55**

[00457] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido em BUN (mg/dL) em camundongos CD1

	2 semanas	4 semanas	6 semanas
PBS	30	n.d.	n.d.
ISIS 416825	29	35	31
ISIS 416826	24	34	27
ISIS 416838	25	38	30
ISIS 416850	25	30	23
ISIS 416858	21	29	19
ISIS 416864	22	31	28
ISIS 416925	21	30	17
ISIS 416999	22	27	22
ISIS 417002	19	23	19
ISIS 416892	19	28	23
ISIS 417003	23	26	24

n.d.= sem dados

**Tabela 56**

[00458] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido em creatinina (mg/dL) em camundongos CD1

	2 semanas	4 semanas	6 semanas
PBS	0,14	n.d.	n.d.
ISIS 416825	0,14	0,21	0,17
ISIS 416826	0,15	0,20	0,15
ISIS 416838	0,09	0,27	0,14
ISIS 416850	0,13	0,22	0,19
ISIS 416858	0,13	0,23	0,10
ISIS 416864	0,11	0,22	0,16
ISIS 416925	0,12	0,25	0,13
ISIS 416999	0,07	0,18	0,13
ISIS 417002	0,06	0,16	0,10
ISIS 416892	0,11	0,20	0,17
ISIS 417003	0,17	0,24	0,18

n.d.= sem dados

#### Ensaio de hematologia

[00459] O sangue obtido de todos os grupos de camundongos foi enviado à Antech Diagnostics para medições e análises de hematócrito (HCT), volume corpuscular médio (MCV), hemoglobina

corpuscular média (MCH) e concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC), bem como medições das várias células de sangue, tais como WBC (neutrófilos, linfócitos e monócitos), RBC e plaquetas e teor total de hemoglobina. Os resultados são apresentados nas tabelas 57-67. Os percentuais fornecidos nas tabelas indicam o percentual de contagem de célula de sangue total. Os oligonucleotídeos anti-sentido que não afetaram uma diminuição na contagem de plaqueta em mais de 50 % e/ou um aumento na contagem de monócito em mais de três vezes foram selecionados para estudos adicionais.

#### **Tabela 57**

[00460] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido em HCT (%) em camundongos CD1

	2 semanas	4 semanas	6 semanas
PBS	50	n.d.	n.d.
ISIS 416825	49	46	40
ISIS 416826	47	41	37
ISIS 416838	42	44	39
ISIS 416850	44	44	38
ISIS 416858	50	45	46
ISIS 416864	50	45	42
ISIS 416925	51	47	47
ISIS 416999	51	42	40
ISIS 417002	44	44	51
ISIS 416892	48	42	45
ISIS 417003	48	41	43

n.d.= sem dados

#### **Tabela 58**

[00461] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido em MCV (fL) em camundongos CD1

	2 semanas	4 semanas	6 semanas
PBS	61	n.d.	n.d.
ISIS 416825	58	53	51
ISIS 416826	56	52	53
ISIS 416838	56	54	48
ISIS 416850	57	51	50
ISIS 416858	59	51	50

ISIS 416864	57	52	51
ISIS 416925	61	52	47
ISIS 416999	60	49	48
ISIS 417002	61	50	52
ISIS 416892	59	49	53
ISIS 417003	60	48	45

n.d.= sem dados

### Tabela 59

[00462] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido em MCH (pg) em camundongos CD1

No ISIS.	2 semanas	4 semanas	6 semanas
PBS	18	n.d.	n.d.
ISIS 416825	17	16	15
ISIS 416826	17	16	16
ISIS 416838	17	17	15
ISIS 416850	17	16	15
ISIS 416858	17	16	15
ISIS 416864	18	16	16
ISIS 416925	17	16	15
ISIS 416999	17	16	15
ISIS 417002	17	16	16
ISIS 416892	18	16	16
ISIS 417003	17	16	16

n.d.= sem dados

### Tabela 60

[00463] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido em MCHC (%) em camundongos CD1

	2 semanas	4 semanas	6 semanas
PBS	30	n.d.	n.d.
ISIS 416825	29	31	31
ISIS 416826	29	31	30
ISIS 416838	30	31	32
ISIS 416850	30	31	31
ISIS 416858	30	32	31
ISIS 416864	31	31	31
ISIS 416925	30	32	32
ISIS 416999	27	32	31
ISIS 417002	29	32	31
ISIS 416892	30	32	30
ISIS 417003	29	32	33

n.d.= sem dados

**Tabela 61**

[00464] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido na contagem de WBC (células/nL) em camundongos CD1

	2 semanas	4 semanas	6 semanas
PBS	6	n.d.	n.d.
ISIS 416825	8	8	6
ISIS 416826	5	6	8
ISIS 416838	4	6	5
ISIS 416850	4	5	5
ISIS 416858	6	7	4
ISIS 416864	7	6	5
ISIS 416925	6	6	11
ISIS 416999	4	9	7
ISIS 417002	8	8	16
ISIS 416892	5	8	9
ISIS 417003	7	9	10

n.d.= sem dados

**Tabela 62**

[00465] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido na contagem de RBC (células/pL) em camundongos CD1

	2 semanas	4 semanas	6 semanas
PBS	8	n.d.	n.d.
ISIS 416825	9	9	8
ISIS 416826	8	8	7
ISIS 416838	8	8	8
ISIS 416850	8	9	8
ISIS 416858	9	9	9
ISIS 416864	9	9	8
ISIS 416925	9	9	10
ISIS 416999	9	9	8
ISIS 417002	9	9	10
ISIS 416892	7	9	9
ISIS 417003	8	9	10

n.d.= sem dados

**Tabela 63**

[00466] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido na contagem de neutrófilo (%) em camundongos CD1

	2 semanas	4 semanas	6 semanas
PBS	16	n.d.	n.d.
ISIS 416825	15	43	23
ISIS 416826	26	33	23
ISIS 416838	19	33	31
ISIS 416850	15	21	16
ISIS 416858	14	24	27
ISIS 416864	13	27	20
ISIS 416925	12	39	33
ISIS 416999	12	25	22
ISIS 417002	14	31	36
ISIS 416892	19	43	28
ISIS 417003	10	39	24

n.d.= sem dados

#### **Tabela 64**

[00467] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido na contagem de linfócito (%) em camundongos CD1

	2 semanas	4 semanas	6 semanas
PBS	81	n.d.	n.d.
ISIS 416825	82	53	71
ISIS 416826	70	61	67
ISIS 416838	76	64	60
ISIS 416850	82	73	76
ISIS 416858	83	73	65
ISIS 416864	84	71	74
ISIS 416925	86	58	57
ISIS 416999	86	72	69
ISIS 417002	83	64	51
ISIS 416892	79	52	64
ISIS 417003	86	54	66

n.d.= sem dados

#### **Tabela 65**

[00468] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido na contagem de monócito (%) em camundongos CD1

	2 semanas	4 semanas	6 semanas
PBS	3	n.d.	n.d.
ISIS 416825	2	5	4
ISIS 416826	3	5	8
ISIS 416838	2	2	6
ISIS 416850	3	6	6



ISIS 416858	2	3	7
ISIS 416864	2	2	5
ISIS 416925	2	4	8
ISIS 416999	2	4	8
ISIS 417002	3	4	12
ISIS 416892	3	6	7
ISIS 417003	2	6	8

n.d.= sem dados

### **Tabela 66**

[00469] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido na contagem de plaqueta (células/nL) em camundongos CD1

	2 semanas	4 semanas	6 semanas
PBS	2.126	n.d.	n.d.
ISIS 416825	1.689	1.229	942
ISIS 416826	1.498	970	645
ISIS 416838	1.376	1.547	1.229
ISIS 416850	1.264	1.302	1.211
ISIS 416858	2.480	1.364	1.371
ISIS 416864	1.924	1.556	933
ISIS 416925	1.509	1.359	1.211
ISIS 416999	1.621	1.219	1.057
ISIS 417002	1.864	1.245	1.211
ISIS 416892	1.687	636	1.004
ISIS 417003	1.309	773	922

n.d.= sem dados

### **Tabela 67**

[00470] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido no teor de hemoglobina (g/dL) em camundongos CD1

	2 semanas	4 semanas	6 semanas
PBS	15,1	n.d.	n.d.
ISIS 416825	14,5	14,1	12,1
ISIS 416826	13,4	12,8	11,0
ISIS 416838	12,4	13,6	12,6
ISIS 416850	13,1	13,5	11,6
ISIS 416858	14,8	14,2	14,1
ISIS 416864	15,2	13,9	13,0
ISIS 416925	14,9	14,8	15,3
ISIS 416999	14,2	13,3	12,8
ISIS 417002	14,7	14,0	15,7
ISIS 416892	13,0	13,5	13,1

ISIS 417003	13,7	13,4	14,0
-------------	------	------	------

n.d.= sem dados

**Exemplo 34: Medição da meia vida de oligonucleotídeo anti-sentido no fígado de camundongos CD1**

[00471] Os camundongos CD1 foram tratados com oligonucleotídeos anti-sentido ISIS que alvejam fator 11 humano e a meia vida do oligonucleotídeo, bem como o tempo gasto para degradação e eliminação do oligonucleotídeo do fígado foi avaliado.

Tratamento

[00472] Grupos de quinze camundongos CD1 cada foram injetados subcutaneamente duas vezes por semana durante 2 semanas com 50 mg/kg de ISIS 416825, ISIS 416826, ISIS 416838, ISIS 416850, ISIS 416858, ISIS 416864, ISIS 416892, ISIS 416925, ISIS 416999, ISIS 417002 ou ISIS 417003. Cinco camundongos de cada grupo foram sacrificados 3 dias, 28 dias e 56 dias após a dose final. Os fígados foram coletados para análise.

Medição da concentração do oligonucleotídeo

[00473] A concentração do oligonucleotídeo de comprimento total, bem como a concentração total de oligonucleotídeo (incluindo a forma degradada) foram medidas. O método usado é uma modificação de métodos publicados previamente (Leeds et al., 1996; Geary et al., 1999) que consistem em uma extração com fenol-clorofórmio (líquido-líquido) seguida por uma extração de fase sólida. Um padrão interno (ISIS 355868, um oligonucleotídeo fosforotioato modificado por 2'-O-metoxietila 27-mer, GCGTTTGCTCTTCTTCTTGCGTTTTT, aqui designado como SEQ ID NO: 270) foi adicionado antes da extração. As concentrações de amostra de tecido foram calculadas usando curvas de calibração, com um limite menor de quantificação (LLOQ) de aproximadamente 1,14 µg/g. As meias vidas foram então calculadas usando o software WinNonlin (PHARSIGHT).

[00474] Os resultados são apresentados nas tabelas 68 e 69,

expressos como  $\mu\text{g/g}$  de tecido hepático. A meia vida de cada oligonucleotídeo é apresentada na tabela 70.

**Tabela 68**

[00475] Concentração do oligonucleotídeo de comprimento total ( $\mu\text{g/g}$ ) no fígado de camundongos CD1

No ISIS.	Motivo	dia 3	dia 28	dia 56
416825	5-10-5	151	52	7
416826	5-10-5	186	48	8
416838	5-10-5	170	46	10
416850	5-10-5	238	93	51
416858	5-10-5	199	102	18
416864	5-10-5	146	38	25
416999	2-13-5	175	26	0
417002	2-13-5	119	24	1
417003	2-13-5	245	42	4
416925	3-14-3	167	39	5
416892	3-14-3	135	31	6

**Tabela 69**

[00476] Concentração do oligonucleotídeo total ( $\mu\text{g/g}$ ) no fígado de camundongos CD1

No ISIS.	Motivo	dia 3	dia 28	dia 56
416825	5-10-5	187	90	39
416826	5-10-5	212	61	12
416838	5-10-5	216	98	56
416850	5-10-5	295	157	143
416858	5-10-5	273	185	56
416864	5-10-5	216	86	112
416999	2-13-5	232	51	0
417002	2-13-5	206	36	1
417003	2-13-5	353	74	4
416925	3-14-3	280	72	8
416892	3-14-3	195	54	6

**Tabela 70**

[00477] Meia vida de oligonucleotídeos anti-sentido no fígado de camundongos CD1

No ISIS.	Motivo	Meia vida (dias)
416825	5-10-5	16
416826	5-10-5	13
416838	5-10-5	13

416850	5-10-5	18
416858	5-10-5	26
416864	5-10-5	13
416999	2-13-5	9
417002	2-13-5	11
417003	2-13-5	10
416925	3-14-3	12
416892	3-14-3	12

**Exemplo 35: Tolerabilidade de oligonucleotídeos anti-sentido que alvejam o fator 11 humano em ratos Sprague-Dawley**

[00478] Os ratos Sprague-Dawley foram tratados com oligonucleotídeos anti-sentido ISIS que alvejam o fator 11 humano e avaliados com relação às mudanças nos níveis de vários marcadores metabólicos.

Tratamento

[00479] Grupos de quatro ratos Sprague Dawley cada foram injetados subcutaneamente duas vezes por semana durante 6 semanas com 50 mg/kg de ISIS 416825, ISIS 416826, ISIS 416838, ISIS 416850, ISIS 416858, ISIS 416848, ISIS 416864, ISIS 416892, ISIS 416925, ISIS 416999, ISIS 417002 ou ISIS 417003. Um grupo controle de quatro ratos Sprague Dawley foi injetado subcutaneamente com PBS duas vezes por semana durante 6 semanas. As medições de peso corporal foram obtidas antes e durante todo o tratamento. Amostras de urina foram obtidas antes do início do tratamento. Três dias após a última dose, as amostras de urina foram obtidas e os ratos foram sacrificados. Os pesos dos órgãos foram medidos e o sangue foi coletado para análise adicional.

Peso corporal e peso do órgão

[00480] Os pesos corporais dos ratos foram medidos no início do estudo e, subsequentemente, duas vezes por semana. Os pesos corporais são apresentados na tabela 71 e são expressos como uma mudança percentual com relação aos pesos obtidos no início do estudo. Os pesos do fígado, baço e rim foram medidos no final do

estudo e são apresentados na tabela 71 como um percentual do controle com salina normalizado com o peso corporal. Os oligonucleotídeos anti-sentido que não afetaram um aumento mais seis vezes no peso do fígado e baço acima do controle com PBS foram selecionados para estudos adicionais.

**Tabela 71**

[00481] Mudança percentual no peso do órgão de ratos Sprague Dawley após o tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido

No ISIS.	Fígado	Baço	Rim	Peso corporal
416825	+20	+245	+25	-18
416826	+81	+537	+44	-40
416838	+8	+212	-0,5	-23
416850	+23	+354	+47	-33
416858	+8	+187	+5	-21
416864	+16	+204	+16	-24
416925	+44	+371	+48	-32
416999	+51	+405	+71	-37
417002	+27	+446	+63	-29
416892	+38	+151	+32	-39
417003	+51	+522	+25	-40

**Função hepática**

[00482] Para avaliar o efeito de oligonucleotídeos ISIS na função hepática, as concentrações plasmáticas de transaminases foram medidas usando um analisador químico clínico automatizado (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). As medições de alanina transaminase (ALT) e aspartato transaminase (AST) são expressas em IU/L e os resultados são apresentados na tabela 72. Os oligonucleotídeos anti-sentido que não afetaram um aumento nos níveis ALT/AST acima de sete vezes dos níveis do controle foram selecionados para estudos adicionais. Os níveis plasmáticos de bilirrubina e albumina também foram medidos com o mesmo analisador clínico e os resultados são também apresentados na tabela 72, expressos em mg/dL. Os oligonucleotídeos anti-sentido que não afetaram um aumento nos níveis de bilirrubina mais de duas vezes dos níveis do controle por

tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido foram selecionados para estudos adicionais.

### **Tabela 72**

[00483] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido em marcadores metabólicos no fígado de Sprague-Dawley ratos

	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	Bilirrubina (mg/dL)	Albumina (mg/dL)
PBS	9	5	20	2
ISIS 416825	89	17	4	2
ISIS 416826	611	104	115	6
ISIS 416838	5	2	4	2
ISIS 416850	80	5	1	4
ISIS 416858	13	4	4	2
ISIS 416864	471	68	3	4
ISIS 416925	102	20	13	5
ISIS 416999	92	28	54	5
ISIS 417002	44	11	12	3
ISIS 416892	113	183	1	8
ISIS 417003	138	23	50	6

### **Função renal**

[00484] Para avaliar o efeito da função renal, as concentrações plasmáticas de nitrogênio e uréia no sangue (BUN) e creatinina foram medidas usando um analisador químico clínico automatizado (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Os resultados são apresentados na tabela 73, expressos em mg/dL. Os oligonucleotídeos anti-sentido que não afetaram mais de duas vezes o aumento nos níveis de BUN, comparados ao controle com PBS, foram selecionados para estudos adicionais. A razão de proteinúria para creatinina em amostras de urina total também foi calculada antes e após o tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido e é apresentada na tabela 74. Os oligonucleotídeos anti-sentido que não afetaram mais de cinco vezes um aumento nas razões proteinúria/creatinina, comparados ao controle com PBS, foram selecionados para estudos adicionais.

### **Tabela 73**

[00485] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido em marcadores metabólicos no rim de ratos Sprague-Dawley

	BUN	Creatinina
PBS	4	8
ISIS 416825	7	17
ISIS 416826	25	6
ISIS 416838	4	5
ISIS 416850	5	7
ISIS 416858	8	4
ISIS 416864	5	6
ISIS 416925	7	5
ISIS 416999	2	4
ISIS 417002	11	1
ISIS 416892	188	1
ISIS 417003	9	9

**Tabela 74**

[00486] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido na razão proteinúria/creatinina em ratos Sprague Dawley

	Antes	Após
PBS	1,2	1,3
416825	1,1	5,4
416826	1,0	11,4
416838	1,2	3,7
416850	1,0	4,0
416858	0,9	4,4
416864	1,2	4,0
416925	1,0	4,3
416999	1,3	9,1
417002	1,0	2,4
416892	0,8	21,3
417003	0,9	4,8

#### Ensaio de hematologia

[00487] O sangue obtido de todos os grupos de rato foi enviado para Antech Diagnostics para medições e análises de hematócrito (HCT), volume corpuscular médio (MCV), hemoglobina corpuscular média (MCV) e concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC), bem como medições de várias células de sangue, tais como WBC (neutrófilos, linfócitos e monócitos), RBC e plaquetas, bem como o teor de hemoglobina. Os resultados são apresentados nas tabelas 75 e 76. Os oligonucleotídeos anti-sentido que não afetaram uma diminuição na contagem de plaqueta em mais de 50 % e um aumento

na contagem de monócito em mais de três vezes foram selecionados para estudos adicionais.

**Tabela 75**

[00488] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido na contagem de células de sangue em ratos Sprague-Dawley

	WBC (/nL)	RBC (/pL)	Neutrófilos (%)	Linfócitos (%)	Monócitos (%)	Plaquetas ( $10^3/\mu\text{L}$ )
PBS	21	6	37	7	26	18
ISIS 416825	22	2	25	3	15	6
ISIS 416826	7	5	30	5	7	11
ISIS 416838	13	4	17	3	6	27
ISIS 416850	16	7	48	8	11	26
ISIS 416858	28	2	20	3	10	19
ISIS 416864	15	4	26	2	29	12
ISIS 416925	24	6	20	4	23	8
ISIS 416999	12	5	23	3	20	12
ISIS 417002	23	5	22	4	25	7
ISIS 416892	68	12	92	18	58	66
ISIS 417003	83	11	17	3	6	19

**Tabela 76**

[00489] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido nos fatores hematológicos (controle %) em ratos Sprague-Dawley

	Hemoglobina (g/dL)	HCT (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (%)
PBS	6	4	6	2	4
ISIS 416825	2	2	4	2	4
ISIS 416826	7	7	6	3	4
ISIS 416838	2	5	4	2	5
ISIS 416850	4	5	3	4	2
ISIS 416858	2	3	2	2	1
ISIS 416864	4	2	4	2	4
ISIS 416925	6	8	5	2	4



ISIS 416999	6	5	2	3	1
ISIS 417002	5	7	7	3	5
ISIS 416892	14	13	1	2	0
ISIS 417003	11	8	6	4	4

**Exemplo 36: Medição da meia vida de oligonucleotídeo anti-sentido no fígado e rim de rato Sprague-Dawley**

[00490] Os ratos Sprague Dawley foram tratados com oligonucleotídeos anti-sentido ISIS que alvejam o fator 11 humano e a meia vida do oligonucleotídeo, bem como o tempo gasto para degradação e eliminação do oligonucleotídeo do fígado e rim foi avaliado.

**Tratamento**

[00491] Grupos de quatro ratos Sprague Dawley cada foram injetados subcutaneamente duas vezes por semana durante 2 semanas com 20 mg/kg de ISIS416825, ISIS 416826, ISIS 416838, ISIS 416850, ISIS 416858, ISIS 416864, ISIS 416892, ISIS 416925, ISIS 416999, ISIS 417002, ou ISIS 417003. Três dias após a última dose, os ratos foram sacrificados e os fígados e rins foram coletados para análise.

**Medição da concentração do oligonucleotídeo**

[00492] A concentração do oligonucleotídeo de comprimento total, bem como a concentração total de oligonucleotídeo (incluindo a forma degradada) foram medidas. O método usado é uma modificação de métodos publicados previamente (Leeds et al., 1996; Geary et al., 1999) que consistem em uma extração com fenol-clorofórmio (líquido-líquido) seguida por uma extração de fase sólida. Um padrão interno (ISIS 355868, um oligonucleotídeo fosforotioato modificado por 2'-O-metoxietila 27-mer, GCGTTTGCTCTTCTTCTTGCGTTTTT, aqui designado como SEQ ID NO: 270) foi adicionado antes da extração. As concentrações de amostra de tecido foram calculadas usando curvas de calibração, com um limite menor de quantificação (LLOQ) de aproximadamente 1,14 µg/g. Os resultados são apresentados nas

tabelas 77 e 78, expressos como  $\mu\text{g/g}$  de tecido de fígado ou rim. As meias vidas foram então calculadas usando o software WinNonlin (PHARSIGHT).

**Tabela 77**

[00493] Concentração do oligonucleotídeo de comprimento total ( $\mu\text{g/g}$ ) no fígado e rim de ratos Sprague-Dawley

No ISIS.	Motivo	Rim	Fígado
416825	5-10-5	632	236
416826	5-10-5	641	178
416838	5-10-5	439	171
416850	5-10-5	259	292
416858	5-10-5	575	255
416864	5-10-5	317	130
416999	2-13-5	358	267
417002	2-13-5	291	118
417003	2-13-5	355	199
416925	3-14-3	318	165
416892	3-14-3	351	215

**Tabela 78**

[00494] Concentração do oligonucleotídeo total ( $\mu\text{g/g}$ ) no fígado e rim de ratos Sprague-Dawley

No ISIS.	Motivo	Rim	Fígado
416825	5-10-5	845	278
416826	5-10-5	775	214
416838	5-10-5	623	207
416850	5-10-5	352	346
416858	5-10-5	818	308
416864	5-10-5	516	209
416999	2-13-5	524	329
417002	2-13-5	490	183
417003	2-13-5	504	248
416925	3-14-3	642	267
416892	3-14-3	608	316

**Tabela 79**

[00495] Meia vida (dias) de oligonucleotídeos ISIS no fígado e rim de ratos Sprague-Dawley

No ISIS.	Motivo	Meia vida
416825	5-10-5	16

416826	5-10-5	13
416838	5-10-5	13
416850	5-10-5	18
416858	5-10-5	26
416864	5-10-5	13
416999	2-13-5	9
417002	2-13-5	11
417003	2-13-5	10
416925	3-14-3	12
416892	3-14-3	12

**Exemplo 37: Tolerabilidade de oligonucleotídeos anti-sentido que alvejam o fator 11 humano em camundongos CD1**

[00496] Os camundongos CD1 foram tratados com oligonucleotídeos anti-sentido ISIS que alvejam fator 11 humano e avaliados com relação à mudanças nos níveis de vários marcadores metabólicos.

**Tratamento**

[00497] Grupos de cinco camundongos CD1 cada foram injetados subcutaneamente duas vezes por semana durante 6 semanas com 50 mg/kg de ISIS 412223, ISIS 412224, ISIS 412225, ISIS 413481, ISIS 413482, ISIS 416848, ISIS 416849, ISIS 416850, ISIS 416851, ISIS 416852, ISIS 416853, ISIS 416854, ISIS 416855, ISIS 416856, ISIS 416857, ISIS 416858, ISIS 416859, ISIS 416860, ISIS 416861, ISIS 416862, ISIS 416863, ISIS 416864, ISIS 416865, ISIS 416866, ou ISIS 416867, ou. Um grupo controle de dez camundongos CD1 foi injetado subcutaneamente com PBS duas vezes por semana durante 6 semanas. As medições de peso corporal foram obtidas antes e durante todo o tratamento. Três dias após a última dose, os camundongos foram sacrificados, os pesos dos órgãos foram medidos e o sangue foi coletado para análise adicional.

**Peso corporal e pesos dos órgãos**

[00498] O peso corporal foi medido no início do estudo e, subsequentemente, duas vezes por semana. Os pesos corporais dos camundongos são apresentados na tabela 80 e os aumentos são

expressos em gramas com relação ao peso do controle com PBS obtido antes do início do tratamento. Os pesos do fígado, baço e rim foram medidos no final do estudo, e são também apresentados na tabela 80 como percentual do peso corporal. Os oligonucleotídeos anti-sentido que não afetaram mais de seis vezes os aumentos no peso do fígado e baço acima do controle com PBS foram selecionados para estudos adicionais.

**Tabela 80**

[00499] Mudança nos pesos do corpo e dos órgãos de camundongos CD1 após o tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido

	Fígado (%)	Rim (%)	Baço (%)	peso corporal (g)
PBS	5	1,5	0,3	7
ISIS 416850	6	1,6	0,4	12
ISIS 416858	7	1,6	0,6	12
ISIS 416864	5	1,6	0,3	12
ISIS 412223	6	1,5	0,4	12
ISIS 412224	6	1,6	0,5	10
ISIS 412225	6	1,5	0,4	10
ISIS 413481	6	1,5	0,5	9
ISIS 413482	6	1,6	0,5	11
ISIS 416848	6	1,5	0,4	11
ISIS 416849	8	1,5	0,4	8
ISIS 416851	7	1,5	0,5	11
ISIS 416852	6	1,5	0,4	10
ISIS 416853	8	1,5	0,7	13
ISIS 416854	7	1,2	0,4	13
ISIS 416855	8	1,4	0,6	12
ISIS 416856	6	1,4	0,4	10
ISIS 416857	7	1,6	0,5	10
ISIS 416859	6	1,5	0,4	10
ISIS 416860	6	1,4	0,4	10
ISIS 416861	5	1,3	0,4	9
ISIS 416862	6	1,5	0,4	10
ISIS 416863	5	1,5	0,4	9
ISIS 416865	6	1,5	0,4	8
ISIS 416866	5	1,6	0,4	10
ISIS 416867	5	1,4	0,4	9

**Função hepática**

[00500] Para avaliar o efeito de oligonucleotídeos ISIS na função hepática, as concentrações plasmáticas de transaminases foram medidas usando um analisador químico clínico automatizado (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). As medições de alanina transaminase (ALT) e aspartato transaminase (AST) são expressas em IU/L e os resultados são apresentados na tabela 81. Os oligonucleotídeos anti-sentido que não afetaram um aumento nos níveis de ALT/AST sete vezes abaixo dos níveis controle foram selecionados para estudos adicionais. Os níveis plasmáticos de bilirrubina, colesterol e albumina também foram medidos usando o mesmo analisador químico clínico e são apresentados na tabela 81 expressos em mg/dL. Os oligonucleotídeos anti-sentido que não afetaram um aumento nos níveis de bilirrubina mais de duas vezes dos níveis controle por tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido foram selecionados para estudos adicionais.

**Tabela 81**

[00501] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido em marcadores metabólicos no fígado de camundongos CD1

	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	Bilirrubina (mg/dL)	Albumina (mg/dL)	Colesterol (mg/dL)
PBS	32	68	0,25	3,7	135
ISIS 416850	75	99	0,21	3,5	142
ISIS 416858	640	547	0,28	4,4	181
ISIS 416864	36	67	0,19	2,6	152
ISIS 412223	60	125	0,20	3,0	117
ISIS 412224	214	183	0,19	3,4	114
ISIS 412225	40	69	0,23	3,3	128
ISIS 413481	85	143	0,18	3,2	153
ISIS 413482	54	77	0,24	3,0	138
ISIS 416848	153	153	0,19	3,1	151
ISIS 416849	1056	582	0,22	2,5	109
ISIS 416851	47	76	0,19	3,1	106
ISIS 416852	49	91	0,16	4,9	125
ISIS 416853	1023	1087	0,25	3,1	164
ISIS 416854	1613	1140	0,21	5,5	199

ISIS 416855	786	580	0,25	4,2	162
ISIS 416856	130	129	0,23	5,2	109
ISIS 416857	370	269	0,22	3,7	94
ISIS 416859	214	293	0,20	4,2	160
ISIS 416860	189	160	0,23	3,5	152
ISIS 416861	38	85	0,27	4,3	133
ISIS 416862	225	172	0,36	3,9	103
ISIS 416863	41	101	0,24	3,6	118
ISIS 416865	383	262	0,27	4,1	95
ISIS 416866	36	120	0,29	4,3	113
ISIS 416867	45	82	0,21	3,3	144

### Função renal

[00502] Para avaliar o efeito de oligonucleotídeos ISIS na função renal, as concentrações plasmáticas de nitrogênio e uréia no sangue (BUN) foram medidas usando um analisador químico clínico automatizado e os resultados são apresentados na tabela 82, expressos em mg/dL. Os oligonucleotídeos anti-sentido que não afetaram mais de duas vezes o aumento nos níveis de BUN comparados ao controle com PBS foram selecionados para estudos adicionais.

### **Tabela 82**

[00503] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido nos níveis BUN (mg/dL) no rim de camundongos CD1

	BUN
PBS	22
ISIS 416850	24
ISIS 416858	23
ISIS 416864	24
ISIS 412223	28
ISIS 412224	29
ISIS 412225	23
ISIS 413481	23
ISIS 413482	27
ISIS 416848	23
ISIS 416849	23
ISIS 416851	21
ISIS 416852	21
ISIS 416853	22

ISIS 416854	27
ISIS 416855	23
ISIS 416856	21
ISIS 416857	17
ISIS 416859	18
ISIS 416860	25
ISIS 416861	23
ISIS 416862	21
ISIS 416863	22
ISIS 416865	20
ISIS 416866	22
ISIS 416867	20

### Ensaios de hematologia

[00504] O sangue obtido de todos os grupos de camundongos foi enviado para Antech Diagnostics para medições de hematócrito (HCT), bem como medições de várias células de sangue, tais como WBC (neutrófilos, linfócitos, e monócitos), RBC e plaquetas, bem como análise do teor total de hemoglobina. Os resultados são apresentados nas tabelas 83 e 84. Os oligonucleotídeos anti-sentido que não afetaram uma diminuição na contagem de plaquetas em mais de 50 % e um aumento na contagem de monócito em mais de três vezes foram selecionados para estudos adicionais.

### **Tabela 83**

[00505] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido nos fatores hematológicos em camundongos CD1

	RBC ( $10^6/\mu\text{L}$ )	Hemoglobina (g/dL)	HCT (%)	WBC ( $10^3/\mu\text{L}$ )
PBS	10	15	51	7
ISIS 416850	10	15	49	5
ISIS 416858	9	14	50	8
ISIS 416864	10	15	52	5
ISIS 412223	9	15	48	7
ISIS 412224	10	15	50	9
ISIS 412225	9	15	50	7
ISIS 413481	9	13	45	7
ISIS 413482	10	15	50	8
ISIS 416848	9	14	47	7

ISIS 416849	9	14	48	9
ISIS 416851	9	14	47	6
ISIS 416852	9	14	49	5
ISIS 416853	11	17	56	8
ISIS 416854	9	13	43	12
ISIS 416855	9	14	50	6
ISIS 416856	9	14	47	5
ISIS 416857	10	15	53	6
ISIS 416859	10	15	49	6
ISIS 416860	10	15	51	7
ISIS 416861	9	14	48	7
ISIS 416862	9	14	49	6
ISIS 416863	9	14	48	7
ISIS 416865	9	14	50	7
ISIS 416866	9	15	51	6
ISIS 416867	10	14	47	8

**Tabela 84**

[00506] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido na contagem de células de sangue em camundongos CD1

	Neutrófilo (células/ $\mu$ L)	Linfócito (células/ $\mu$ L)	Monócitos (células/ $\mu$ L)	Plaquetas ( $10^3$ / $\mu$ L)
PBS	1023	6082	205	940
ISIS 416850	1144	4004	156	916
ISIS 416858	2229	5480	248	782
ISIS 416864	973	3921	141	750
ISIS 412223	1756	4599	200	862
ISIS 412224	2107	6284	195	647
ISIS 412225	1547	4969	293	574
ISIS 413481	1904	4329	204	841
ISIS 413482	1958	5584	275	818
ISIS 416848	1264	5268	180	953
ISIS 416849	1522	6967	253	744
ISIS 416851	1619	4162	194	984
ISIS 416852	1241	3646	189	903
ISIS 416853	2040	5184	225	801
ISIS 416854	2082	9375	455	1060
ISIS 416855	1443	4236	263	784
ISIS 416856	1292	3622	151	753



ISIS 416857	1334	3697	215	603
ISIS 416859	1561	4363	229	826
ISIS 416860	1.291	4889	161	937
ISIS 416861	1122	5119	219	836
ISIS 416862	1118	4445	174	1007
ISIS 416863	1330	5617	226	1131
ISIS 416865	1227	5148	315	872
ISIS 416866	1201	4621	211	1045
ISIS 416867	1404	6078	188	1006

**Exemplo 38: Medição da meia vida de oligonucleotídeo anti-sentido no fígado de camundongo CD1**

[00507] Quinze oligonucleotídeos anti-sentido que foram avaliados em camundongos CD1 (Exemplo 37), foram avaliados adicionalmente. Os camundongos CD1 foram tratados com oligonucleotídeos anti-sentido ISIS e a meia vida do oligonucleotídeo, bem como o tempo gasto para degradação e eliminação do oligonucleotídeo no fígado, foi avaliada.

**Tratamento**

[00508] Grupos de quinze camundongos CD1 cada foram injetados subcutaneamente duas vezes por semana durante 2 semanas com 50 mg/kg de ISIS 412223, ISIS 412225, ISIS 413481, ISIS 413482, ISIS 416851, ISIS 416852, ISIS 416856, ISIS 416860, ISIS 416861, ISIS 416863, ISIS 416866, ISIS 416867, ISIS 412224, ISIS 416848 ou ISIS 416859. Cinco camundongos de cada grupo foram sacrificados 3 dias, 28 dias e 56 dias após a última dose, os fígados foram coletados para análise.

**Medição da concentração do oligonucleotídeo**

[00509] A concentração do oligonucleotídeo de comprimento total foi medida. O método usado é uma modificação de métodos publicados previamente (Leeds et al., 1996; Geary et al., 1999) que consistem em uma extração com fenol-clorofórmio (líquido-líquido) seguida por uma extração de fase sólida. Um padrão interno (ISIS

355868, um oligonucleotídeo fosforotioato modificado por 2'-O-metoxietila 27-mer, GCGTTTGCTCTTCTTCTTGCGTTTTTT, aqui designado como SEQ ID NO: 270) foi adicionado antes da extração. As concentrações de amostra de tecido foram calculadas usando curvas de calibração, com um limite menor de quantificação (LLOQ) de aproximadamente 1,14 µg/g. Os resultados são apresentados na tabela 85 expressos como µg/g de tecido hepático. A meia vida de cada oligonucleotídeo também foi apresentada na tabela 85.

#### **Tabela 85**

[00510] Concentração do oligonucleotídeo de comprimento total e meia vida no fígado de camundongos CD1

No ISIS	Motivo	dia 3	dia 28	dia 56	Meia vida (dias)
412223	5-10-5	276	127	52	21,9
412224	5-10-5	287	111	31	16,6
412225	5-10-5	279	91	47	20,7
413481	5-10-5	185	94	31	20,6
413482	5-10-5	262	95	40	19,5
416848	5-10-5	326	147	68	23,5
416851	5-10-5	319	147	68	23,8
416852	5-10-5	306	145	83	28,4
416856	5-10-5	313	115	46	19,2
416859	5-10-5	380	156	55	19,0
416860	5-10-5	216	96	36	20,6
416861	5-10-5	175	59	39	24,5
416863	5-10-5	311	101	48	19,8
416866	5-10-5	246	87	25	16,0
416867	5-10-5	246	87	35	18,9

#### **Exemplo 39: Tolerabilidade de oligonucleotídeos anti-sentido que alvejam fator 11 humano em ratos Sprague-Dawley**

[00511] Quinze oligonucleotídeos anti-sentido que foram avaliados em camundongos CD1 (Exemplo 37), foram avaliados adicionalmente em ratos Sprague-Dawley com relação à mudanças nos níveis de vários marcadores metabólicos.

#### **Tratamento**

[00512] Grupos de quatro ratos Sprague Dawley cada foram

injetados subcutaneamente duas vezes por semana durante 6 semanas com 50 mg/kg de ISIS 412223, ISIS 412224, ISIS 412225, ISIS 413481, ISIS 413482, ISIS 416848, ISIS 416851, ISIS 416852, ISIS 416856, ISIS 416859, ISIS 416860, ISIS 416861, ISIS 416863, ISIS 416866 ou ISIS 416867. Um grupo controle de quatro ratos Sprague Dawley foi injetado subcutaneamente com PBS duas vezes por semana durante 6 semanas. As medições de peso corporal foram obtidas antes e durante todo o tratamento. Três dias após a última dose, amostras de urina foram coletadas e os ratos foram então sacrificados, os pesos dos órgãos foram medidos, e o sangue foi coletado para análise adicional.

#### **Peso corporal e pesos dos órgãos**

[00513] Os pesos corporais dos ratos foram medidos no início do estudo e, subsequentemente, duas vezes por semana. Os pesos corporais são apresentados na tabela 86 e são expressos como aumento em gramas com relação ao peso do controle com PBS obtido antes do início do tratamento. Os pesos do fígado, baço e rins foram medidos no final do estudo, e são também apresentados na tabela 86 como um percentual do peso corporal. Os oligonucleotídeos anti-sentido que não afetaram mais de seis vezes o aumento no peso do fígado e baço abaixo do controle com PBS foram selecionados para estudos adicionais.

#### **Tabela 86**

[00514] Mudança nos pesos do corpo e dos órgãos de ratos Sprague Dawley após o tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido

	Peso corporal (g)	Fígado (%)	Rim (%)	Baço (%)
PBS	179	4	0,9	0,2
ISIS 412223	126	5	1,0	0,5
ISIS 412224	165	5	1,0	0,5
ISIS 412225	184	4	1,0	0,5
ISIS 413481	147	5	0,9	0,3

ISIS 413482	158	5	1,0	0,6
ISIS 416848	117	5	1,1	0,8
ISIS 416851	169	5	0,9	0,3
ISIS 416852	152	5	1,0	0,4
ISIS 416856	156	5	1,0	0,4
ISIS 416859	128	4	1,0	0,4
ISIS 416860	123	5	1,0	0,5
ISIS 416861	182	5	0,9	0,3
ISIS 416863	197	5	1,0	0,4
ISIS 416866	171	5	1,0	0,5
ISIS 416867	129	5	1,0	0,5

### Função hepática

[00515] Para avaliar o efeito de oligonucleotídeos ISIS na função hepática, as concentrações plasmáticas de transaminases foram medidas usando um analisador químico clínico automatizado (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). As medições de alanina transaminase (ALT) e aspartato transaminase (AST) são expressas em IU/L e os resultados são apresentados na tabela 87. Os oligonucleotídeos anti-sentido que não afetaram um aumento nos níveis de ALT/AST sete vezes abaixo dos níveis controle foram selecionados para estudos adicionais. Os níveis plasmáticos de bilirrubina e albumina também foram medidos usando o mesmo analisador químico clínico e os resultados são apresentados na tabela 87 e expressos em mg/dL. Os oligonucleotídeos anti-sentido que não afetaram um aumento nos níveis de bilirrubina mais de duas vezes dos níveis controle por tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido foram selecionados para estudos adicionais.

### **Tabela 87**

[00516] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido em marcadores metabólicos no fígado de ratos Sprague-Dawley

	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	Bilirrubina (mg/dL)	Albumina (mg/dL)
PBS	42	71	0,13	4
ISIS 412223	85	180	0,14	5
ISIS 412224	84	132	0,12	4

ISIS 412225	48	108	0,15	5
ISIS 413481	54	80	0,22	4
ISIS 413482	59	157	0,14	4
ISIS 416848	89	236	0,14	3
ISIS 416851	64	91	0,14	4
ISIS 416852	49	87	0,15	4
ISIS 416856	123	222	0,13	4
ISIS 416859	114	206	0,21	5
ISIS 416860	70	157	0,15	4
ISIS 416861	89	154	0,15	5
ISIS 416863	47	78	0,13	4
ISIS 416866	41	78	0,16	4
ISIS 416867	47	126	0,17	4

### Função renal

[00517] Para avaliar o efeito de oligonucleotídeos ISIS na função renal, as concentrações plasmáticas de nitrogênio e uréia no sangue (BUN) e creatinina foram medidas usando um analisador químico clínico automatizado (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Os resultados são apresentados na tabela 88, expressos em mg/dL. Os oligonucleotídeos anti-sentido que não afetaram mais de duas vezes o aumento nos níveis de BUN comparados ao controle com PBS foram selecionados para estudos adicionais. A proteinúria total e razão de proteinúria para creatinina em amostras de urina total após o tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido foi calculada e é também apresentada na tabela 88. Os oligonucleotídeos anti-sentido que não afetaram mais de cinco vezes um aumento nas razões proteinúria/creatinina comparados ao controle com PBS foram selecionados para estudos adicionais.

### **Tabela 88**

[00518] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido em marcadores metabólicos no rim de ratos Sprague-Dawley

	BUN (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	Proteinúria total (mg/dL)	Razão proteinúria/creatinina
PBS	19	38	60	1,7

ISIS 412223	24	46	224	4,6
ISIS 412224	24	44	171	3,8
ISIS 412225	23	58	209	4,0
ISIS 413481	26	45	148	3,6
ISIS 413482	23	34	157	4,8
ISIS 416848	26	64	231	3,9
ISIS 416851	24	70	286	4,0
ISIS 416852	25	60	189	3,0
ISIS 416856	23	48	128	2,7
ISIS 416859	24	44	144	3,3
ISIS 416860	23	58	242	4,6
ISIS 416861	22	39	205	5,1
ISIS 416863	29	73	269	3,8
ISIS 416866	22	85	486	6,2
ISIS 416867	22	70	217	3,1

### Ensaio de hematologia

[00519] O sangue obtido de todos os grupos de rato foi enviado para Antech Diagnostics para medições de hematócrito (HCT), bem como medições das várias células de sangue, tais como WBC (neutrófilos e linfócitos), RBC e plaquetas, e teor total de hemoglobina. Os resultados são apresentados nas tabelas 89 e 90. Os oligonucleotídeos anti-sentido que não afetaram uma diminuição na contagem de plaquetas em mais de 50 % e um aumento na contagem de monócito em mais de três vezes foram selecionados para estudos adicionais.

### **Tabela 89**

[00520] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido nos fatores hematológicos em ratos Sprague-Dawley

	RBC (10 <sup>6</sup> /mL)	Hemoglobina (g/dL)	HCT (%)	WBC (10 <sup>3</sup> /mL)
PBS	6,9	13,2	42	9
ISIS 412223	7,2	13,1	41	20
ISIS 412224	7,4	13,4	42	20
ISIS 412225	7,4	13,4	42	15
ISIS 413481	7,5	14,2	43	14
ISIS 413482	7,1	13,2	40	13
ISIS 416848	6,0	11,1	35	17

ISIS 416851	7,4	13,7	42	11
ISIS 416852	7,2	13,4	42	13
ISIS 416856	7,7	14,1	43	19
ISIS 416859	7,8	14,0	45	16
ISIS 416860	7,8	14,1	45	17
ISIS 416861	7,7	14,6	45	15
ISIS 416863	7,6	14,1	45	17
ISIS 416866	7,8	14,0	44	20
ISIS 416867	7,8	14,0	45	14

**Tabela 90**

[00521] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido na contagem de células de sangue em ratos Sprague-Dawley

	Neutrófilo (/mL)	Linfócito (/mL)	Plaquetas (10 <sup>3</sup> /mL)
PBS	988	7307	485
ISIS 412223	1826	16990	567
ISIS 412224	1865	16807	685
ISIS 412225	1499	13204	673
ISIS 413481	1046	12707	552
ISIS 413482	1125	11430	641
ISIS 416848	1874	14316	384
ISIS 416851	1001	9911	734
ISIS 416852	836	11956	632
ISIS 416856	3280	14328	740
ISIS 416859	1414	14323	853
ISIS 416860	1841	13986	669
ISIS 416861	1813	12865	1008
ISIS 416863	1720	14669	674
ISIS 416866	1916	16834	900
ISIS 416867	3044	10405	705

**Exemplo 40: Medição da meia vida de oligonucleotídeo anti-sentido no fígado e rim de ratos Sprague-Dawley**

[00522] Os ratos Sprague Dawley foram tratados com oligonucleotídeos anti-sentido ISIS que alvejam fator 11 humano e a meia vida do oligonucleotídeo, bem como o tempo gasto para degradação e eliminação do oligonucleotídeo do fígado e rim, foi avaliada.

### Tratamento

[00523] Grupos de quatro ratos Sprague Dawley cada foram injetados subcutaneamente duas vezes por semana durante 2 semanas com 20 mg/kg de ISIS 412223, ISIS 412224, ISIS 412225, ISIS 413481, ISIS 413482, ISIS 416848, ISIS 416851, ISIS 416852, ISIS 416856, ISIS 416859, ISIS 416860, ISIS 416861, ISIS 416863, ISIS 416866 ou ISIS 416867. Três dias após a última dose, os ratos foram sacrificados e os fígados e rins foram coletados.

*Medição da concentração do oligonucleotídeo*

[00524] A concentração do oligonucleotídeo de comprimento total, bem como a concentração total de oligonucleotídeo (incluindo a forma degradada), foi medida. O método usado é uma modificação de métodos publicados previamente (Leeds et al., 1996; Geary et al., 1999) que consistem em uma extração com fenol-clorofórmio (líquido-líquido) seguida por uma extração de fase sólida. Um padrão interno (ISIS 355868, um oligonucleotídeo fosforotioato modificado por 2'-O-metoxietila 27-mer, GCGTTTGCTCTTCTTCTTGCGTTTTT, aqui designado como SEQ ID NO: 270) foi adicionado antes da extração. As concentrações de amostra de tecido foram calculadas usando curvas de calibração, com um limite menor de quantificação (LLOQ) de aproximadamente 1,14 µg/g. Os resultados são apresentados nas tabelas 91 e 92, expressos como µg/g de tecido de fígado ou rim. As meias vidas foram então calculadas usando o software WinNonlin (PHARSIGHT).

**Tabela 91**

[00525] Concentração do oligonucleotídeo de comprimento total (µg/g) no fígado e rim de ratos Sprague-Dawley

No ISIS	Motivo	Rim	Fígado
412223	5-10-5	551	97
412224	5-10-5	487	107
412225	5-10-5	202	119
413481	5-10-5	594	135
413482	5-10-5	241	95



416848	5-10-5	488	130
416851	5-10-5	264	193
416852	5-10-5	399	108
416856	5-10-5	378	84
416859	5-10-5	253	117
416860	5-10-5	247	94
416861	5-10-5	187	159
416863	5-10-5	239	82
416866	5-10-5	210	98
416867	5-10-5	201	112

**Tabela 92**

[00526] Concentração do oligonucleotídeo total (µg/g) no fígado e rim de ratos Sprague-Dawley

No ISIS	Motivo	Rim	Fígado
412223	5-10-5	395	86
412224	5-10-5	292	78
412225	5-10-5	189	117
413481	5-10-5	366	96
413482	5-10-5	217	91
416848	5-10-5	414	115
416851	5-10-5	204	178
416852	5-10-5	304	87
416856	5-10-5	313	80
416859	5-10-5	209	112
416860	5-10-5	151	76
416861	5-10-5	165	144
416863	5-10-5	203	79
416866	5-10-5	145	85
416867	5-10-5	157	98

**Tabela 93**

[00527] Meia vida (dias) de oligonucleotídeos ISIS no fígado e rim de ratos Sprague-Dawley

No ISIS	Motivo	Meia vida
412223	5-10-5	22
412224	5-10-5	17
412225	5-10-5	21
413481	5-10-5	21
413482	5-10-5	20
416848	5-10-5	24

416851	5-10-5	24
416852	5-10-5	28
416856	5-10-5	19
416859	5-10-5	19
416860	5-10-5	21
416861	5-10-5	25
416863	5-10-5	20
416866	5-10-5	16
416867	5-10-5	19

**Exemplo 41: Tolerabilidade de oligonucleotídeos anti-sentido que alvejam fator 11 humano em camundongos CD1**

[00528] Os oligonucleotídeos ISIS com motivos 6-8-6 MOE e 5-8-5 MOE que alvejam fator 11 humano foram administrados em camundongos CD1 avaliados com relação à mudanças nos níveis de vários marcadores metabólicos.

**Tratamento**

[00529] Grupos de cinco camundongos CD1 cada foram injetados subcutaneamente duas vezes por semana durante 6 semanas com 50 mg/kg de ISIS 416850, ISIS 445498, ISIS 445503, ISIS 445504, ISIS 445505, ISIS 445509, ISIS 445513, ISIS 445522, ISIS 445530, ISIS 445531 ou ISIS 445532. Um grupo controle de cinco camundongos CD1 foi injetado subcutaneamente com PBS duas vezes por semana durante 6 semanas. As medições de peso corporal foram obtidas antes e no final do período de tratamento. Três dias após a última dose, os camundongos foram sacrificados, os pesos dos órgãos foram medidos, e o sangue foi coletado para análise adicional.

**Peso corporal e peso do órgão**

[00530] As mudanças no peso corporal nos camundongos são apresentados na tabela 94 e são expressos como aumento em gramas com relação ao peso do controle com PBS obtido antes do início do tratamento. Os pesos do fígado, baço e rins foram medidos no final do estudo, e são também apresentados na tabela 94 como porcentagem do peso corporal. Os oligonucleotídeos anti-sentido que não afetaram

mais de seis vezes o aumento no peso do fígado e baço abaixo do controle com PBS foram selecionados para estudos adicionais.

**Tabela 94**

[00531] Mudança nos pesos do corpo e dos órgãos de camundongos CD1 após o tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido

	Peso corporal (g)	Fígado (%)	Rim (%)	Baço (%)
PBS	10	5	1,6	0,3
ISIS 416850	11	6	1,5	0,4
ISIS 445498	10	6	1,6	0,5
ISIS 445503	9	8	1,4	0,6
ISIS 445504	11	6	1,6	0,4
ISIS 445505	12	6	1,5	0,5
ISIS 445509	10	6	1,6	0,5
ISIS 445513	9	5	1,6	0,4
ISIS 445522	11	6	1,7	0,4
ISIS 445530	11	6	1,5	0,5
ISIS 445531	10	6	1,5	0,5
ISIS 445532	10	6	1,6	0,4

**Função hepática**

[00532] Para avaliar o efeito de oligonucleotídeos ISIS na função hepática, concentrações plasmáticas de transaminases foram medidas usando um analisador químico clínico automatizado (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). As medições de alanina transaminase (ALT) e aspartato transaminase (AST) são expressas em IU/L e os resultados são apresentados na tabela 95. Os oligonucleotídeos anti-sentido que não afetaram um aumento nos níveis de ALT/AST sete vezes abaixo dos níveis controle foram selecionados para estudos adicionais. Os níveis plasmáticos de bilirrubina e albumina também foram medidos e resultados são também apresentados na tabela 95 e expressos em mg/dL. Os oligonucleotídeos anti-sentido que não afetaram um aumento nos níveis de bilirrubina mais de duas vezes dos níveis controle por tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido foram selecionados para estudos adicionais.

**Tabela 95**

[00533] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido em marcadores metabólicos no fígado de camundongos CD1

	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	Bilirrubina (mg/dL)	Albumina (mg/dL)
PBS	34	49	0,23	3,6
ISIS 416850	90	115	0,20	3,2
ISIS 445498	66	102	0,24	3,4
ISIS 445503	1314	852	0,28	3,4
ISIS 445504	71	107	0,17	3,4
ISIS 445505	116	153	0,18	3,2
ISIS 445509	80	117	0,17	3,1
ISIS 445513	37	84	0,22	3,1
ISIS 445522	51	110	0,19	3,4
ISIS 445530	104	136	0,18	3,2
ISIS 445531	60	127	0,16	3,2
ISIS 445532	395	360	0,20	2,9

**Função renal**

[00534] Para avaliar o efeito de oligonucleotídeos ISIS na função renal, as concentrações plasmáticas de nitrogênio e uréia no sangue (BUN) foram medidas usando um analisador químico clínico automatizado (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Os resultados são apresentados na tabela 96, expressos em mg/dL. Os oligonucleotídeos anti-sentido que não afetaram mais de duas vezes o aumento nos níveis de BUN comparados ao controle com PBS foram selecionados para estudos adicionais.

**Tabela 96**

[00535] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido nos níveis BUN (mg/dL) no rim de camundongos CD1

	BUN
PBS	29

ISIS 416850	28
ISIS 445498	28
ISIS 445503	29
ISIS 445504	29
ISIS 445505	29
ISIS 445509	29
ISIS 445513	27
ISIS 445522	28
ISIS 445530	26
ISIS 445531	27
ISIS 445532	23

#### Ensaio de hematologia

[00536] O sangue obtido de todos os grupos de camundongos foi enviado para Antech Diagnostics para medições de hematócrito (HCT), bem como medições das várias células de sangue, tais como WBC (neutrófilos e linfócitos), RBC e plaquetas, e teor total de hemoglobina. Os resultados são apresentados nas tabelas 97 e 98. Os oligonucleotídeos anti-sentido que não afetaram uma diminuição na contagem de plaquetas em mais de 50 % e um aumento na contagem de monócito em mais de três vezes foram selecionados para estudos adicionais.

#### **Tabela 97**

[00537] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido nos fatores hematológicos em camundongos CD1

	RBC (10 <sup>6</sup> /mL)	Hemoglobina (g/dL)	HCT (%)	WBC (10 <sup>3</sup> /mL)
PBS	9,6	15,0	51	6
ISIS 416850	9,8	14,8	50	6
ISIS 445498	9,4	13,9	47	5
ISIS 445503	9,2	13,6	46	8
ISIS 445504	9,6	14,7	49	5
ISIS 445505	9,6	14,6	49	5
ISIS 445509	10,2	15,3	51	5

ISIS 445513,	9,8	15,0	50	7
ISIS 445522	9,7	14,6	49	5
ISIS 445530	10,0	15,1	50	7
ISIS 445531	9,4	14,5	48	9
ISIS 445532	9,7	14,8	48	7

**Tabela 98**

[00538] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido na contagem de células de sangue em camundongos CD1

	Neutrófilo (/mL)	Linfócito (/mL)	Plaquetas ( $10^3$ /mL)
PBS	1356	4166	749
ISIS 416850	1314	4710	614
ISIS 445498	1197	3241	802
ISIS 445503	1475	6436	309
ISIS 445504	959	3578	826
ISIS 445505	818	3447	725
ISIS 445509	1104	3758	1085
ISIS 445513	959	5523	942
ISIS 445522	698	3997	1005
ISIS 445530	930	5488	849
ISIS 445531	2341	6125	996
ISIS 445532	1116	5490	689

**Exemplo 42: Tolerabilidade de oligonucleotídeos anti-sentido que alvejam fator 11 humano em ratos Sprague-Dawley**

[00539] Oito oligonucleotídeos anti-sentido, que foram avaliados em camundongos CD1 (Exemplo 41), foram avaliados adicionalmente em ratos Sprague-Dawley com relação à mudanças nos níveis de vários marcadores metabólicos.

#### Tratamento

[00540] Grupos de quatros ratos Sprague Dawley cada foram injetados subcutaneamente duas vezes por semana durante 6 semanas com 50 mg/kg de ISIS 445498, ISIS 445504, ISIS 445505, ISIS 445509, ISIS 445513, ISIS 445522, ISIS 445530 ou ISIS 445531. Um grupo controle de ratos Sprague Dawley foi injetado subcutaneamente com PBS duas vezes por semana durante 6 semanas. As medições de peso corporal foram obtidas antes e

durante todo o tratamento. Três dias após a última dose, amostras de urina foram coletadas e os ratos foram então sacrificados, os pesos dos órgãos foram medidos, e o sangue foi coletado para análise adicional.

#### Peso corporal e peso do órgão

[00541] Os pesos corporais dos ratos foram medidos no início do estudo e, subsequentemente, duas vezes por semana. Os pesos corporais são apresentados na tabela 99 e são expressos como aumento percentual com relação ao peso do controle com PBS obtido antes do início do tratamento. Os pesos do fígado, baço e rins foram medidos no final do estudo e são também apresentados na tabela 99 como um percentual do peso corporal. Os oligonucleotídeos anti-sentido que não afetaram mais de seis vezes o aumento no peso do fígado e baço abaixo do controle com PBS foram selecionados para estudos adicionais.

#### **Tabela 99**

[00542] Mudança nos pesos do corpo e dos órgãos de ratos Sprague Dawley após o tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido (%)

	Peso corporal	Fígado	Baço	Rim
ISIS 445498	-17	+26	+107	-10
ISIS 445504	-15	+22	+116	+6
ISIS 445505	-21	+12	+146	+2
ISIS 445509	-17	+16	+252	+3
ISIS 445513	-13	+25	+194	+15
ISIS 445522	-13	+26	+184	+19
ISIS 445530	-7	+24	+99	+4
ISIS 445531	-10	+17	+89	+4

#### Função hepática

[00543] Para avaliar o efeito de oligonucleotídeos ISIS na função hepática, concentrações plasmáticas de transaminases foram medidas usando um analisador químico clínico automatizado (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). As concentrações plasmáticas de ALT (alanina

transaminase) e AST (aspartato transaminase) foram medidas e os resultados são apresentados na tabela 100, expressos em IU/L. Os oligonucleotídeos anti-sentido que não afetaram um aumento nos níveis de ALT/AST sete vezes abaixo dos níveis controle foram selecionados para estudos adicionais. Os níveis plasmáticos de bilirrubina e albumina também foram medidos usando o mesmo analisador químico clínico; os resultados são apresentados na tabela 100 e expressos em mg/dL. Os oligonucleotídeos anti-sentido que não afetaram um aumento nos níveis de bilirrubina mais de duas vezes dos níveis controle por tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido foram selecionados para estudos adicionais.

**Tabela 100**

[00544] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido em marcadores metabólicos no fígado de ratos Sprague-Dawley

	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	Bilirrubina (mg/dL)	Albumina (mg/dL)
PBS	102	36	0,13	3,7
ISIS 445498	417	124	0,14	3,7
ISIS 445504	206	86	0,11	3,5
ISIS 445505	356	243	0,15	3,6
ISIS 445509	676	291	0,14	3,5
ISIS 445513	214	91	0,15	3,5
ISIS 445522	240	138	0,47	3,6
ISIS 445530	116	56	0,11	3,7
ISIS 445531	272	137	0,12	3,7

**Função renal**

[00545] Para avaliar o efeito de oligonucleotídeos ISIS na função renal, as concentrações plasmáticas de nitrogênio e uréia no sangue (BUN) e creatinina foram medidas usando um analisador químico clínico automatizado (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Os resultados são apresentados na tabela 101, expressos em mg/dL. Os oligonucleotídeos anti-sentido que não afetaram mais de duas vezes o aumento nos níveis de BUN comparados ao controle com PBS foram selecionados para estudos adicionais. A proteinúria total e razão de



proteinúria para creatinina em amostras de urina total após o tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido foi calculada e é também apresentada na tabela 101. Os oligonucleotídeos anti-sentido que não afetaram mais de cinco vezes um aumento nas razões proteinúria/creatinina comparados ao controle com PBS foram selecionados para estudos adicionais.

**Tabela 101**

[00546] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido em marcadores metabólicos no rim de ratos Sprague-Dawley

	BUN (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	Razão de proteinúria/creatinina
PBS	18	0,4	1,4
ISIS 445498	25	0,5	3,1
ISIS 445504	26	0,4	4,3
ISIS 445505	24	0,4	3,8
ISIS 445509	27	0,5	4,0
ISIS 445513	24	0,4	4,6
ISIS 445522	25	0,4	6,4
ISIS 445530	22	0,4	4,2
ISIS 445531	23	0,4	3,4

**Ensaaios de hematologia**

[00547] O sangue obtido de todos os grupos de rato foi enviado para Antech Diagnostics para medições de hematócrito (HCT), bem como medições das várias células de sangue, tais como WBC (neutrófilos, linfócitos, e monócitos), RBC e plaquetas, e teor total de hemoglobina. Os resultados são apresentados nas tabelas 102 e 103. Os oligonucleotídeos anti-sentido que não afetaram uma diminuição na contagem de plaquetas em mais de 50 % e um aumento na contagem de monócito em mais de três vezes foram selecionados para estudos adicionais.

**Tabela 102**

[00548] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido nos fatores hematológicos em ratos Sprague-Dawley

	RBC (/pL)	Hemoglobina (g/dL)	HCT (%)	WBC (/nL)
PBS	8,8	16,0	55	13
ISIS 445498	8,5	14,7	49	13
ISIS 445504	8,9	14,7	50	16
ISIS 445505	9,1	15,0	50	21
ISIS 445509	8,4	14,1	47	17
ISIS 445513	7,8	13,0	44	17
ISIS 445522	7,7	13,6	47	18
ISIS 445530	8,9	14,7	50	12
ISIS 445531	8,8	14,8	50	13

**Tabela 103**

[00549] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido na contagem de células de sangue em ratos Sprague-Dawley

	Neutrófilo (%)	Linfócito (%)	Monócitos (%)	Plaquetas (/nL)
PBS	14	82	2,0	1007
ISIS 445498	9	89	2,0	1061
ISIS 445504	10	87	2,0	776
ISIS 445505	10	87	2,5	1.089
ISIS 445509	11	84	3,8	1115
ISIS 445513	14	82	3,5	1051
ISIS 445522	13	84	2,8	1334
ISIS 445530	11	87	2,0	1249
ISIS 445531	10	86	2,8	1023

**Exemplo 43: Tolerabilidade de oligonucleotídeos anti-sentido que alvejam fator 11 humano em camundongos CD1**

[00550] Os oligonucleotídeos ISIS com motivos 4-8-4 MOE, 3-8-3 MOE, 2-10-2 MOE, 3-10-3 MOE e 4-10-4 MOE que alvejam o fator 11 humano foram administrados em camundongos CD1, avaliados com relação às mudanças nos níveis de vários marcadores metabólicos.

**Tratamento**

[00551] Os grupos de cinco camundongos CD1 cada foram injetados subcutaneamente duas vezes por semana durante 6 semanas com 50 mg/kg de ISIS 449707, ISIS 449708, ISIS 449409,

ISIS 449710 ou ISIS 449711. Um grupo controle de cinco camundongos CD1 foi injetado subcutaneamente com PBS duas vezes por semana durante 6 semanas. As medições de peso corporal foram obtidas antes e no final do período de tratamento. Três dias após a última dose, os camundongos foram sacrificados, os pesos dos órgãos foram medidos, e o sangue foi coletado para análise adicional.

**Peso corporal e peso do órgão**

[00552] Os pesos corporais dos camundongos obtidos no final do estudo são apresentados na tabela 104 e são expressos em gramas. Os pesos do fígado, baço e rins também foram medidos no final do estudo e são também apresentados na tabela 104 como porcentagem do peso corporal. Os oligonucleotídeos anti-sentido que não afetaram mais de seis vezes o aumento no peso do fígado e baço abaixo do controle com PBS foram selecionados para estudos adicionais.

**Tabela 104**

[00553] Mudança nos pesos do corpo e dos órgãos de camundongos CD1 após o tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido

	Peso corporal (g)	Fígado (%)	Baço (%)	Rim (%)
PBS	39	-	-	-
ISIS 449707	42	+11	+63	-5
ISIS 449708	40	+17	+66	0
ISIS 449709	40	+15	+62	-14
ISIS 449710	42	+6	+43	-7
ISIS 449711	42	+18	+63	-12

**Função hepática**

[00554] Para avaliar o efeito de oligonucleotídeos ISIS na função hepática, concentrações plasmáticas de transaminases foram medidas usando um analisador químico clínico automatizado (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Concentrações plasmáticas de ALT (alanina transaminase) e AST (aspartato transaminase) foram medidas e os resultados são apresentados na tabela 105, expressos em IU/L. Os

oligonucleotídeos anti-sentido que não afetaram um aumento nos níveis de ALT/AST sete vezes abaixo dos níveis controle foram selecionados para estudos adicionais. Os níveis plasmáticos de bilirrubina e albumina também foram medidos usando o mesmo analisador químico clínico e os resultados são apresentados na tabela 105 e expressos em mg/dL. Os oligonucleotídeos anti-sentido que não afetaram um aumento nos níveis de bilirrubina mais de duas vezes dos níveis controle por tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido foram selecionados para estudos adicionais.

### **Tabela 105**

[00555] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido em marcadores metabólicos no fígado de camundongos CD1

	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	Bilirrubina (mg/dL)	Albumina (mg/dL)
PBS	39	52	0,22	3,2
ISIS 449707	41	62	0,19	2,3
ISIS 449708	66	103	0,17	2,8
ISIS 449709	62	83	0,18	2,8
ISIS 449710	43	95	0,18	2,8
ISIS 449711	52	83	0,22	2,8

### **Função renal**

[00556] Para avaliar o efeito de oligonucleotídeos ISIS na função renal, concentrações plasmáticas de nitrogênio e uréia no sangue (BUN) e creatinina foram medidas usando um analisador químico clínico automatizado (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Os resultados são apresentados na tabela 106, expressos em mg/dL. Os oligonucleotídeos anti-sentido que não afetaram mais de duas vezes o aumento nos níveis de BUN comparados ao controle com PBS foram selecionados para estudos adicionais.

**Tabela 106**

[00557] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido em marcadores metabólicos (mg/dL) no rim de camundongos CD1

	BUN	Creatinina
PBS	28	0,3
ISIS 449707	27	0,2
ISIS 449708	28	0,2
ISIS 449709	34	0,3
ISIS 449710	29	0,2
ISIS 449711	26	0,2

**Ensaaios de hematologia**

[00558] O sangue obtido de todos os grupos de camundongos foram enviados para Antech Diagnostics para medições de hematócrito (HCT), bem como medições das várias células de sangue, tais como WBC (neutrófilos, linfócitos, e monócitos), RBC e plaquetas, e teor total de hemoglobina. Os resultados são apresentados nas tabelas 107 e 108. Os oligonucleotídeos anti-sentido que não afetaram uma diminuição na contagem de plaquetas em mais de 50 % e um aumento na contagem de monócito em mais de três vezes foram selecionados para estudos adicionais.

**Tabela 107**

[00559] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido nos fatores hematológicos em camundongos CD1

	RBC (/pL)	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)	WBC (/nL)
PBS	9,8	14,6	54	6
ISIS 449707	8,4	12,4	45	6
ISIS 449708	9,2	13,2	48	7
ISIS 449709	9,2	13,2	49	5
ISIS 449710	9,1	13,5	48	7
ISIS 449711	9,0	13,3	48	6

**Tabela 108**

[00560] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido na contagem de células de sangue em camundongos CD1

	Neutrófilos (%)	Linfócitos (%)	Monócitos (%)	Plaquetas (/nL)
PBS	15	80	3	1383
ISIS 449707	11	85	3	1386
ISIS 449708	17	77	5	1395
ISIS 449709	19	76	4	1447
ISIS 449710	15	81	3	1245
ISIS 449711	15	79	6	1225

**Exemplo 44: Tolerabilidade de oligonucleotídeos anti-sentido que alvejam fator 11 humano em ratos Sprague-Dawley**

[00561] Cincos oligonucleotídeos anti-sentido que foram avaliados em camundongos CD1 (Exemplo 43) foram avaliados adicionalmente em ratos Sprague-Dawley com relação à mudanças nos níveis de vários marcadores metabólicos.

**Tratamento**

[00562] Grupos de quatros ratos Sprague Dawley cada foram injetados subcutaneamente duas vezes por semana durante 6 semanas com 50 mg/kg de ISIS 449707, ISIS 449708, ISIS 449709, ISIS 449710 ou ISIS 449711. Um grupo controle de quatros ratos Sprague Dawley foi injetado subcutaneamente com PBS duas vezes por semana durante 6 semanas. As medições de peso corporal foram obtidas antes e durante todo o tratamento. Três dias após a última dose, amostras de urina foram coletadas e os ratos foram então sacrificados, os pesos dos órgãos foram medidos e o sangue foi coletado para análise adicional.

***Peso corporal e peso do órgão***

[00563] Os pesos corporais dos ratos foram medidos no início do estudo e no final do estudo. As mudanças no peso corporal são apresentados na tabela 109 e são expressos como aumento em gramas com relação ao peso do controle com PBS obtido antes do

início do tratamento. Os pesos do fígado, baço e rins foram medidos no final do estudo, e são também apresentados na tabela 109 como um percentual do peso corporal. Os oligonucleotídeos anti-sentido que não afetaram mais de seis vezes o aumento no peso do fígado e baço abaixo do controle com PBS foram selecionados para estudos adicionais.

**Tabela 109**

[00564] Mudança nos pesos do corpo e dos órgãos de ratos Sprague Dawley após o tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido

	Peso corporal (g)	Fígado (%)	Baço (%)	Rim (%)
PBS	478	-	-	-
ISIS 449707	352	+41	+400	+80
ISIS 449708	382	+31	+259	+40
ISIS 449709	376	+8	+231	+19
ISIS 449710	344	+82	+302	+50
ISIS 449711	362	+52	+327	+72

**Função hepática**

[00565] Para avaliar o impacto de oligonucleotídeos ISIS na função hepática, concentrações plasmáticas de ALT e AST foram medidas usando um analisador químico clínico automatizado (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Concentrações plasmáticas de alanina transaminase (ALT) e aspartato transaminase (AST) foram medidas e os resultados são apresentados na tabela 110 expressos em IU/L. Os oligonucleotídeos anti-sentido que não afetaram um aumento nos níveis de ALT/AST sete vezes abaixo dos níveis controle foram selecionados para estudos adicionais. Os níveis plasmáticos de bilirrubina e albumina também foram medidos e os resultados são apresentados na tabela 110 e expressos em mg/dL. Os oligonucleotídeos anti-sentido que não afetaram um aumento nos níveis de bilirrubina mais de duas vezes dos níveis controle por tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido foram selecionados para estudos adicionais.

**Tabela 110**

[00566] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido em marcadores metabólicos no fígado de ratos Sprague-Dawley

	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	Bilirrubina (mg/dL)	Albumina (mg/dL)
PBS	41	107	0,1	3,4
ISIS 449707	61	199	0,2	3,1
ISIS 449708	25	90	0,1	3,2
ISIS 449709	63	126	0,2	3,1
ISIS 449710	36	211	0,1	2,9
ISIS 449711	32	163	0,1	2,9

**Função renal**

[00567] Para avaliar o impacto de oligonucleotídeos ISIS na função renal, concentrações plasmáticas de BUN e creatinina foram medidas usando um analisador químico clínico automatizado (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Os resultados são apresentados na tabela 111, expressos em mg/dL. Os oligonucleotídeos anti-sentido que não afetaram mais de duas vezes o aumento nos níveis de BUN comparados ao controle com PBS foram selecionados para estudos adicionais. A proteinúria total e razão de proteinúria para creatinina em amostras de urina total após o tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido foi calculada e é também apresentada na tabela 111. Os oligonucleotídeos anti-sentido que não afetaram mais de cinco vezes um aumento nas razões proteinúria/creatinina comparados ao controle com PBS foram selecionados para estudos adicionais.

**Tabela 111**

[00568] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido em marcadores metabólicos no rim de ratos Sprague-Dawley

	BUN (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	Razão Proteinúria/creatinina
PBS	22	0,4	1,5
ISIS 449707	24	0,4	3,2
ISIS 449708	24	0,4	5,7
ISIS 449709	24	0,4	3,4
ISIS 449710	29	0,3	5,9
ISIS 449711	28	0,4	7,3



**Ensaio de hematologia**

[00569] O sangue obtido de todos os grupos de rato foi enviado para Antech Diagnostics para medições de hematócrito (HCT), bem como medições das várias células de sangue, tais como WBC (neutrófilos, linfócitos, e monócitos), RBC e plaquetas, e teor total de hemoglobina. Os resultados são apresentados nas tabelas 112 e 113. Os oligonucleotídeos anti-sentido que não afetaram uma diminuição na contagem de plaquetas em mais de 50 % e um aumento na contagem de monócito em mais de três vezes foram selecionados para estudos adicionais.

**Tabela 112**

[00570] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido nos fatores hematológicos em ratos Sprague-Dawley

	RBC (/pL)	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)	WBC (/nL)
PBS	8,2	15,1	50	16
ISIS 449707	6,0	12,0	40	20
ISIS 449708	6,6	12,2	40	22
ISIS 449709	6,9	12,6	41	14
ISIS 449710	6,3	12,5	41	13
ISIS 449711	6,4	12,6	43	13

**Tabela 113**

[00571] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido na contagem de células de sangue em ratos Sprague-Dawley

	Neutrófilos (%)	Linfócitos (%)	Monócitos (%)	Plaquetas (/nL)
PBS	12	84	2	1004
ISIS 449707	6	91	2	722
ISIS 449708	6	92	2	925
ISIS 449709	5	91	3	631
ISIS 449710	6	91	2	509
ISIS 449711	7	90	2	919

**Exemplo 45: Efeito farmacológico dose-dependente de oligonucleotídeos anti-sentido que alvejam fator 11 humano em macacos cinomolgos**

[00572] Vários oligonucleotídeos anti-sentido foram testados em

macacos cinomolgos para determinar os efeitos farmacológicos dos oligonucleotídeos na atividade do fator 11, períodos de anti-coagulação e sangramento, distribuições no fígado e rim e tolerabilidade. Todos os oligonucleotídeos ISIS usados neste estudo alvejam o RNAm do fator 11 humano e apresentam também reação totalmente cruzada com a sequência de gene do macaco reso (ver tabela 44). Espera-se que os oligonucleotídeos ISIS de macacos reso apresente reação completamente cruzada com a sequência de gene do macaco cinomolgo igualmente. Durante o período que o estudo foi submetido, a sequência genômica de macaco cinomolgo não estava disponível na base de dados National Center for Biotechnology Information (NCBI); portanto, a reatividade cruzada com a sequência de gene do macaco cinomolgo pode ser confirmada.

#### Tratamento

[00573] Os grupos, cada um consistindo em dois macacos macho e três fêmeas, foram injetados subcutaneamente com ISIS 416838, ISIS 416850, ISIS 416858, ISIS 416864 ou ISIS 417002 em doses escalonadas. O oligonucleotídeo anti-sentido foi administrado aos macacos em 5 mg/kg três vezes por semana durante 1 semana; 5 mg/kg duas vezes por semana durante as semanas 2 e 3; 10 mg/kg três vezes por semana na semana 4; 10 mg/kg duas vezes por semana durante semanas 5 e 6; 25 mg/kg três vezes por semana na semana 7; e 25 mg/kg duas vezes por semana durante semanas 8, 9, 10, 11, e 12. Um grupo controle, que consiste em dois macacos machos e três fêmeas, foi injetado subcutaneamente com PBS de acordo com o mesmo regime de dosagem. Um grupo experimental adicional, que consiste em dois macacos machos e três fêmeas, foi injetado subcutaneamente com ISIS 416850 em um regime de dose crônica menor. O oligonucleotídeo anti-sentido foi administrado aos macacos em 5 mg/kg três vezes por semana durante a semana 1; 5

mg/kg duas vezes por semana durante a semana 2 e 3; 10 mg/kg três vezes por semana durante a semana 4; e 10 mg/kg duas vezes por semana durante as semanas 5 a 12. Os pesos corporais foram medidos semanalmente. As amostras de sangue foram coletadas 14 dias e 5 dias antes do início do tratamento e, subsequentemente, uma vez por semana para a análise da atividade protéica do fator 11 no plasma, medição de fibrinogênio, medições PT e aPTT, períodos de sangramento, e medição de vários fatores hematológicos. No dia 85, os macacos foram eutanizados por sangria, embora em anestesia profunda, e os órgãos coletados para análise adicional.

#### Análise RNA

[00574] No dia 85, o RNA foi extraído do tecido hepático para análise por PCR em tempo real do fator 11, usando conjunto de sonda de oligonucleotídeo iniciador LTS00301 (sequência de oligonucleotídeo iniciador sentido ACACGCATTAAAAAGAGCAAAGC, aqui designado como SEQ ID NO 271; sequência de oligonucleotídeo iniciador anti-sentido CAGTGTCATGGTAAAATGAAGAATGG, aqui designado como SEQ ID NO: 272; e sequência da sonda TGCAGGCACAGCATCCCAGTGTCTX, aqui designado como SEQ ID NO. 273). Os resultados são apresentados como inibição percentual do fator 11, com relação ao controle com PBS. Da maneira mostrada na tabela 114, o tratamento com oligonucleotídeos ISIS resultou na redução significativa de RNAm do fator 11 em comparação ao controle com PBS.

#### **Tabela 114**

[00575] Inibição de RNAm do fator 11 no fígado de macaco cinomolgo com relação ao controle com PBS

No ISIS	% de inibição
416838	37
416850	84
416858	90
416864	44

417002

57

**Análise protéica**

[00576] Amostras de plasma obtidas de todos os grupos de macaco em dias diferentes foram analisadas por um ensaio ELISA do estilo sanduíche (Affinity Biologicals Inc.) usando um anticorpo anti-fator 11 policlonal purificado por afinidade como o anticorpo de captura e um anticorpo anti-fator 11 policlonal purificado por peroxidase como o anticorpo de detecção. O plasma de macaco foi diluído 1:50 para o ensaio. A atividade da peroxidase foi expressa por incubação com o substrato o-fenilenodiamina. A cor produzida foi quantificada usando um leitor de microplaca a 490 nm e foi considerada ser proporcional à concentração de fator 11 nas amostras.

[00577] Os resultados são apresentados na tabela 115, expressos como redução percentual com relação àquela do controle com PBS. Tratamento com ISIS 416850 e ISIS 416858 resultou em uma diminuição dependente do tempo nos níveis de proteína.

**Tabela 115**

[00578] Inibição de proteína do fator 11 no fígado de macaco cinomolgo com relação ao controle com PBS

Dias	ISIS 416838	ISIS 416850	ISIS 416858	ISIS 416864	ISIS 417002	ISIS 416850*
-14	0	0	0	0	0	0
-5	0	0	0	5	0	1
8	3	8	6	7	0	6
15	4	4	16	9	4	13
22	5	11	23	7	2	12
29	8	15	28	10	8	20
36	11	17	35	9	8	22
43	5	23	39	9	9	24
50	8	42	49	10	13	30
57	10	49	60	7	24	34
64	11	55	68	5	26	37
71	12	57	71	10	30	41
78	10	63	73	9	22	42
85	10	64	78	8	23	34

**Ensaio de PT e aPTT**

[00579] Amostras de sangue foram coletadas em tubos contendo citrato de sódio. PT e aPTT foram determinados em duplicata com um instrumento de coagulação ACL 9000 (Instrumentation Laboratory, Itália). Os resultados foram interpolados em uma curva padrão de plasma de macaco controle citratado em diluições seriadas testada para fornecer um resultado relatado em percentual normal.

[00580] O tempo de protrombina (PT) e tempo de tromboplastina parcial ativada (aPTT) foram medidos usando plasma pobre em plaquetas (PPP) de macacos tratados com oligonucleotídeos ISIS. Os valores de PT e aPTT são fornecidos nas tabelas 116 e 117 e são relatados como os valores da razão normalizada internacional (INR). Os valores INR para PT e aPTT foram determinados dividindo o valor PT ou aPTT para cada grupo experimental pelo PT ou aPTT para o grupo tratado com PBS. Esta razão foi então originada com relação à energia do índice de sensibilidade internacional (ISI) do fator do tecido usado. O ISIS oligonucleotídeo, ISIS 416850, fornecido com o regime de dose crônica, é distinguido dos outros oligonucleotídeos com um asterisco (\*).

[00581] Da maneira mostrada na tabela 116, PT não se prolongou significativamente em macacos tratados com oligonucleotídeos ISIS tanto no regime de dose em escala quanto no regime de dose crônica. Entretanto, aPTT prolongou-se de uma maneira dependente da dose, da maneira apresentada na tabela 117. Estes dados sugerem que a redução anti-sentido de fator 11 afeta a via de ativação de contato, mas não a via extrínseca de coagulação do sangue. Portanto, redução anti-sentido de fator 11 é usada para inibir a formação de um trombo ou coágulo em resposta à uma parede de vaso anormal, mas não em resposta à lesão tecidual.

#### **Tabela 116**

[00582] Efeito de oligonucleotídeos ISIS anti-sentido na razão de

## PT em macacos cinomolgos

dia	ISIS 416838	ISIS 416850	ISIS 416858	ISIS 416864	ISIS 417002	ISIS 416850*
-14	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
-5	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
8	1,03	1,00	1,05	1,02	1,02	1,03
15	1,03	1,02	1,07	1,07	1,04	1,06
22	1,07	1,02	1,06	1,03	1,04	1,06
29	1,03	1,03	1,08	1,06	1,01	1,00
36	1,05	1,02	1,07	1,06	1,05	1,06
43	1,03	1,01	1,08	1,04	1,03	1,02
50	1,02	1,02	1,03	1,01	0,99	0,98
57	1,04	1,04	1,09	1,08	1,03	n.d.
64	1,04	1,03	1,09	1,10	1,03	n.d.
71	1,02	1,03	1,07	1,07	0,99	n.d.
78	1,04	1,05	1,10	1,08	1,02	n.d.
85	1,05	1,04	1,07	1,13	1,02	n.d.

n.d.=sem dados

**Tabela 117**

[00583] Efeito de oligonucleotídeos ISIS anti-sentido na razão de aPTT em macacos cinomolgos

dia	ISIS 416838	ISIS 416850	ISIS 416858	ISIS 416864	ISIS 417002	ISIS 416850*
-14	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
-5	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
8	1,07	1,05	1,03	1,05	1,05	1,12
15	1,05	1,05	1,07	1,03	1,03	1,07
22	1,20	1,13	1,18	1,11	1,16	1,21
29	1,19	1,13	1,20	1,13	1,11	1,26
36	1,20	1,26	1,36	1,19	1,18	1,34
43	1,18	1,17	1,28	1,07	1,06	1,22
50	1,25	1,68	1,55	1,26	1,18	1,35
57	1,21	1,59	1,59	1,19	1,22	n.d.
64	1,18	1,64	1,60	1,12	1,11	n.d.
71	1,15	1,76	1,70	1,18	1,16	n.d.
78	1,19	1,88	1,79	1,18	1,18	n.d.
85	1,22	1,99	1,76	1,25	1,20	n.d.

n.d.=sem dados

Análise da atividade protéica

[00584] Amostras de sangue foram coletadas em diversos períodos de tempo e a pró-enzima do fator 11 foi medida usando um ensaio de

F11 com base no tempo de coagulação. Os tempos de coagulação foram determinados em duplicata com um instrumento de coagulação semi-automatizado ST4 (Diagnostica Stago, NJ). Trinta  $\mu\text{L}$  de amostra de plasma citratado diluído 1/20 em tampão HEPES-NaCl com BSA foram incubados com 30  $\mu\text{L}$  de reagente aPTT (aPTT automatizada, Organon Technika, NC) e 30  $\mu\text{L}$  de plasma citratado deficiente de fator 11 (George King Bio-Medical Inc.) a 37 °C por 5 minutos, seguido pela adição de 30  $\mu\text{L}$  de  $\text{CaCl}_2$  25 mM, iniciaram a coagulação. Os resultados foram interpolados em uma curva padrão de plasma controle citratado diluído em série.

[00585] Os resultados são apresentados na tabela 118 como inibição percentual da atividade do fator 11, com relação ao controle com PBS. O oligonucleotídeo ISIS, ISIS 416850, fornecido com o regime de dose crônica é distinguido dos outros oligonucleotídeos com um asterisco (\*).

### **Tabela 118**

[00586] Inibição de proteína do fator 11 por oligonucleotídeos anti-sentido ISIS fornecidos em regime de dose/dose crônica em escala em macacos cinomolgos

Dias antes/após tratamento	ISIS 416838	ISIS 416850	ISIS 416858	ISIS 416864	ISIS 417002	ISIS 416850*
-14	0	0	0	0	0	0
-5	0	0	0	5	0	1
8	3	8	6	7	0	6
15	4	4	16	9	4	13
22	5	11	23	7	2	12
29	8	15	28	10	8	20
36	11	17	35	9	8	24
43	5	23	39	9	9	24
50	8	42	49	10	13	30
57	10	49	60	7	24	n.d.
64	11	55	68	5	26	n.d.
71	12	57	71	10	30	n.d.
78	10	63	73	9	22	n.d.
85	10	64	78	8	23	n.d.

n.d.=sem dados

### Ensaio do fibrinogênio

[00587] Nove partes do plasma fresco de macaco foram coletadas em uma parte de citrato de trisódio. As amostras foram avaliadas com relação ao teor de fibrinogênio usando um instrumento de coagulação ACL 9000 (Instrumentation Laboratory, Itália). Os resultados são apresentados na tabela 119, expressos em mg/dL. Os oligonucleotídeos ISIS, ISIS 416850, fornecidos com o regime de dose crônica são distinguidos dos outros oligonucleotídeos com um asterisco (\*).

### **Tabela 119**

[00588] Efeito de oligonucleotídeos ISIS anti-sentido nos níveis de fibrinogênios em macacos cinomolgos

Dias antes/após tratamento	PBS	ISIS 416838	ISIS 416850	ISIS 416858	ISIS 416864	ISIS 417002	ISIS 416850*
-14	296	251	310	277	300	291	274
-5	246	205	261	246	243	222	227
8	245	209	281	246	227	221	232
15	207	198	270	219	210	195	174
22	219	183	243	222	184	199	192
29	231	184	234	220	205	199	192
36	235	182	232	225	202	191	185
43	231	186	219	229	198	187	194
50	251	216	215	259	233	236	204
57	235	190	186	225	200	201	n.d.
64	240	190	190	236	218	236	n.d.
71	233	199	178	239	245	228	n.d.
78	234	189	177	234	250	221	n.d.
85	246	196	187	243	240	224	n.d.

n.d.=sem dados

### Ensaio de sangramento

[00589] Em dias diferentes, durante o período de tratamento, o ensaio de sangramento foi realizado usando um dispositivo Surgicutt Jr. (ITC, New Jersey). Os macacos foram colocados em cadeira de macaco com seu braço colocado em um suporte firme. O braço foi



levemente depilado e um esfigmomanômetro foi colocado na porção superior do braço. O medidor do esfigmomanômetro foi inflado a 40 mm Hg e esta pressão foi mantida em todo o procedimento. A área na porção superior do braço a ser incisada foi limpa com um sabão anti-séptico e o dispositivo Surgicutt Jr foi usado para fazer uma incisão com o aspecto lateral, na superfície volar do antebraço, paralela e 5 cm abaixo da dobra antecubital. No exato momento que a incisão foi feita, foi iniciado um cronômetro. A cada 30 segundos, o sangue a partir da incisão foi absorvido usando um papel absorvente sem tocar diretamente a incisão, de maneira tal que a formação do tampão de plaqueta não seja interrompido. Sangue foi absorvido a cada 30 segundos até que o sangue não corresse mais o papel. O cronômetro foi então parado e o tempo de sangramento determinado. O esfigmomanômetro foi removido do braço do animal, o sítio da incisão foi esfregado anti-septicamente e uma fita para fechar a ferida foi aplicada. Os resultados são fornecidos na tabela X, expressos em segundos. Os resultados são fornecidos na tabela 120. Os oligonucleotídeos ISIS, ISIS 416850, fornecidos com o regime de dose crônica é distinguido dos outros oligonucleotídeos com um asterisco (\*).

[00590] Estes dados sugerem que o potencial hemorrágico dos compostos aqui fornecidos é baixo.

### **Tabela 120**

[00591] Ensaio de sangramento em macacos cinomolgos

Dias antes/a pós tratamento	PBS	ISIS 416838	ISIS 416850	ISIS 416858	ISIS 416864	ISIS 417002	ISIS 416850*
-14	147	200	172	154	166	185	177
-5	153	150	127	149	111	175	93
15	111	167	165	146	153	174	149
22	113	165	151	100	133	194	143

36	174	166	137	206	205	186	221
43	157	120	216	111	146	120	156
57	147	238	195	138	216	206	n.d.
64	113	131	201	113	218	146	n.d.
78	114	145	203	186	170	163	n.d.
85	147	201	201	191	203	182	n.d.

#### Ensaio de agregação plaquetária

[00592] A agregação plaquetária iniciou adicionando 1 mmol/L ADP e/ou 3 µg de colágeno (dependendo do dia da coleta, da maneira representada na tabela 121) às amostras de plasma, e procegiu naturalmente por 10 minutos. A agregação foi caracterizada registrando a mudança na resistência elétrica ou impedância e a mudança no declínio inicial da agregação após a mudança na forma da plaqueta. O teste de agregação foi realizado duas vezes por amostra em cada dia de coleta e o valor médio foi obtido. O oligonucleotídeo ISIS, ISIS 416850, fornecido com o regime de dose crônica é distinguido dos outros oligonucleotídeos com um asterisco (\*).

#### **Tabela 121**

[00593] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido na agregação plaquetária em macacos cinomolgos em Ohms

	dia -5 (com colágenon)	dia 15 (com ADP)	dia 36 (com ADP)	dia 43 (com colágenon)	dia 57 (com ADP)	dia 64 (com colágenon)	dia 78 (com ADP)	dia 85 (com ADP)	dia 85 (com colágenon)
PBS	17	15	7	14	16	13	12	16	17
ISIS 416838	15	15	8	16	7	13	11	15	24
ISIS 416850	23	12	16	16	18	17	9	22	26
ISIS 416858	22	19	17	16	11	14	8	18	23
ISIS 416864	27	20	17.8	20	18	17	13	22	28
ISIS 417002	21	16	13.9	19	18	18	18	22	24
ISIS 416850*	21	14	11.6	21	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

n.d.=sem dados

#### Pesos do corpo e dos órgãos

[00594] Os pesos corporais foram obtidos uma vez por semana em todo o regime de dosagem. As medições de cada grupo são

fornechas na tabela 122 expressos em gramas. Os resultado indicam que o tratamento com os oligonucleotídeos anti-sentido não causou nenhuma mudança adversa na saúde dos animais, o que pode ter resultado em uma alteração significativa nos pesos comparados ao controle com PBS. Os pesos dos órgãos foram obtidos após os animais serem eutanizados e fígados, rins e baços serem coletados e pesados. Os resultados são apresentados na tabela 123 e também não mostram nenhuma alteração significativa nos pesos comparados ao controle com PBS, exceto com relação a ISIS 416858, que mostra aumento no peso do baço. O oligonucleotídeo ISIS, ISIS 416850, fornecido com o regime de dose crônica é distinguido dos outros oligonucleotídeos com um asterisco (\*).

### **Tabela 122**

[00595] Medições semanais dos pesos corporais (g) de macacos cinomolgos

dia	PBS	ISIS 416838	ISIS 416850	ISIS 416858	ISIS 416864	ISIS 417002	ISIS 416850*
1	2780	2720	2572	2912	2890	2640	2665
8	2615	2592	2430	2740	2784	2523	2579
15	2678	2642	2474	2760	2817	2571	2607
22	2715	2702	2514	2800	2857	2617	2661
29	2717	2689	2515	2763	2863	2622	2667
36	2738	2708	2545	2584	3327	2631	2656
43	2742	2700	2544	2607	3355	2630	2670
50	2764	2731	2613	2646	3408	2652	2679
57	2763	2737	2629	2617	3387	2654	n.d.
64	2781	2746	2642	2618	3384	2598	n.d.
71	2945	2869	2769	2865	2942	2727	n.d.
78	2815	2766	2660	2713	2822	2570	n.d.

n.d.=sem dados

**Tabela 123**

[00596] Os pesos dos órgãos (g) de macacos cinomolgos após o tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido

	Fígado	Baço	Rim
PBS	46	4	11
ISIS 416838	63	5	12
ISIS 416580	64	4	16
ISIS 416858	60	12	13
ISIS 416864	53	5	14
ISIS 417002	51	5	15

**Função hepática**

[00597] Para avaliar o impacto de oligonucleotídeos ISIS na função hepática, concentrações plasmáticas de transaminases foram medidas usando um analisador químico clínico automatizado (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Concentrações plasmáticas de ALT (alanina transaminase) e AST (aspartato transaminase) foram medidas e os resultados são apresentados nas tabelas 124 e 125 expressos em IU/L. Os oligonucleotídeos anti-sentido que não afetaram um aumento nos níveis de ALT/AST sete vezes abaixo dos níveis controle foram selecionados para estudos adicionais. Os níveis plasmáticos de bilirrubina também foram medidos e os resultados são apresentados na tabela 126 expressos em mg/dL. Os oligonucleotídeos anti-sentido que não afetaram um aumento nos níveis de bilirrubina mais de duas vezes dos níveis controle por tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido foram selecionados para estudos adicionais. O oligonucleotídeo ISIS, ISIS 416850, fornecido com o regime de dose crônica é distinguido dos outros oligonucleotídeos com um asterisco (\*).

**Tabela 124**

[00598] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido em ALT (IU/L) no fígado de macacos cinomolgos

Dias antes/após tratamento	PBS	ISIS 416838	ISIS 416850	ISIS 416858	ISIS 416864	ISIS 417002	ISIS 416850 *
-14	57	76	54	47	54	61	80
22	39	36	41	28	37	36	42
43	36	35	43	36	36	35	41
64	38	40	60	47	43	42	n.d.
85	34	41	75	50	43	116	n.d.

n.d.=sem dados

**Tabela 125**

[00599] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido em AST (IU/L) no fígado de macacos cinomolgos

Dias antes/após tratamento	PBS	ISIS 416838	ISIS 416850	ISIS 416858	ISIS 416864	ISIS 417002	ISIS 416850*
-14	71	139	81	58	76	114	100
22	43	39	45	38	41	44	39
43	38	32	50	39	40	42	40
64	35	33	56	50	46	37	n.d.
85	41	30	82.	49	56	50	n.d.

n.d.=sem dados

**Tabela 126**

[00600] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido em bilirrubina (mg/dL) no fígado de macacos cinomolgos

Dias antes/após tratamento	PBS	ISIS 416838	ISIS 416850	ISIS 416858	ISIS 416864	ISIS 417002	ISIS 416850*
-14	0,24	0,26	0,21	0,27	0,31	0,26	0,28
22	0,16	0,17	0,13	0,18	0,22	0,20	0,19
43	0,17	0,17	0,13	0,14	0,17	0,21	0,18
64	0,19	0,15	0,14	0,12	0,16	0,14	n.d.
85	0,20	0,13	0,14	0,14	0,17	0,12	n.d.

n.d.=sem dados

**Função renal**

[00601] Para avaliar o impacto de oligonucleotídeos ISIS na função

renal, amostras de urina foram coletadas. A razão de proteinúria para creatinina em amostras de urina após o tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido foi calculada e é apresentada na tabela 127. Os oligonucleotídeos anti-sentido que não afetaram mais de cinco vezes um aumento nas razões proteinúria/creatinina comparados ao controle com PBS foram selecionados para estudos adicionais.

**Tabela 127**

[00602] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido na razão de proteinúria para creatinina em macacos cinomolgos

	Dia 80	Dia 84
PBS	0,09	0,10
ISIS 416838	0,13	0,13
ISIS 416850	0,09	0,12
ISIS 416858	0,10	0,07
ISIS 416864	0,36	0,34
ISIS 417002	0,18	0,24

**Medição da concentração do oligonucleotídeo**

[00603] A concentração do oligonucleotídeo de comprimento total, bem como o tempo gasto para degradação e eliminação do oligonucleotídeo do fígado e rim foram avaliados. O método usado é uma modificação de métodos publicados previamente (Leeds et al., 1996; Geary et al., 1999) que consistem em uma extração com fenol-clorofórmio (líquido-líquido) seguida por uma extração de fase sólida. Um padrão interno (ISIS 355868, um oligonucleotídeo fosforotioato modificado por 2'-O-metoxietila 27-mer, GCGTTTGCTCTTCTTCTTGCGTTTTTTT, aqui designado como SEQ ID NO: 270) foi adicionado antes da extração. As concentrações de amostra de tecido foram calculadas usando curvas de calibração, com um limite menor de quantificação (LLOQ) de aproximadamente 1,14 µg/g. As meias vidas foram então calculadas usando o software WinNonlin (PHARSIGHT). Os resultados são apresentados nas tabelas 128 e 129, expressos como µg/g de tecido de fígado ou rim.

**Tabela 128**

[00604] Concentração do oligonucleotídeo de comprimento total (µg/g) no fígado e rim de macacos cinomolgos

No ISIS.	Rim	Fígado
416838	1339	1087
416850	2845	1225
416858	1772	1061
416864	2093	1275
417002	2162	1248

**Tabela 129**

[00605] Concentração do oligonucleotídeo total (µg/g) no fígado e rim de macacos cinomolgos

No ISIS.	Rim	Fígado
416838	1980	1544
416850	3988	1558
416858	2483	1504
416864	3522	1967
417002	3462	1757

### Ensaio de hematologia

[00606] O sangue obtido de todos os grupos de macaco foi enviado para Korea Institute of Toxicology (KIT) para análise de HCT, MCV, MCH e MCHC, bem como medições das várias células de sangue, tais como WBC (neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos, basófilos, reticulócitos), RBC, plaquetas e teor total de hemoglobina. Os resultados são apresentados nas tabelas 130-143. Os oligonucleotídeos anti-sentido que não afetaram uma diminuição na contagem de plaquetas em mais de 50 % e um aumento na contagem de monócito em mais de três vezes foram selecionados para estudos adicionais. O oligonucleotídeo ISIS, ISIS 416850, fornecido com o regime de dose crônica é distinguido dos outros oligonucleotídeos com um asterisco (\*).

**Tabela 130**

[00607] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido na contagem de WBC ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) em macacos cinomolgos

	PBS	ISIS 416838	ISIS 416850	ISIS 416858	ISIS 416864	ISIS 417002	ISIS 416850*
dia -14	14	12	13	14	13	13	15
dia -5	13	12	13	14	13	14	15
dia 8	10	10	10	12	11	10	13
dia 15	10	10	9	11	10	10	16
dia 22	12	11	10	11	10	10	15
dia 29	11	11	11	12	10	10	14
dia 36	10	10	10	12	10	11	16
dia 43	10	10	9	11	10	10	15
dia 50	12	11	11	13	12	13	15
dia 57	11	12	11	13	12	12	n.d.
dia 64	11	13	11	12	11	11	n.d.
dia 71	15	15	15	13	14	12	n.d.
dia 78	10	11	12	11	11	9	n.d.
dia 85	10	12	15	11	12	10	n.d.

n.d.=sem dados

### Tabela 131

[00608] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido na contagem de RBC ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ ) em macacos cinomolgos

	PBS	ISIS 416838	ISIS 416850	ISIS 416858	ISIS 416864	ISIS 417002	ISIS 416850*
dia -14	5,7	5,6	5,3	5,6	5,5	5,6	5,5
dia -5	5,7	5,6	5,5	5,6	5,6	5,6	5,5
dia 8	5,7	5,7	5,4	5,6	5,7	5,6	5,5
dia 15	5,6	5,6	5,3	5,4	5,7	5,4	5,3
dia 22	5,5	5,4	5	5,3	5,3	5,2	5,1
dia 29	5,6	5,3	4,9	5,3	5,3	5,2	5,2
dia 36	5,7	5,5	5,3	5,5	5,6	5,4	5,3
dia 43	5,7	5,6	5,2	5,5	5,5	5,4	5,2
dia 50	5,8	5,5	5,2	5,5	5,6	5,4	5,3
dia 57	5,7	5,5	5,2	5,6	5,5	4,9	n.d.
dia 64	5,8	5,6	5,4	5,7	5,6	5,4	n.d.
dia 71	5,6	5,5	5,4	5,6	5,6	5,5	n.d.
dia 78	5,6	5,4	5,3	5,4	5,3	5,4	n.d.
dia 85	5,6	5,5	5,5	5,5	5,4	5,4	n.d.

n.d.=sem dados

### Tabela 132

[00609] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido em hemoglobina (g/dL) em macacos cinomolgos



	PBS	ISIS 416838	ISIS 416850	ISIS 416858	ISIS 416864	ISIS 417002	ISIS 416850*
dia -14	13,2	12,9	12,4	13,2	12,7	13,0	12,8
dia -5	13,1	13,1	12,7	13,2	13,0	13,2	12,8
dia 8	13,1	12,9	12,4	12,8	12,7	12,8	12,5
dia 15	12,9	12,9	12,1	12,6	12,8	12,3	12,2
dia 22	12,7	12,5	11,6	12,4	12,1	12,1	11,7
dia 29	12,8	12,4	11,5	12,3	12,1	12,0	12,0
dia 36	13,0	12,8	12,2	12,6	12,5	12,5	12,3
dia 43	12,9	12,7	11,8	12,4	12,2	12,3	11,8
dia 50	12,6	12,3	11,8	12,2	12,1	12,3	11,9
dia 57	13,1	12,6	12,1	12,7	12,3	11,3	n.d.
dia 64	13,1	12,6	12,3	12,8	12,1	12,2	n.d.
dia 71	12,9	12,7	12,3	12,7	12,2	12,5	n.d.
dia 78	13,0	12,5	12,2	12,4	11,9	12,4	n.d.
dia 85	13,2	12,4	12,7	11,9	12,3	12,2	n.d.

n.d.=sem dados

**Tabela 133**

[00610] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido em hematócrito (%) em macacos cinomolgos

	PBS	ISIS 416838	ISIS 416850	ISIS 416858	ISIS 416864	ISIS 417002	ISIS 416850*
dia -14	46	42	41	43	43	44	44
dia -5	44	42	43	42	44	45	43
dia 8	44	43	43	43	44	44	43
dia 15	44	42	40	40	42	40	40
dia 22	45	43	41	41	42	41	40
dia 29	46	43	41	41	43	42	42
dia 36	46	43	42	40	42	42	41
dia 43	46	43	40	40	42	41	40
dia 50	48	44	42	41	44	43	42
dia 57	46	43	42	41	42	38	n.d.
dia 64	47	44	43	42	42	41	n.d.
dia 71	46	44	43	42	44	43	n.d.
dia 78	43	41	41	39	39	40	n.d.
dia 85	43	42	42	39	40	41	n.d.

n.d.=sem dados

**Tabela 134**

[00611] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido em MCV (fL) em macacos cinomolgos

	PBS	ISIS 416838	ISIS 416850	ISIS 416858	ISIS 416864	ISIS 417002	ISIS 416850*
dia -14	81	77	78	77	79	79	81
dia -5	78	76	77	75	79	80	78
dia 8	77	77	80	77	78	79	79
dia 15	78	75	76	74	74	76	75
dia 22	84	80	83	77	79	79	79
dia 29	83	81	83	78	80	81	82
dia 36	81	78	80	75	76	78	76
dia 43	80	78	79	74	77	77	77
dia 50	84	80	83	76	79	80	80
dia 57	82	79	80	74	77	80	n.d.
dia 64	81	79	79	73	75	76	n.d.
dia 71	84	80	80	75	79	78	n.d.
dia 78	78	76	79	72	74	75	n.d.
dia 85	77	77	77	72	74	76	n.d.

n.d.=sem dados

**Tabela 135**

[00612] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido em MCH (pg) em macacos cinomolgos

	PBS	ISIS 416838	ISIS 416850	ISIS 416858	ISIS 416864	ISIS 417002	ISIS 416850*
dia -14	23	23	23	24	23	24	24
dia -5	23	23	23	23	23	24	23
dia 8	23	23	23	23	23	23	23
dia 15	23	23	23	23	23	23	23
dia 22	23	23	24	24	23	23	23
dia 29	23	23	23	23	23	23	23
dia 36	23	23	23	23	23	23	23
dia 43	23	23	23	23	22	23	23
dia 50	22	23	23	23	22	23	23
dia 57	23	23	23	22	23	23	n.d.
Dia 64	23	23	22	22	23	22	n.d.
Dia 71	23	23	23	22	23	23	n.d.
Dia 78	23	23	23	23	23	23	n.d.
Dia 85	23	23	22	22	23	23	n.d.

n.d.=sem dados

**Tabela 136**

[00613] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido em MCHC (g/dL) em macacos cinomolgos

	PBS	ISIS 416838	ISIS 416850	ISIS 416858	ISIS 416864	ISIS 417002	ISIS 416850*
dia -14	29	30	30	31	29	30	29
dia -5	30	31	30	31	29	30	30
dia 8	30	30	29	30	29	29	29
dia 15	30	31	30	31	30	31	30
dia 22	28	29	28	30	29	29	29
dia 29	28	29	28	30	29	29	28
dia 36	28	30	29	31	30	30	30
dia 43	28	30	29	31	29	30	30
dia 50	26	28	28	30	28	29	29
dia 57	29	29	29	31	29	29	n.d.
dia 64	28	29	29	30	29	30	n.d.
dia 71	28	29	28	30	28	29	n.d.
dia 78	30	30	29	32	30	31	n.d.
dia 85	31	30	30	31	30	30	n.d.

n.d.=sem dados

**Tabela 137**

[00614] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido em contagem de plaquetas ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) em macacos cinomolgos

	PBS	ISIS 416838	ISIS 416850	ISIS 416858	ISIS 416864	ISIS 417002	ISIS 416850*
dia -14	349	377	528	419	434	442	387
dia -5	405	425	573	463	456	466	434
dia 8	365	387	548	391	438	435	401
dia 15	375	387	559	400	439	410	396
dia 22	294	319	466	316	364	377	347
dia 29	311	337	475	336	397	410	370
dia 36	326	370	505	371	428	415	379
dia 43	336	365	490	342	351	393	391
dia 50	379	372	487	331	419	389	351
dia 57	345	371	528	333	409	403	n.d.
dia 64	329	358	496	295	383	436	n.d.
dia 71	322	365	465	286	394	490	n.d.
dia 78	309	348	449	262	366	432	n.d.
dia 85	356	344	458	267	387	418	n.d.

n.d.=sem dados

**Tabela 138**

[00615] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido em reticulócitos (%) em macacos cinomolgos

	PBS	ISIS 416838	ISIS 416850	ISIS 416858	ISIS 416864	ISIS 417002	ISIS 416850*
dia -14	1,4	1,0	1,7	1,0	0,9	0,9	1,1
dia -5	1,0	0,9	1,2	0,9	0,9	0,8	0,8
dia 8	1,0	1,2	1,2	1,2	0,8	1,1	1,1
dia 15	1,5	1,2	1,9	1,6	0,8	1,1	1,0
dia 22	1,2	1,2	1,9	1,3	0,9	1,2	1,0
dia 29	1,6	1,6	2,5	1,5	1,3	1,6	1,4
dia 36	1,7	1,6	2,2	1,6	1,3	1,3	1,3
dia 43	1,3	1,2	1,6	1,3	1,1	1,1	1,0
dia 50	1,6	1,6	2,7	1,5	1,3	1,6	1,2
dia 57	1,8	1,5	2,0	1,4	1,0	4,6	n.d.
dia 64	1,3	1,3	1,7	1,0	0,8	1,3	n.d.
dia 71	1,6	1,3	1,8	1,3	1,0	1,3	n.d.
dia 78	1,5	1,4	1,8	1,2	1,2	1,3	n.d.
dia 85	1,5	1,5	2,3	1,3	1,5	1,4	n.d.

n.d.=sem dados

**Tabela 139**

[00616] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido em neutrófilos (%) em macacos cinomolgos

	PBS	ISIS 416838	ISIS 416850	ISIS 416858	ISIS 416864	ISIS 417002	ISIS 416850*
dia -14	40	36	49	37	53	43	48
dia -5	37	35	52	46	51	43	53
dia 8	54	42	57	51	52	46	53
dia 15	49	43	58	54	59	57	73
dia 22	41	37	57	47	59	55	64
dia 29	44	36	53	43	44	45	42
dia 36	37	39	57	47	58	61	72
dia 43	40	30	50	45	57	57	61
dia 50	36	31	45	46	49	61	62
dia 57	41	32	49	44	57	54	n.d.
dia 64	40	30	41	37	49	55	n.d.
dia 71	38	28	27	26	42	34	n.d.
dia 78	42	35	42	39	48	51	n.d.
dia 85	30	22	60	40	39	36	n.d.

n.d.=sem dados

**Tabela 140**

[00617] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido em linfócitos (%) em macacos cinomolgos

	PBS	ISIS 416838	ISIS 416850	ISIS 416858	ISIS 416864	ISIS 417002	ISIS 416850*
dia -14	54	59	47	58	42	53	47
dia -5	56	59	43	49	44	53	43
dia 8	43	54	39	45	45	50	44
dia 15	47	53	38	43	38	40	24
dia 22	54	59	39	49	37	41	33
dia 29	51	59	43	51	51	50	53
dia 36	58	57	39	49	38	35	26
dia 43	55	65	45	51	39	39	36
dia 50	59	64	49	48	46	34	35
dia 57	55	63	45	51	39	40	n.d.
dia 64	56	64	53	56	46	39	n.d.
dia 71	56	65	61	66	52	59	n.d.
dia 78	53	60	51	54	46	41	n.d.
dia 85	63	72	34	52	54	56	n.d.

n.d.=sem dados

**Tabela 141**

[00618] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido em eosinófilos (%) em macacos cinomolgos

	PBS	ISIS 416838	ISIS 416850	ISIS 416858	ISIS 416864	ISIS 417002	ISIS 416850*
dia -14	1,3	0,6	1,0	0,7	1,0	0,3	0,5
dia -5	1,5	0,6	1,6	1,3	0,9	0,3	0,7
dia 8	0,9	0,4	1,1	0,3	0,7	0,2	0,5
dia 15	0,7	0,3	1,0	0,3	0,5	0,1	0,2
dia 22	0,9	0,5	0,7	0,6	0,9	0,3	0,5
dia 29	0,9	0,3	1,2	0,6	0,9	0,3	0,8
dia 36	0,9	0,5	1,7	0,4	0,6	0,2	0,4
dia 43	0,9	0,6	1,2	0,3	0,6	0,2	0,4
dia 50	1,2	0,8	1,2	0,4	0,7	0,1	0,3
dia 57	0,7	0,6	1,0	0,3	0,4	0,2	n.d.
dia 64	1,0	0,7	1,3	0,4	0,7	0,2	n.d.
dia 71	1,6	0,8	1,8	0,9	1,1	0,3	n.d.
dia 78	1,0	0,9	1,0	0,5	1,2	0,1	n.d.
dia 85	1,3	1,5	1,2	0,6	1,6	0,2	n.d.

n.d.=sem dados

**Tabela 142**

[00619] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido em monócitos (%) em macacos cinomolgos

	PBS	ISIS 416838	ISIS 416850	ISIS 416858	ISIS 416864	ISIS 417002	ISIS 416850*
dia -14	3,3	3,1	2,3	2,8	2,8	3,0	2,9
dia -5	3,8	3,6	2,8	2,8	3,3	3,2	2,4
dia 8	2,3	2,5	1,8	2,7	2,1	3,3	1,8
dia 15	2,7	2,4	2,0	2,2	2,4	2,3	1,5
dia 22	3,4	2,9	2,4	2,8	2,8	3,1	1,9
dia 29	3,3	3,2	2,7	3,8	3,4	3,5	2,7
dia 36	3,1	2,5	2,1	2,9	2,3	2,6	1,5
dia 43	3,5	3,3	2,6	3,1	2,1	2,8	1,8
dia 50	2,6	3,2	3,7	4,6	2,9	3,1	1,8
dia 57	2,6	3,2	n.d.3,2	3,8	2,4	3,6	n.d.
dia 64	2,6	3,5	n.d.3,5	4,4	2,8	4,0	n.d.
dia 71	3,4	4,3	n.d.4,7	4,9	3,7	4,7	n.d.
dia 78	3,3	3,6	n.d.4,5	4,9	3,7	4,7	n.d.
dia 85	4,4	3,7	n.d.3,5	6,1	3,7	5,3	n.d.

n.d.=sem dados

**Tabela 143**

[00620] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido em basófilos (%) em macacos cinomolgos

	PBS	ISIS 416838	ISIS 416850	ISIS 416858	ISIS 416864	ISIS 417002	ISIS 416850*
dia -14	0,3	0,2	0,2	0,3	0,2	0,3	0,2
dia -5	0,3	0,3	0,2	0,3	0,2	0,3	0,3
dia 8	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2	0,3	0,3
dia 15	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
dia 22	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1
dia 29	0,3	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2	0,3
dia 36	0,3	0,4	0,3	0,3	0,3	0,2	0,1
dia 43	0,3	0,4	0,3	0,3	0,4	0,3	0,2
dia 50	0,4	0,3	0,3	0,4	0,4	0,3	0,2
dia 57	0,2	0,3	0,4	0,2	0,3	0,3	n.d.
dia 64	0,3	0,4	0,4	0,4	0,4	0,2	n.d.
dia 71	0,2	0,5	0,3	0,4	0,4	0,3	n.d.
dia 78	0,2	0,4	0,3	0,4	0,3	0,3	n.d.
dia 85	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	0,3	n.d.

n.d.=sem dados

**Ensaios de citocina e quimiocina**

[00621] Amostras de sangue obtidas dos grupos de macaco tratados com PBS, ISIS 416850 e ISIS 416858 administrados no regime de dose em escala, foram enviadas para Pierce Biotechnology (Woburn, MA) para medição dos níveis de quimiocina e citocina. Níveis de IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  foram medidos usando os respectivos anticorpos de primata e os níveis de IL-8, MIP-1 $\alpha$ , MCP-1, MIP-1 $\beta$  e RANTES foram medidos usando os respectivos anticorpos humanos de reação cruzada. As medições foram obtidas 14 dias antes do início do tratamento e no dia 85, quando o macacos foram eutanizados. Os resultados são apresentados nas tabelas 144 e 145.

**Tabela 144**

[00622] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido nos níveis de citocina/quimiocina (pg/mL) em macacos cinomolgos no dia - 14

	IL-1 $\beta$	IL-6	IFN- $\gamma$	TNF- $\alpha$	IL-8	MIP-1 $\alpha$	MCP-1	MIP-1 $\beta$	RANTES
PBS	16	10	114	7	816	54	1015	118	72423
ISIS 416850	3	30	126	14	1659	28	1384	137	75335
ISIS 416858	5	9	60	9	1552	36	1252	122	112253

**Tabela 145**

[00623] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido nos níveis de citocina/quimiocina (pg/mL) em macacos cinomolgos no dia 85

	IL-1 $\beta$	IL-6	IFN- $\gamma$	TNF- $\alpha$	IL-8	MIP-1 $\alpha$	MCP-1	MIP-1 $\beta$	RANTES
PBS	7	4	102	34	87	23	442	74	84430
ISIS 416850	13	17	18	27	172	41	2330	216	83981
ISIS 416858	5	25	18	45	303	41	1752	221	125511

**Exemplo 46: Efeito farmacológico de oligonucleotídeos anti-sentido que alvejam fator 11 humano em macacos cinomolgos**

[00624] Vários oligonucleotídeos anti-sentido escolhidos a partir de estudos de tolerabilidade de roedores (exemplos 41-44) foram testados em macacos cinomolgos para determinar seus efeitos

farmacológicos, eficiência relacionada na atividade do fator 11 e tolerabilidade em um modelo de macaco cinomolgo. Os oligonucleotídeos anti-sentido também foram comparados a ISIS 416850 e ISIS 416858, selecionados do estudo de macaco descrito anteriormente (exemplo 45). Todos os oligonucleotídeos ISIS usados neste estudo alvejam o RNAm do fator 11 humano e apresentam também reação totalmente cruzada com a sequência de gene do macaco reso (ver tabelas 44 e 46). Espera-se que os oligonucleotídeos ISIS de macacos reso apresentem reação completamente cruzada com a sequência de gene do macaco cinomolgo igualmente. Durante o período que o estudo foi submetido, a sequência genômica de macaco cinomolgo não estava disponível na base de dados National Center for Biotechnology Information (NCBI); portanto, a reatividade cruzada com a sequência de gene do macaco cinomolgo não pode ser confirmada.

### Tratamento

[00625] Os grupos, cada um consistindo em dois macacos machos e duas fêmeas, foram injetados subcutaneamente com 25 mg/kg de ISIS 416850, ISIS 449709, ISIS 445522, ISIS 449710, ISIS 449707, ISIS 449711, ISIS 449708, 416858 e ISIS 445531. O oligonucleotídeo anti-sentido foi administrado aos macacos em 25 mg/kg três vezes por semana durante a semana 1 e 25 mg/kg duas vezes por semana durante as semanas 2 a 8. Um grupo controle, que consiste em dois macacos machos e duas fêmeas, foi injetado subcutaneamente com PBS de acordo com o mesmo regime de dosagem. Os pesos corporais foram obtidos 14 dias e 7 dias antes do início do tratamento e foram então medidos semanalmente em todo o período de tratamento. As amostras de sangue foram coletadas 14 dias e 5 dias antes do início do tratamento e, subsequentemente, várias vezes durante o regime de dosagem para as medições de PT e aPTT, e medição de vários



fatores hematológicos. No dia 55, os macacos foram eutanizados por sangria, mesmo em anestesia profunda, e os órgãos foram coletados para análise adicional.

#### Análise de RNA

[00626] No dia 55, o RNA foi extraído do tecido hepático para análise por PCR em tempo real do fator 11 usando conjunto de sonda de oligonucleotídeo iniciador LTS00301. Os resultados são apresentados como inibição percentual do fator 11, com relação ao controle com PBS. Da maneira mostrada na tabela 146, o tratamento com ISIS 416850, ISIS 449709, ISIS 445522, ISIS 449710, ISIS 449707, ISIS 449708, ISIS 416858 e ISIS 445531 resultou na redução significativa de RNAm do fator 11 em comparação ao controle com PBS.

#### **Tabela 146**

[00627] Inibição de RNAm do fator 11 no fígado de macaco cinomolgo com relação ao controle com PBS

Oligo ID	% de inibição
416850	68
449709	69
445522	89
449710	52
449707	47
449711	0
449708	46
416858	89
445531	66

#### Análise protéica

[00628] As amostras de plasma de todos os grupos de macaco obtidas nos diferentes dias foram analisadas por um ensaio ELISA do estilo sanduíche (Affinity Biologicals Inc.) usando um anticorpo anti-fator 11 policlonal purificado por afinidade como o anticorpo de captura e um anticorpo anti-fator 11 policlonal purificado por peroxidase como o anticorpo de detecção. O plasma de macaco foi diluído 1:50 para o

ensaio. A atividade da peroxidase foi expressa por incubação com o substrato o-fenilenodiamina. A cor produzida foi quantificada usando um leitor de microplaca a 490 nm e foi considerada ser proporcional à concentração de fator 11 nas amostras.

[00629] Os resultados são apresentados na tabela 147, expressos como redução percentual com relação àquela do controle com PBS. O tratamento com ISIS 416850, ISIS 449709, ISIS 445522 e ISIS 416858 resultou em uma diminuição dependente do tempo nos níveis de proteína.

#### **Tabela 147**

[00630] Inibição de proteína do fator 11 no fígado de macaco cinomolgo com relação ao controle com PBS

No ISIS.	Dia -14	Dia -5	Dia 10	Dia 17	Dia 24	Dia 31	Dia 38	Dia 45	Dia 52	Dia 55
416850	0	0	20	31	38	52	51	53	53	58
449709	1	0	27	35	44	45	46	48	47	50
445522	2	0	36	50	61	70	73	77	80	82
449710	1	0	10	14	17	25	20	23	4	24
449707	0	0	16	19	21	29	28	35	29	32
449711	0	1	5	3	6	9	2	4	3	5
449708	1	0	7	15	3	14	9	2	6	6
416858	4	0	36	49	62	68	74	79	81	81
445531	0	1	9	22	23	27	29	32	32	37

#### **Ensaio de PT e aPTT**

[00631] PT e aPTT foram medidos usando plasma pobre em plaquetas (PPP) de camundongos tratados com oligonucleotídeos ISIS. Os valores de PT e aPTT são fornecidos nas tabelas 148 e 149 e são relatados como os valores da razão normalizada internacional (INR). Os valores de INR para PT e aPTT foram determinados dividindo o valor PT ou aPTT para cada grupo experimental pelo PT ou aPTT para o grupo tratado com PBS. Esta razão foi então originada com relação à energia do índice de sensibilidade internacional (ISI) do fator do tecido usado. Da maneira mostrada na tabela 148, PT não se prolongou significativamente em camundongos tratados com

oligonucleotídeos ISIS. Entretanto, aPTT foi significativamente prolongado em grupos tratados com ISIS 416850, ISIS 445522 e ISIS 416858, da maneira apresentada na tabela 149. Estes dados sugerem que a redução anti-sentido de fator 11 afeta a via de ativação de contato, mas não a via extrínseca de coagulação do sangue. Portanto, redução anti-sentido de fator 11 com estes oligonucleotídeos ISIS é usada para inibir a formação de um trombo ou coágulo em resposta à uma parede de vaso anormal, mas não em resposta à lesão tecidual.

**Tabela 148**

[00632] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido na razão de PT em macacos cinomolgos

	Dia - 14	Dia -5	Dia 10	Dia 17	Dia 24	Dia 31	Dia 38	Dia 45	Dia 52	Dia 55
ISIS 416850	1,02	1,00	0,99	1,00	0,97	1,00	1,01	1,00	1,02	1,07
ISIS 449709	1,00	0,96	0,95	0,95	0,95	0,95	0,97	0,97	0,99	1,03
ISIS 445522	1,00	0,94	0,95	0,96	0,94	0,96	0,97	0,96	0,98	1,01
ISIS 449710	1,03	0,96	0,98	1,00	0,97	0,98	0,99	0,97	0,98	1,06
ISIS 449707	1,01	0,94	0,95	0,97	0,95	0,96	1,00	0,96	0,96	1,00
ISIS 449711	1,00	0,95	0,94	0,95	0,94	0,98	1,02	1,01	1,00	1,07
ISIS 449708	1,03	0,95	0,98	1,00	0,95	1,06	0,99	0,99	0,99	1,04
ISIS 416858	1,01	0,96	0,96	0,98	0,95	1,00	0,97	1,00	0,99	1,01
ISIS 445531	1,06	1,00	1,00	1,06	1,02	1,04	1,03	1,01	1,04	1,06

**Tabela 149**

[00633] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido na razão de aPTT em macacos cinomolgos

	Dia - 14	Dia -5	Dia 10	Dia 17	Dia 24	Dia 31	Dia 38	Dia 45	Dia 52	Dia 55
ISIS 416850	0,99	0,90	0,98	1,01	1,05	1,22	1,25	1,34	1,32	1,45
ISIS 449709	0,99	0,91	0,99	1,03	1,05	1,08	1,08	1,15	1,09	1,17
ISIS 445522	0,96	0,91	1,06	1,10	1,14	1,25	1,32	1,39	1,39	1,42
ISIS 449710	1,07	0,98	1,00	0,97	1,00	1,04	1,02	1,06	1,03	1,07
ISIS	0,90	0,87	0,92	0,94	0,93	0,95	0,99	1,00	0,99	1,04

449707										
ISIS 449711	0,94	0,96	0,92	0,90	0,92	0,89	0,93	0,94	0,92	0,96
ISIS 449708	1,07	1,01	1,06	1,05	1,01	1,09	1,06	1,06	1,08	1,11
ISIS 416858	1,03	0,96	1,07	1,13	1,21	1,32	1,41	1,49	1,53	1,61
ISIS 445531	1,00	0,89	0,95	1,05	1,00	1,07	1,06	1,13	1,15	1,19

**Pesos do corpo e dos órgãos**

[00634] Os pesos corporais de cada grupo são fornecidos na tabela 150, expressos em gramas. Os resultados indicam que o tratamento com os oligonucleotídeos anti-sentido não causou nenhuma mudança adversa na saúde dos animais, o que pode ter resultado em uma alteração significativa no peso comparado ao controle com PBS. Os pesos dos órgãos foram obtidos após os animais terem sido eutanizados no dia 55, e os fígados, rins e baços foram coletados. Os resultados são apresentados na tabela 150, expressos como um percentual do peso corporal e também não mostram nenhuma alteração significativa nos pesos comparados ao controle com PBS, com a exceção de ISIS 449711, que causou um aumento no peso do baço.

**Tabela 150**

[00635] Medições semanais dos pesos corporais (g) de macacos cinomolgos

Dias	PBS	ISIS 416850	ISIS 449709	ISIS 445522	ISIS 449710	ISIS 449707	ISIS 449711	ISIS 449708	ISIS 416858	ISIS 445531
-14	2069	2061	2044	2050	2097	2072	2049	2096	2073	2079
-7	2107	2074	2093	2042	2114	2083	2105	2163	2092	2092
1	2131	2083	2112	2047	2131	2107	2123	2130	2115	2125
8	2186	2072	2075	2094	2120	2088	2123	2148	2149	2119
15	2201	2147	2085	2092	2145	2120	2103	2125	2162	2109
22	2206	2139	2117	2114	2177	2142	2171	2110	2188	2143
29	2204	2159	2068	2125	2149	2155	2203	2095	2196	2148
36	2246	2136	2064	2121	2180	2158	2227	2100	2210	2191
43	2304	2186	2106	2142	2227	2197	2251	2125	2238	2233
50	2274	2143	2147	2127	2201	2185	2227	2076	2225	2197

**Tabela 151**

[00636] Os pesos dos órgãos (g) de macacos cinomolgos após o tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido

	Fígado	Baço	Rim
PBS	2,3	0,16	0,48
ISIS 416850	2,5	0,17	0,51
ISIS 449709	2,6	0,21	0,57
ISIS 445522	2,6	0,23	0,55
ISIS 449710	2,6	0,24	0,58
ISIS 449707	2,5	0,24	0,53
ISIS 449711	2,6	0,32	0,54
ISIS 449708	2,6	0,19	0,60
ISIS 416858	2,6	0,24	0,47
ISIS 445531	2,8	0,24	0,49

**Função hepática**

[00637] Para avaliar o impacto de oligonucleotídeos ISIS na função hepática, concentrações plasmáticas de ALT e AST foram medidas usando um analisador químico clínico automatizado (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Concentrações plasmáticas de alanina transaminase (ALT) e aspartato transaminase (AST) foram medidas e os resultados são apresentados nas tabelas 152 e 153, expressos em IU/L. Os níveis plasmáticos de bilirrubina também foram medidos e os resultados são apresentados na tabela 154, expressos em mg/dL. Da maneira observada nas tabelas 152-154, não existem aumentos significativos em nenhum dos marcadores metabólicos hepáticos após o tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido.

**Tabela 152**

[00638] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido em ALT (IU/L) no fígado de macacos cinomolgos

	Dia -14	Dia -5	Dia 31	Dia 55
PBS	57	55	53	57
ISIS 416850	48	42	45	55
ISIS 449709	73	77	65	102
ISIS 445522	43	45	40	60
ISIS 449710	37	42	37	45
ISIS 449707	54	56	52	63

ISIS 449711	49	137	48	54
ISIS 449708	48	54	44	46
ISIS 416858	43	66	46	58
ISIS 445531	84	73	57	73

**Tabela 153**

[00639] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido em AST (IU/L) no fígado de macacos cinomolgos

	Dia -14	Dia -5	Dia 31	Dia 55
PBS	65	45	44	47
ISIS 416850	62	45	46	57
ISIS 449709	62	51	45	71
ISIS 445522	62	47	46	79
ISIS 449710	52	38	37	64
ISIS 449707	64	53	50	52
ISIS 449711	58	78	47	47
ISIS 449708	74	53	56	50
ISIS 416858	64	100	60	69
ISIS 445531	78	46	47	49

**Tabela 154**

[00640] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido em bilirrubina (mg/dL) no fígado de macacos cinomolgos

	Dia -14	Dia -5	Dia 31	Dia 55
PBS	0,25	0,20	0,20	0,17
ISIS 416850	0,26	0,22	0,26	0,17
ISIS 449709	0,24	0,19	0,15	0,18
ISIS 445522	0,24	0,20	0,14	0,18
ISIS 449710	0,24	0,19	0,15	0,22
ISIS 449707	0,27	0,19	0,13	0,16
ISIS 449711	0,23	0,16	0,13	0,13
ISIS 449708	0,27	0,21	0,14	0,14
ISIS 416858	0,25	0,23	0,16	0,16
ISIS 445531	0,22	0,18	0,13	0,11

### Função renal

[00641] Para avaliar o impacto de oligonucleotídeos ISIS na função renal, as amostras de urina foram coletadas em dias diferentes. Os níveis de BUN foram medidos em diversos períodos de tempo usando um analisador químico clínico automatizado (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY) e os resultados são apresentados na tabela 155. A razão

de proteinúria para creatinina em amostras de urina após o tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido também foi calculada no dia 49 e os resultados são apresentados na tabela 156. Da maneira observada nas tabelas 155 e 156, não existem aumentos significativos em nenhum dos marcadores metabólicos renais após o tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido.

**Tabela 155**

[00642] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido nos níveis BUN (mg/dL) em macacos cinomolgos

	Dia -14	Dia -5	Dia 31	Dia 55
PBS	22	21	22	22
ISIS 416850	24	23	21	26
ISIS 449709	22	21	20	28
ISIS 445522	23	22	22	22
ISIS 449710	19	19	19	23
ISIS 449707	25	21	21	20
ISIS 449711	26	22	20	23
ISIS 449708	25	23	23	23
ISIS 416858	25	24	23	24
ISIS 445531	22	18	20	22

**Tabela 156**

[00643] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido na razão de proteinúria para creatinina em macacos cinomolgos

	Proteinúria/creatinina razão
PBS	0,02
ISIS 416850	0,08
ISIS 449709	0,05
ISIS 445522	0,01
ISIS 449710	0,00
ISIS 449707	0,03
ISIS 449711	0,01
ISIS 449708	0,00
ISIS 416858	0,05
ISIS 445531	0,08

**Ensaio de hematologia**

[00644] O sangue obtido de todos os grupos de macaco em diferentes dias foi enviado para Korea Institute of Toxicology (KIT) para

medições de HCT, MCV, MCH e MCHC, bem como medições das várias células de sangue, tais como WBC (neutrófilos e monócitos), RBC e plaquetas, bem como teor total de hemoglobina. Os resultados são apresentados nas tabelas 157-166.

**Tabela 157**

[00645] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido em HCT (%) em macacos cinomolgos

	Dia -14	Dia -5	Dia 17	Dia 31	Dia 45	Dia 55
PBS	40	42	43	43	41	40
ISIS 416850	41	44	42	42	42	40
ISIS 449709	41	42	43	42	41	40
ISIS 445522	42	42	41	43	41	39
ISIS 449710	41	44	43	44	43	41
ISIS 449707	40	43	42	43	43	42
ISIS 449711	41	41	42	39	39	38
ISIS 449708	41	44	44	43	44	42
ISIS 416858	41	44	43	43	41	39
ISIS 445531	41	42	43	41	41	41

**Tabela 158**

[00646] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido na contagem de plaquetas (x 100/ $\mu$ L) em macacos cinomolgos

	Dia -14	Dia -5	Dia 17	Dia 31	Dia 45	Dia 55
PBS	361	441	352	329	356	408
ISIS 416850	462	517	467	507	453	396
ISIS 449709	456	481	449	471	418	441
ISIS 445522	433	512	521	425	403	333
ISIS 449710	411	463	382	422	313	360
ISIS 449707	383	464	408	408	424	399
ISIS 449711	410	431	325	309	257	259
ISIS 449708	387	517	444	378	381	348
ISIS 416858	369	433	358	289	287	257
ISIS 445531	379	416	380	376	345	319

**Tabela 159**

[00647] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido em neutrófilos (%) em macacos cinomolgos

	Dia -14	Dia -5	Dia 17	Dia 31	Dia 45	Dia 55
PBS	81	84	75	75	91	118
ISIS 416850	88	109	95	100	85	108



ISIS 449709	73	101	89	81	77	115
ISIS 445522	61	84	81	66	69	125
ISIS 449710	93	86	80	94	97	132
ISIS 449707	85	106	80	89	89	98
ISIS 449711	64	71	52	58	45	70
ISIS 449708	73	84	61	57	61	75
ISIS 416858	65	84	54	54	61	73
ISIS 445531	60	80	85	116	93	91

**Tabela 160**

[00648] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido em monócitos (%) em macacos cinomolgos

	Dia -14	Dia -5	Dia 17	Dia 31	Dia 45	Dia 55
PBS	1,9	2,8	3,1	2,8	3,9	2,2
ISIS 416850	1,9	2,9	3,2	3,7	3,8	3,4
ISIS 449709	4,0	2,0	3,0	2,8	3,6	3,4
ISIS 445522	2,1	2,3	3,6	3,9	4,4	3,0
ISIS 449710	1,3	2,0	2,5	2,4	3,4	1,6
ISIS 449707	1,3	2,3	3,2	4,2	4,0	4,8
ISIS 449711	1,2	2,3	5,9	6,9	7,6	7,8
ISIS 449708	1,7	2,6	5,4	5,8	7,0	6,2
ISIS 416858	2,0	2,7	4,0	4,7	4,6	4,6
ISIS 445531	1,3	2,2	3,4	4,1	4,4	4,1

**Tabela 161**

[00649] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido no teor de hemoglobina (g/dL) em macacos cinomolgos

	Dia -14	Dia -5	Dia 17	Dia 31	Dia 45	Dia 55
PBS	12,3	12,5	12,9	12,7	12,4	12,1
ISIS 416850	13,0	13,5	13,3	13,1	13,1	12,7
ISIS 449709	12,8	12,8	13,2	13,1	12,6	12,5
ISIS 445522	13,3	12,7	12,7	12,9	12,6	12,0
ISIS 449710	13,0	13,2	13,4	13,1	13,0	12,7
ISIS 449707	12,7	12,8	12,7	12,7	12,9	12,6
ISIS 449711	12,7	12,7	12,5	11,8	11,5	11,3
ISIS 449708	13,0	13,2	13,5	13,0	13,3	13,0
ISIS 416858	12,8	13,0	13,0	12,8	12,3	12,0
ISIS 445531	12,6	12,6	12,7	12,3	12,0	12,1

**Tabela 162**

[00650] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido na contagem de WBC ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) em macacos cinomolgos

	Dia -14	Dia -5	Dia 17	Dia 31	Dia 45	Dia 55
PBS	10	10	11	12	11	12
ISIS 416850	12	13	11	12	12	10
ISIS 449709	11	10	11	11	11	10
ISIS 445522	10	9	11	13	10	11
ISIS 449710	11	11	12	12	11	15
ISIS 449707	13	11	12	11	12	8
ISIS 449711	13	12	10	9	9	7
ISIS 449708	14	10	11	11	10	10
ISIS 416858	10	11	10	9	8	9
ISIS 445531	20	15	17	17	20	15

**Tabela 163**

[00651] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido na contagem de RBC ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ ) em macacos cinomolgos

	Dia -14	Dia -5	Dia 17	Dia 31	Dia 45	Dia 55
PBS	5,6	5,6	5,8	5,8	5,6	5,5
ISIS 416850	5,5	5,7	5,6	5,6	5,7	5,6
ISIS 449709	5,8	5,8	5,9	5,9	5,7	5,7
ISIS 445522	5,9	5,6	5,6	5,8	5,7	5,4
ISIS 449710	5,6	5,8	5,8	5,8	5,7	5,6
ISIS 449707	5,7	5,8	5,7	5,7	5,9	5,8
ISIS 449711	5,6	5,7	5,6	5,4	5,4	5,3
ISIS 449708	5,7	5,9	5,9	5,8	6,0	5,8
ISIS 416858	5,5	5,5	5,6	5,6	5,5	5,3
ISIS 445531	5,7	5,7	5,8	5,6	5,5	5,6

**Tabela 164**

[00652] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido em MCV (fL) em macacos cinomolgos

	Dia -14	Dia -5	Dia 17	Dia 31	Dia 45	Dia 55
PBS	72	74	75	73	73	73
ISIS 416850	74	77	76	75	75	73
ISIS 449709	72	74	73	73	71	71
ISIS 445522	72	74	74	75	73	72
ISIS 449710	75	77	75	75	75	73
ISIS 449707	71	75	74	74	73	73
ISIS 449711	73	74	75	73	73	73
ISIS 449708	73	75	75	75	74	74

ISIS 416858	75	79	78	76	75	75
ISIS 445531	72	74	75	75	75	74

**Tabela 165**

[00653] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido em MCH (pg) em macacos cinomolgos

	Dia -14	Dia -5	Dia 17	Dia 31	Dia 45	Dia 55
PBS	22,1	22,4	22,3	22,1	22,0	22,0
ISIS 416850	23,7	23,7	23,7	23,3	22,7	22,9
ISIS 449709	22,4	22,3	22,5	22,2	21,0	22,0
ISIS 445522	22,6	22,5	22,8	22,4	22,4	22,2
ISIS 449710	23,0	22,8	23,1	22,6	21,8	22,7
ISIS 449707	22,2	22,2	22,1	22,1	22,6	21,9
ISIS 449711	22,6	22,7	22,2	22,1	21,7	21,3
ISIS 449708	22,9	22,7	22,9	22,7	22,2	22,5
ISIS 416858	23,2	23,5	23,1	23,0	22,2	22,8
ISIS 445531	22,2	22,2	22,1	22,0	21,6	21,7

**Tabela 166**

[00654] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido em MCHC (g/dL) em macacos cinomolgos

	Dia -14	Dia -5	Dia 17	Dia 31	Dia 45	Dia 55
PBS	30,8	30,0	30,1	29,9	30,3	30,2
ISIS 416850	32,0	30,7	31,3	31,0	31,0	30,9
ISIS 449709	31,4	30,3	30,7	30,7	31,1	31,2
ISIS 445522	31,4	30,4	30,9	30,0	30,7	31,0
ISIS 449710	31,2	29,7	30,7	30,1	30,4	31,1
ISIS 449707	31,4	29,8	30,0	29,8	29,8	30,0
ISIS 449711	31,0	30,7	29,9	29,8	29,6	29,5
ISIS 449708	31,4	30,2	30,7	29,9	30,6	31,8
ISIS 416858	31,1	29,8	29,9	31,0	30,3	30,4
ISIS 445531	30,9	30,0	29,5	29,7	29,0	29,6

#### Ensaio de citocina e quimiocina

[00655] As amostras de sangue obtidas de todos os grupos de macaco foram enviadas para Pierce Biotechnology (Woburn, MA) para medições dos níveis de quimiocina e citocina. Níveis de IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , e TNF- $\alpha$  foram medidos usando os respectivos anticorpos de primata e os níveis de IL-8, MIP-1 $\alpha$ , MCP-1, MIP-1 $\beta$  e RANTES foram medidos usando os respectivos anticorpos humanos de reação cruzada. As medições foram obtidas 14 dias antes do início do

tratamento e no dia 55, quando os macacos foram eutanizados. Os resultados são apresentados nas tabelas 167 e 168.

#### **Tabela 167**

[00656] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido nos níveis de citocina/quimiocina (pg/mL) em macacos cinomolgos no dia - 14

	IL-1 $\beta$	IL-6	IFN- $\gamma$	TNF- $\alpha$	IL-8	MIP-1 $\alpha$	MCP-1	MIP-1 $\beta$	RANTES
PBS	350	3	314	32	82	27	277	8	297
ISIS 416850	215	1	115	4	45	14	434	31	4560
ISIS 449409	137	1	37	9	34	13	290	14	2471
ISIS 445522	188	5	172	16	32	22	297	27	3477
ISIS 449710	271	7	1115	72	29	20	409	18	1215
ISIS 449707	115	1	34	6	106	16	294	13	3014
ISIS 449711	79	2	29	6	156	20	264	24	3687
ISIS 449708	35	1	27	12	184	11	361	19	11666
ISIS 416858	103	0	32	4	224	11	328	37	6521
ISIS 445531	101	2	68	9	83	25	317	22	7825

#### **Tabela 168**

[00657] Efeito do tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido nos níveis de citocina/quimiocina (pg/mL) em macacos cinomolgos no dia 55

	IL-1 $\beta$	IL-6	IFN- $\gamma$	TNF- $\alpha$	IL-8	MIP-1 $\alpha$	MCP-1	MIP-1 $\beta$	RANTES
PBS	453	3	232	191	68	21	237	34	775
ISIS 416850	106	1	19	16	620	17	887	50	27503
ISIS 449409	181	0	25	8	254	17	507	47	8958
ISIS 445522	341	2	83	18	100	22	592	63	16154
ISIS 449710	286	2	176	26	348	27	474	53	22656
ISIS 449707	97	1	24	16	48	12	264	49	1193
ISIS 449711	146	7	22	31	110	17	469	91	3029
ISIS 449708	131	0	18	17	85	23	409	128	4561
ISIS 416858	28	1	9	15	167	11	512	47	5925
ISIS 445531	155	1	15	16	293	12	339	84	5935

#### **Exemplo 47: Medição de viscosidade de oligonucleotídeos ISIS anti-sentido que alvejam o fator 11 humano**

[00658] A viscosidade de oligonucleotídeos anti-sentido que alvejam o fator 11 humano foi medida com o auxílio de oligonucleotídeos anti-sentido de seleção que apresentam uma

viscosidade maior que 40 cP, em uma concentração de 165-185 mg/mL.

[00659] Os oligonucleotídeos ISIS (32-35 mg) foram pesados em uma garrafa de vidro, 120 µL de água foram adicionados e o oligonucleotídeo anti-sentido foi dissolvido em solução aquecendo a garrafa a 50 °C. Parte (75 µL) da amostra pré-aquecida foi pipetada em um micro-viscômetro (Cambridge). A temperatura do micro-viscômetro foi ajustada a 25 °C e a viscosidade da amostra foi medida. Uma outra parte (20 µL) da amostra pré-aquecida foi pipetada em 10 mL de água para leitura em UV em 260 nM a 85 °C (instrumento Cary UV). Os resultados são apresentados na tabela 169.

**Tabela 169**

[00660] Viscosidade e concentração do oligonucleotídeos ISIS anti-sentido que alvejam fator 11 humano

No ISIS.	Viscosidade (cP)	Concentração (mg/mL)
412223	8	163
412224	98	186
412225	> 100	162
413481	23	144
413482	16.	172
416848	6	158
416850	67	152
416851	26	187
416852	29	169
416856	18	175
416858	10	166
416859	10	161
416860	> 100	154
416861	14	110
416863	9	165
416866	> 100	166
416867	8	168
445498	21	157
445504	20	139
445505	9	155
445509	> 100	167
445513	34	167

445522	63	173
445522	58	174
445530	25	177
445531	15	155
445531	20	179
449707	7	166
449708	9	188
449709	65	171
449710	7	186
449711	6	209
451541	10	168

## REIVINDICAÇÕES

1. Composto, caracterizado pelo fato de que compreende um oligonucleotídeo modificado de fita simples que consiste em 20 nucleosídeos ligados e tendo uma sequência de nucleobases compreendendo 20 nucleobases contíguas da SEQ ID NO: 223, e em que o oligonucleotídeo modificado compreende:

um segmento de intervalo que consiste em dez desoxinucleosídeos ligados;

um segmento em asa 5' consistindo em cinco nucleosídeos ligados;

um segmento em asa 3' consistindo em cinco nucleosídeos ligados;

em que o segmento de intervalo está posicionado imediatamente adjacente e entre o segmento em asa 5' e o segmento em asa 3', em que cada nucleosídeo de cada segmento em asa compreende um açúcar 2'-O-metoxietil, em que pelo menos uma ligação internucleosídica é uma ligação internucleosídica de fosforotioato, e em que cada citosina é uma 5-metilcitosina; e em que

o oligonucleotídeo modificado de fita simples é covalentemente ligado a um grupo conjugado.

2. Composto, caracterizado pelo fato de que compreende um oligonucleotídeo modificado de fita simples que consiste em 20 nucleosídeos ligados e tendo uma sequência de nucleobases compreendendo 20 nucleobases contíguas da SEQ ID NO: 223, e em que o oligonucleotídeo modificado compreende:

um segmento de intervalo que consiste em dez desoxinucleosídeos ligados;

um segmento em asa 5' consistindo em cinco nucleosídeos ligados;

um segmento em asa 3' consistindo em cinco nucleosídeos

ligados;

em que o segmento de intervalo está posicionado imediatamente adjacente e entre o segmento de asa 5' e o segmento de asa 3', em que cada nucleosídeo de cada segmento em asa compreende um açúcar 2'-O-metoxietil, em que cada ligação internucleosídica é uma ligação internucleosídica de fosforotioato, e em que cada citosina é uma 5-metilcitosina.

3. Composto, caracterizado pelo fato de que compreende um oligonucleotídeo modificado de fita simples que consiste em 20 nucleosídeos ligados e apresenta uma sequência de nucleobase compreendendo 20 nucleobases contíguas da SEQ ID NO: 217, e em que o oligonucleotídeo modificado compreende:

um segmento de intervalo que consiste em dez desoxinucleosídeos ligados;

um segmento em asa 5' consistindo em cinco nucleosídeos ligados;

um segmento em asa 3' consistindo em cinco nucleosídeos ligados;

em que o segmento de intervalo está posicionado imediatamente adjacente e entre o segmento em asa 5' e o segmento em asa 3', em que cada nucleosídeo de cada segmento em asa compreende um açúcar 2'-O-metoxietil, em que pelo menos uma ligação internucleotídica é uma ligação de internucleotídica de fosforotioato, e em que cada citosina é uma 5-metilcitosina.

4. Composto, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o oligonucleotídeo modificado de fita simples é covalentemente ligado a um grupo conjugado.

5. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que o oligonucleotídeo modificado de fita simples é um sal do oligonucleotídeo modificado de



fita simples.

6. Composto, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que o sal é um sal de sódio ou um sal de potássio.

7. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende um composto, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 6, e um diluente farmaceuticamente aceitável do mesmo,

em que o diluente farmaceuticamente aceitável é solução salina tamponada com fosfato (PBS).

8. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, ou composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado(a) pelo fato de que é para uso em terapia.

9. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, ou composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado(a) pelo fato de que é para uso no:

(i) tratamento de uma complicação tromboembólica, em que opcionalmente a complicação tromboembólica é selecionada dentre trombose venosa profunda, embolia pulmonar, enfarte do miocárdio e acidente vascular cerebral; ou

(ii) tratamento de um distúrbio de coagulação.

10. Uso do composto, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 6, com um membro do grupo selecionado dentre aspirina, clopidogrel, dipiridamol, heparina, lepirudina, ticlopidina, varfarina, apixaban, rivaroxabano e Lovenox, caracterizado pelo fato de que é para a preparação de um medicamento para o tratamento de uma complicação tromboembólica, em que a complicação tromboembólica é selecionada dentre trombose venosa profunda, embolia pulmonar, ou uma combinação dos mesmos, enfarte do miocárdio ou acidente vascular cerebral.