



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

(21) BR 112020009431-5 A2



(22) Data do Depósito: 30/11/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 13/10/2020

(54) Título: TRATAMENTO ANTISENSE DA SÍNDROME DE ANGELMAN

(51) Int. Cl.: C12N 15/11; A61K 48/00; C07H 21/04; C12N 15/00.

(30) Prioridade Unionista: 01/12/2017 US 62/593,431; 24/05/2018 US 62/676,034.

(71) Depositante(es): THE TEXAS A&M UNIVERSITY SYSTEM.

(72) Inventor(es): SCOTT VICTOR DINDOT.

(86) Pedido PCT: PCT US2018063416 de 30/11/2018

(87) Publicação PCT: WO 2019/109001 de 06/06/2019

(85) Data da Fase Nacional: 12/05/2020

(57) Resumo: São divulgados oligonucleotídeos antisense que são capazes de induzir a expressão da ubiquitina-proteína ligase E3A (UBE3A) a partir do alelo paterno em neurônios animais ou humanos. Os oligonucleotídeos têm como alvo o supressor do alelo paterno UBE3A por hibridação com o RNA não codificador longo do SNHG14 na terminação 5' de UBE3A-AS, que está a jusante do SNORD115-45 snoRNA. Também são divulgadas composições farmacêuticas e métodos para tratamento da Síndrome de Angelman.



TRATAMENTO ANTISENSE DA SÍNDROME DE ANGELMAN

REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS RELACIONADOS

[01] Este pedido reivindica benefício do Pedido Provisório dos EUA No. 62 / 593.431, depositado em 1 de dezembro de 2017, e Pedido de Série Nº 62 / 676.034, depositado em 24 de maio de 2018, que são aqui incorporados por referência em sua totalidade.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

[02] Este aplicativo contém uma listagem de sequência arquivada em formato eletrônico como um arquivo ASCII.txt intitulado "Listagem de sequências" criado em 30 de novembro de 2018. O conteúdo da listagem de sequências é incorporado aqui na íntegra.

ANTECEDENTES

[03] A síndrome de Angelman (EA) é um distúrbio do desenvolvimento neurológico que está associado a déficits cognitivos e motores graves, epilepsia, distúrbio do sono e uma disposição 'feliz' atípica. Indivíduos com EA são frequentemente diagnosticados aos 2-3 anos de idade e têm uma vida útil normal. Eles necessitam de assistência médica e assistência médica durante toda a vida. Atualmente, existem poucas opções de tratamento para indivíduos com EA, a maioria das quais envolve medicamentos antiepilepticos para tratar convulsões.

[04] A síndrome de Angelman é causada por mutações que afetam a expressão ou a função do gene da ubiquitina-proteína ligase E3A (*UBE3A*) herdado da mãe. Diferentemente da maioria dos genes, o *UBE3A* está sujeito à impressão genômica, que é um fenômeno raro e de ocorrência natural que desativa um alelo de um gene e deixa o outro ligado. Nos neurônios do sistema nervoso central (SNC), o alelo *UBE3A* paterno está desativado, enquanto em todos os outros tipos de células do corpo, os dois alelos do *UBE3A* estão ativos. Por esse motivo, a EA é sempre causada por mutações que afetam o alelo *UBE3A* herdado pela mãe.

[05] O alelo *UBE3A* paterno é desativado pelo transcrito antisense *UBE3A* (*UBE3A-AS*), que é um componente de um longo transcrito de RNA que expressa vários transcritos de codificação e não codificação de proteínas. O *UBE3A-AS* é expresso a partir do alelo paterno e apenas nos neurônios do SNC e é suficiente e necessário para desativar a expressão do alelo *UBE3A* paterno. Não está claro por que o *UBE3A* está impresso nos neurônios, mas cria uma oportunidade única de tratar indivíduos com EA, porque existe uma cópia funcional, embora inativa, do *UBE3A* no cromossomo paterno. Estudos realizados até o momento indicam que ativar o alelo *UBE3A* paterno é uma terapia viável para o tratamento da EA.

SUMÁRIO

[06] É divulgada aqui uma região na *terminação 5'* do *transcrito de UBE3A-AS* que é importante para sua estabilidade. Com base nestas descobertas, os oligonucleotídeos *antisense* (ASOs) que está concebida para combater esta região, a fim de terminar a transcrição de *UBE3A-AS* e expressão reativar do alelo paterno *UBE3A*. Esses ASOs direcionados para a *terminação 5'* de *UBE3A-AS* são capazes de interromper a transcrição de *UBE3A-AS* e tratar o alelo *UBE3A* paterno. *SNHG14* é um transcrito policistrônico que codifica vários RNAs diferentes, incluindo *UBE3A-AS*.

[07] Por conseguinte, aqui divulgados são ASOs contendo uma sequência nucleotídica contígua de 10 a 30 nucleotídeos (ou seja, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ou 30) de comprimento, com pelo menos 98% (ou seja, 98%, 99% ou 100%) de complementaridade para atingir exons entre a *terminação 3'* do *SNORD115* e a *terminação 5'* de *SNORD109B*, que é pensado para representar a *terminação 5'* do *UBE3A* transcrito *antisense* (*UBE3A-aS*). Em particular, os exons alvo podem estar na *terminação 5'* de *UBE3A-AS*, correspondendo à posição 25.511.577 a 25.516.681 no conjunto do genoma humano do cromossomo 15 humano hg19. Em algumas modalidades, o

ácido nucleico alvo é um dos cinco exons localizados na *terminação 5'* de *UBE3A-AS*, que pode corresponder às posições 25.511.577 a 25.511.761 (exon 1), 25.512.059 a 25.512.191 (exon 2), 25.513.476 a 25.513.600 (exon 3), 25.514.752 a 25.514.880 (exon 4) e 25.516.565 a 25.516.681 (exon 5). Portanto, o ácido nucleico alvo pode ser uma sequência contígua de ácido nucleico de 10 a 30 nucleotídeos dentro da SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 ou 5.

[08] Em algumas modalidades, a sequência alvo é um limite exônico que envolve os exons *UBE3A-AS* 1-5, *UBE3A-AS* exon 5 e *SNORD109B* exon 1 e / ou *SNORD109B* exons 1-2.

[09] Os métodos e estratégias para projetar ASOs são conhecidos na técnica. Em algumas modalidades, o ASO é projetado para direcionar sequências que são conservadas entre indivíduos humanos. Em algumas modalidades, o ASO é projetado para direcionar sequências que são conservadas entre sujeitos primatas.

[010] O oligonucleotídeo pode ser um oligonucleotídeo antisense (isto é, como será entendido por aqueles técnicos no assunto - antisense ao seu ácido nucleico alvo), por exemplo, com um *design* mais aberto. A divulgada oligonucleotídeo é capaz de induzir paterno *UBE3A* expressão de um neurônio por degradação, redução, ou a remoção do *UBE3A* -AS transcrição. Isso é feito visando a *terminação 5'* de *UBE3A-AS* em um site a montante do *SNORD109B* snoRNA. Exemplos de ASO projetados para atingir os exons 1-5 são fornecidos nas Tabelas 1, 2, 3, 4 ou 5. Por exemplo, em algumas modalidades, o ASO compreende a sequência de ácidos nucleicos SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9, 10 ou 11.

[011] Os ASOs divulgados também podem ter uma ou mais modificações para melhorar a estabilidade, solubilidade, atividade, distribuição celular e / ou captação celular. Por exemplo, o ASO divulgado pode conter um ou mais nucleosídeos modificados por açúcar e / ou ligações internucleosídeos modificadas. Por exemplo, em algumas modalidades, o oligonucleotídeo compreende uma ou mais ligações

internucleosídeo modificadas a partir do fosfodiéster natural para uma ligação que é, por exemplo, mais resistentes a ataque por nucleases. Em algumas modalidades, o ASO contém uma ou mais nucleobases modificadas que diferem das nucleobases que ocorrem naturalmente, mas são funcionais durante a hibridação de ácidos nucleicos.

[012] Em algumas modalidades, o ASO é um oligonucleotídeo de DNA. Em algumas modalidades, o ASO é um oligonucleotídeo de RNA. Ainda em outras modalidades, o ASO contém desoxinucleotídeos e ribonucleotídeos. Por exemplo, o ASO pode ser um oligonucleotídeo *gapmer*, *headmer* ou *tailmer*. Em algumas modalidades, o bloco central de um *gapmer* é flanqueado por blocos de ribonucleotídeos modificados que protegem o bloco interno da degradação da nuclease. Por exemplo, o ASO pode conter um trecho de 7, 8, 9, 10 ou mais monômeros de DNA naturais para ativar a clivagem RNase H do alvo RNA, juntamente com 3, 4 ou 5 monômeros de ribonucleotídeos modificados nos 3' - e 5' - para proteção contra exonucleases. Em alguns casos, os ribonucleídos modificados são 2' - O- Metil (OMe) nucleotídeos de RNA 2' -O-metoxietila (MOE) nucleotídeos -modificados, ou ácidos nucleicos 2' -trancados (LNAs). Exemplos de ASOs *gapmers* são fornecidos nas Tabelas 7, 11 e 17. Portanto, em algumas modalidades, o ASO divulgado possui uma sequência de ácido nucleico selecionada de SEQ ID NOs: 362 a 392.

[013] Também são reveladas composições farmacêuticas que compreendem um ou mais da ASO aqui divulgados e farmaceuticamente aceitáveis, diluentes, transportadores, sais e / ou adjuvantes.

[014] Também são divulgados métodos para indução *in vivo* ou *in vitro* da expressão de *UBE3A* em uma célula alvo em que a expressão de *UBE3A* paterna é suprimida, administrando um ou mais dos ASOs ou composição divulgados aqui divulgados em uma quantidade eficaz à referida célula.

[015] Também são divulgados métodos para o tratamento ou prevenção de uma doença, distúrbio ou disfunção associada à atividade *in vivo* de *UBE3A*, compreendendo a administração de uma quantidade terapeuticamente ou profilaticamente eficaz de um ou mais dos ASOs divulgados a um sujeito que sofre ou é suscetível à doença, distúrbio ou disfunção, como a síndrome de Angelman.

[016] Os detalhes de uma ou mais formas de realização da invenção são definidas nos desenhos que acompanham o presente pedido. Outras características, objetos e vantagens da invenção serão evidentes a partir da descrição e desenhos e das reivindicações. Por exemplo, aqueles versados na técnica, lendo a especificação apreciarão que a presente divulgação demonstra a utilidade de certas sequências, como aqui descritas, para impactar a expressão de *UBE3A* e, além disso, ensina a utilidade dos formatos de oligonucleotídeos que são ou são alvos (por exemplo, complementares a), essas sequências. Os técnicos no assunto apreciarão que a presente divulgação não se limita a nenhum mecanismo de ação específico - desde que os oligonucleotídeos possam ser úteis, independentemente de eles agirem através de um mecanismo antisense, por exemplo, envolvendo a atividade da RNase H e outros formatos terapêuticos (por exemplo,, siRNA, shRNA, nuclease gRNA, etc.) de oligonucleotídeos que são ou visam tais sequências também são fornecidos. Analogamente, aqueles versados na técnica apreciarão que a presente divulgação, definindo sequências úteis como aqui descritas, também descreve uma variedade de formatos para essas sequências (por exemplo, como parte de um vetor de ácido nucleico, como um vetor do qual elas podem ser expressos (por exemplo, *in vivo*, *in vitro* ou ambos, etc.). Assim, os especialistas na arte, lendo a presente divulgação, apreciarão que a referência a "ASOs" aqui é exemplar e ácidos nucleicos apropriados (por exemplo, oligonucleotídeos) podem ser utilizados independentemente do mecanismo de ação; os técnicos no assunto estão cientes da extensa literatura sobre formato e estrutura apropriados de ácidos nucleicos (por

exemplo, oligonucleotídeos) que operam por meio de uma variedade de mecanismos (por exemplo, siRNA, shRNA, gRNA da nuclease, etc). Em algumas modalidades, os ácidos nucleicos fornecidos incorporam formato e / ou características estruturais conhecidas na técnica como úteis em um ou mais contextos mecanicistas (por exemplo, envolvendo RNase H, RISC, um núcleo nucleado por ácido nucleico, facilidade como um Cas, etc.).

DESCRÍÇÃO DOS DESENHOS

[017] As figs. 1A a 1D ilustram a região impressa da síndrome de Prader-Willi / Angelman (PWS / AS) em humanos e camundongos. FIG. 1A mostra a anotação RefSeq da região impressa de PWS / AS humana. FIG. 1B mostra a anotação RefSeq da região ortóloga impressa em PWS / AS no mouse. FIG. 1 C mostra *UBE3A-AS* e *terminação 3'* de *UBE3A*. FIG. 1D mostra um alinhamento de c hair mostrando regiões ortólogas entre humano, macaco (macaco *Cynomolgus*), porco, elefante, rato e rato. A região alvo é conservada entre primatas não humanos, mas não roedores. FIG. 1D também mostra o gráfico da região com perfil de taxa evolutiva enômica (GERP). Valores positivos representam restrições evolutivas em bases específicas de DNA.

[018] As figs. 2A a 2E mostram uma análise de ASOs visando o *Ube3a-AS murino*. A fig. 2A é um esquema do transcrito de *Ube3a-AS* murino e localização aproximada de ASOs específicos do mouse. Caixas e linhas representam exons e introns, respectivamente. A seta representa a direção da transcrição. A fig. 2B é um esquema do alelo repórter *Ube3aYFP* é usado para medir os níveis de proteína paterna de *Ube3a*. O modelo de camundongo *Ube3aYFP* foi gerado direcionando a proteína fluorescente amarela (YFP) para a terminação 3' do locus *Ube3a* endógeno. A expressão de *Ube3a-AS* inibe a transcrição do alelo *Ube3aYFP* paterno e a perda de *Ube3a-AS* reativa a expressão paterna de *Ube3aYFP*, que pode ser detectada por imagem de imunofluorescência usando um

anticorpo anti-YFP. A fig. 2C é um esquema da linha do tempo experimental para examinar os ASOs nos neurônios primários do hipocampo do rato. Os neurônios hippocampais primários de camundongo foram gerados a partir de camundongos recém-nascidos com um alelo Ube3aYFP herdado paternamente (0 DIV) e tratados após 7 dias *in vitro* (7 DIV). Três dias após o tratamento (10 DIV), os níveis de proteína Ube3aYFP foram medidos em células individuais. A fig. 2D contém imagens imunofluorescentes mostrando a proteína Ube3aYFP paterna em neurônios primários tratados com veículo (veh), um controle negativo ASO (ASO-C), topotecano (Topo), ASO-B e ASO 1.1. A fig. 2E mostra significativa níveis de intensidade Ube3aYFP paternos em células neuronais individuais tratados com veículo (Veh, DMSO a 1%; n = 3), o controle de ASO (ASO-C, 15 μ M ; n = 3), topotecano (Topo, 0,3 μ M; n = 3), ASO-B (1, 5, 15 μ M ; n = 3), ASO-1.1 (1, 5, 15 μ M), ASO-1,2 (1, 5, 15 μ M) e ASO 3. 1 (1, 5, 15 μ M). Abreviações: YFP, proteína fluorescente amarela; Tx, tratamento; DIV, dias *in vitro* ; ns., não significativo. Barras de erro representam erro padrão da média.

[019]As figs. 3A a 3D mostram a análise de ASOs visando *UBE3A-AS* humano. FIG. 3A é uma exibição esquemática do *UBE3A-AS* humano e localização aproximada de ASOs específicos para humanos (ASOs 1-6). O ASO-7 está localizado no íntron do *UBE3A-AS*. Caixas e linhas representam exons e introns, respectivamente. FIG. 3B é um esquema da linha do tempo experimental para examinar ASOs em neurônios derivados de células-tronco pluripotentes induzidas por GABAérgicos (iPSC) de um indivíduo cariotipicamente normal. Neurônios humanos derivados de iPSC foram tratados após 14 DIV e depois processados para isolamento de RNA a 20 DIV. As figs. 3C e 3D mostram níveis relativos de RNA no estado estacionário (normalizados para ASO-C) de *UBE3A-AS* (FIG. 3C) e *UBE3A* (FIG. 3D) em neurônios derivados de iPSC tratados com ASO de controle

(ASO-C, 10 μ M), e ASOs 1-7 (10 μ M) e Topotecan (Topo, 1 μ M). Abreviações: Tx, tratamento; DIV, dias *in vitro*. Barras de erro representam erro padrão da média.

[020] As figs. 4A a 4I mostram análise de ASO-4 humano e Topotecano em neurônios derivados de iPSC GABAérgicos. As figs. 4A a 4F mostram expressão significativa (normalizada para 1 nM) de *UBE3A*-AS (FIG. 4A), *SNORD116* (FIG. 4B), *IPW* (FIG. 4C), *SNORD115* (FIG. 4D), *SNORD109A/B* (FIG. 4E) e *UBE3A* (FIG. 4F) níveis de RNA no estado estacionário em neurônios derivados de iPSC tratados com uma curva de dose logarítmica de 10 pontos $\frac{1}{2}$ de ASO-4 e Topotecano (1 nM, 3 nM, 10 nM, 30 nM, 100 nM, 300 nM, 1 μ M, 3 μ M, 10 μ M e 30 μ M). A fig. 4G é um esquema da linha do tempo experimental para examinar o ASO-4 em neurônios derivados de iPSC GABAérgicos tratados em 59 DIV. As figs. 4H a 4I mostram a expressão significativa (normalizada para ASO-C) de *UBE3A*-AS (Fig. 4H) e *UBE3A* (Fig. 4I) níveis de RNA no estado estacionário em neurônios derivados de iPSC tratados com ASO-C (10 μ M) e ASO -4 (1, 5 e 10 μ M). Abreviações: Tx, tratamento. Barras de erro representam erro padrão da média.

[021] As figs. 5A a 5F mostram a análise de ASOs otimizados em neurônios GABAérgicos e glutamatérgicos humanos derivados de iPSC. A fig. 5A é um diagrama esquemático da linha do tempo experimental para examinar ASOs otimizadas em neurônios GABAérgica iPSC. A fig. 5B mostra expressão relativa de (normalizado para controle de água) dos níveis de RNA no estado estacionário de *UBE3A*-AS em neurônios derivados de iPSC tratados com uma curva de dose de $\frac{1}{2}$ log de 5 pontos (30 nM, 100 nM, 300 nM, 1 μ M, 3 μ M ; n = 6) de ASO-3.1, ASO-3.2, ASO-4.1, ASO-4.2, ASO-4.3, ASO-4.4, ASO-6.1, ASO-4.I e ASO-4.S. ASO-4.I e ASO-4.S representam o ASO-4 fabricado por duas empresas (ASO-4.I, Integrated DNA Technologies; ASO-4.S, Sigma-Aldrich). A fig. 5C é um esquema da linha do tempo experimental para examinar ASO-4 e ASO-6.1 em neurônios GABAérgica iPSC-derivados. A fig. 5D mostra expressão expressiva (normalizada

a 1 nM) dos níveis de RNA no estado estacionário *UBE3A-AS* e *UBE3A* em neurônios derivados de iPSC tratados com uma curva de dose log de 10 pontos ½ (1 nM, 3 nM, 10 nM, 30 nM, 100 nM, 300 nM, 1 µM, 3 µM, 10 µM e 30 µM ; n = 3) de ASO-4 (ASO-4.I e ASO-4.S) e ASO-6.1. A fig. 5E é um esquema químico da linha do tempo experimental para examinar o ASO-4 e o ASO-6.1 em neurônios glutamatérgicos derivados de iPSC. A fig. 5F mostra expressão expressiva (normalizada para controle de água) dos níveis de RNA no estado estacionário *UBE3A-AS* e *UBE3A* em neurônios derivados de iPSC tratados com uma curva de dose log de 10 pontos ½ (1 nM, 3 nM, 10 nM, 30 nM, 100 nM, 300 nM, 1 µM, 3 µM, 10 µM e 30 uM; n = 3) de ASO-4 (ASO-4.I e ASO-4.S) e ASO-6.1. Barras de erro representam erro padrão da média.

[022] As figs. 6A a 6D mostram a identificação da região alvo ASO na região impressa em PWS / AS. FIG. 6 A mostra a anotação RefSeq da região impressa PWS / AS ortóloga no cromossomo 7C de camundongo. A fig. 6B ilustra no conjunto transcrito gerado a partir de dados de sequenciamento de RNA (RNA-seq) do cérebro de camundongo. A fig. 6C mostra a região alvo de ASO mostrando snoRNAs de *Snord115* retidos em exons do transcrito do gene hospedeiro de *Snord115* / terminação 5' de *Ube3a-AS*. As leituras de RNA-seq alinhadas são mostradas abaixo das transcrições montadas. Exons e introns são representados por caixas e linhas, respectivamente. A fig. 6D é uma representação de alinhamento de equivalência de snoRNAs em exons retidos *Snord115_ENSMUST00000101836* (SEQ ID NO: 490), *Snord115_ENSMUST0000010 1936* (SEQ ID NO: 491), *Snord115_ENSMUST0000010 4493* (SEQ ID NO: 492), *Snord115_ENSM: e Snord115_ENSMUST0000010 4427* (SEQ ID NO: 494), mostrando que snoRNAs retidos têm uma C Box degenerada, que é necessária para a formação funcional de snoRNA.

[023] As figs. 7A a 7G mostram a identificação da região alvo de ASO na região impressa de uma PWS / AS. A fig. 7A mostra a anotação RefSeq da região impressa da síndrome de Prader-Willi / Angelman (PWS / AS). FIG. 7B mostra a montagem de RNA-seq do transcrito policistrônico de PWS humano. A fig. 7C mostra que *SNORD115-45* é retido em um exon na *terminação 3'* do transcrito do gene hospedeiro *SNORD115* / *terminação 5'* de *UBE3A-AS*. Leituras de RNA-seq alinhadas geradas a partir do cérebro humano adulto mostrando que a LINHA L1 é transcrita. A fig. 7D mostra a anotação RefSeq de *terminação 3'* do cluster *SNORD115* (*SNORD115-39-48* e *SNORD109B*). A fig. 7E mostra a localização do elemento LINE L1 entre *SNORD115-44* e *SNORD115-45*. A fig. 7F mostra o alinhamento de cadeia de mamíferos placentários representam os principais pontos de conservação na região *SNORD115-45-48*, embora reduzida em roedores. A fig. 7G mostra o alinhamento de sequência de snoRNAs na região alvo para *SNORD115-44* (snoRNA funcional) (SEQ ID NO: 495), *SNORD115-48* (SEQ ID NO: 496), *SNORD115-45* (SEQ ID NO: 497), *SNORD115-46* (SEQ ID NO: 498), e *SNORD115-47* (SEQ ID NO: 499), mostrando *SNORD115-45* (retido), *SNORD115-46* (parcialmente retido), e *SNORD116-47* ter degenerado C Box, que é necessário para a formação funcional de snoRNA.

[024] As figs. 8A a 8C mostram análises farmacodinâmicas de ASOs candidatos. A fig. 8A mostra curvas de resposta à dose ajustadas dos níveis normalizados de RNA de *UBE3A-AS* em neurônios derivados de iPSC GABAérgicos tratados com uma curva de dose log de 10 pontos ½ (1 nM, 3 nM, 10 nM, 30 nM, 100 nM, 300 nM, 1 µM, 3 µM, 10 µM e 30 µM ; n = 2) de ASO-4 e ASO-6.1 com diferentes projetos de modificação de esqueleto e RNA. As curvas de resposta de dose ajustada utilizando um modelo de regressão logística de 4 parâmetros (Hill). Os gráficos representam modelos ajustados e erro padrão. O eixo

Y representa os *níveis* relativos de RNA *UBE3A-AS* e o eixo X representa as concentrações *logarolares* (M) de ASO. As figs. 8B e 8C são gráficos de dendrograma de agrupamento hierárquico e constelação de curvas de resposta à dose ajustadas mostrando relação entre ASOs candidatos e agrupamento em 3 grupos.

[025]A fig. 9 mostra a análise harmacodinâmica p de ASO-6.1.PO-1.O e ASO-4.4.PSL em neurônios derivados de iPSC da síndrome de Angelman. Modelo de regressão logística de 4 parâmetros (Hill) dos *níveis* normalizados de RNA no estado estacionário de *UBE3A-AS* nos neurônios derivados da síndrome de Angelman iPSC tratados com uma curva de dose log de 10 pontos ½ (1 nM, 3 nM, 10 nM, 30 nM, 100 nM, 300 nM, 1 pM, 3 pM, 10 pM, e 30 μ M ; n = 3) de ASO- 6.1.PO-1.O e ASO-4.4.PSL.

[026]A fig.10 mostra a análise de expressão de RNAs codificados pelo transcrito policistrônico de PWS nos neurônios iPSC da síndrome de Angelman tratados com ASO-6.1-PO-1.O e ASO-4.4.PSL. Mostrados são os níveis normalizados de RNA de estado estacionário dos snoRNAs *SNURF*, *SNRPN*, *SNHG116*, *SNORD116*, *IPW*, *SNHG115*, snoRNAs *SNORD115*, *UBE3A-AS* e *UBE3A* em neurônios derivados de iPSC tratados com veículo (1% H₂O ; n = 3), ASO -6.1.PO-1.O (30 μ M; n = 3) e ASO-4.4.PSL (30 μ M; n = 3). Os dados representam a porcentagem média de RNA em relação ao veículo. Barras de erro representam erro padrão da média. Asterisco (*) indica diferenças estatisticamente significativas (p <0,05) utilizando o ácido o ne - ANOVA de Dunnett com o teste de comparação múltipla em relação ao veículo.

[027]A fig. 11 mostra a análise farmacodinâmica de ASO-6.1.PO-1.O e ASO-4.4.PSL em macacos *Cynomolgus*. Mostram-se em níveis estáveis de RNA de estado de *UBE3A-AS* em regiões do SNC de macaco tratados com veículo (0,9% de soro fisiológico ; n = 5), ASO- 6.1.PO-1.O (10 mg ; n = 3), e ASO 4,4-.PSL (10 mg ; n = 3). Os dados representam a porcentagem *média* de RNA *UBE3A-AS* em relação ao

veículo. Barras de erro representam erro padrão da média. O asterisco (*) denota diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) usando ANOVA unidirecional com o teste de comparação múltipla de Dunnett em relação ao veículo.

DESCRÍÇÃO DETALHADA

[028] O *UBE3A-AS* / *UBE3A-AS* transcrição, de outro modo conhecida como ubiquitina-proteína ligase *E3A* transcrito antisense e *UBE3A-AS* / *UBE3A-AS*, é o nome para o transcrito produzido pela transcrição do *UBE3A-AS* transcrição, que se encontra no antisense *Cadeia de DNA* relativa ao gene *UBE3A*. Observe que nomes de genes com todas as letras maiúsculas indicam genes humanos (por exemplo, *UBE3A*) e nomes de genes com apenas a primeira letra maiúscula indicam genes de mouse (por exemplo, *Ube3a*). O transcrito *UBE3A-AS* é transcrito como parte de uma grande unidade de transcrição policistrônica que codifica *SNURF-SNRPN*, um aglomerado de pequenos RNAs nucleolares (SNORDs) de caixas órfãs de C / D e vários RNAs longos e não codificados. Em ambos rato e humano, o *UBE3A* / *UBE3A* gene é impressa em neurônios do sistema nervoso central, onde é expressa unicamente a partir da materna alelo. O *UBE3A-AS* / *UBE3A-AS* transcrição é necessário e suficiente para a transcrição silêncio do paterna *UBE3A* / *UBE3A* alelo, e inibição de *UBE3A-AS* / *UBE3A-AS* reativa transcrição do paterna *UBE3A* / *UBE3A* alelo. Mutações que afetam a função ou expressão do alelo *UBE3A* herdado pela mãe causam a síndrome de Angelman (EA). Na EA, o alelo paterno é funcional, mas epigeneticamente silenciado. Se unsilenced no AS pacientes, o paternal *UBE3A* alelo poderia ser uma fonte de funcional *UBE3A* em neurônios.

[029] O policistrônico transcrição unidade de íons (daqui em diante referido como o PTU) que codifica *UBE3A-AS* é de cerca de 450, 000 pares de bases de comprimento. A transcrição do PTU começa nos exons a montante (ex- U) no locus *SNURF-SNRPN* e para em direção ao extremo 5' de *UBE3A*. A PTU está

organizada (5'-3') da seguinte forma: SNURF-SNRPN, SNORD107, SNORD64, SNORD109A, SNORD116 (29 cópias), IPW, SNORD115 (48 cópias), SNORD109B e UBE3A, orientado na direção oposta das transcrições upstream. O transcrito policistrônico é emendado alternativamente e sujeito a processamento 3'alternativo. SNURF-SNRPN codifica dois polipeptídeos. As SNORDs estão nos ítrons de um transcrito de gene do hospedeiro (SNHG14) e são geradas por desagregação exonucleolítica dos ítrons emendados. UBE3A-AS representa a terminação 3' da transcrição que se sobrepõe ao gene UBE3A. A maioria dos snoRNAs de caixa C / D desempenha um papel na biogênese do ribossomo, onde eles direcionam a 2'-O-metilação dos RNAs ribossômicos (rRNA); no entanto, os snoRNAs localizados na região PWS / AS não possuem complementaridade de sequência com os rRNAs conhecidos; contudo, a SNORD115 snoRNA foi encontrado para alterar o processamento alternativo do receptor de serotonina 2C pré-ARNm.

[030] É aqui revelado evidências de que a 5'-terminação de UBE3A-AS transcrição é importante para a sua estabilidade. Tal como aqui divulgado, ASOs segmentação a 5' -terminação de UBE3A-AS são capazes de reduzir UBE3A-AS níveis, presumivelmente por paragem de transcrição de UBE3A-AS, e transformando-o em paterno UBE3A alelo.

[031] O termo "oligonucleotídeo", conforme aqui utilizado, é definido como geralmente é entendido pelo técnico no assunto como uma molécula compreendendo dois ou mais nucleosídeos covalentemente ligados. Esses nucleosídeos ligados covalentemente também podem ser referidos como moléculas de ácido nucleico ou oligômeros. Os oligonucleotídeos são comumente produzidos em laboratório por síntese química em fase sólida seguida de purificação. Quando se refere a uma sequência do oligonucleotídeo, é feita referência à sequência ou ordem das porções de nucleobases, ou modificações das mesmas, dos nucleotídeos ou nucleosídeos

ligados covalentemente. O oligonucleotídeo aqui divulgado é fabricado pelo homem, por exemplo, quimicamente sintetizado. O oligonucleotídeo aqui divulgado também pode compreender um ou mais nucleosídeos ou nucleotídeos modificados.

[032] O termo "um oligonucleotídeo *antisense*", conforme usado aqui, é definido como oligonucleotídeos capazes de modular a expressão de um gene alvo por hibridação com um ácido nucleico alvo, em particular com uma sequência contígua em um ácido nucleico alvo. Em algumas modalidades, os oligonucleotídeos *antisense* divulgados neste documento são de cadeia simples.

[033] O termo "sequência nucleotídica contígua" se refere à região do oligonucleotídeo que é complementar ao ácido nucleico alvo. O termo é usado aqui de forma intercambiável com o termo "sequência nucleobase contígua" e o termo "sequência do motivo oligonucleotídico". Em algumas modalidades, todos os nucleotídeos do oligonucleotídeo estão presentes na sequência nucleotídica contígua. Em algumas modalidades, o oligonucleotídeo compreende a sequência nucleotídica contígua e pode, opcionalmente, compreender nucleotídeos adicionais, por exemplo, uma região ligante de nucleotídeos que pode ser usada para conectar um grupo funcional à sequência nucleotídica contígua. A região ligante de nucleotídeo pode ou não ser complementar ao ácido nucleico alvo.

[034] Os nucleotídeos são os blocos de construção de oligonucleotídeos e polinucleotídeos e podem incluir nucleotídeos de ocorrência natural e não natural. Na natureza, nucleotídeos, como nucleotídeos de DNA e RNA, compreendem uma porção de açúcar em ribose, uma porção de nucleobase e um ou mais grupos fosfato (que está ausente nos nucleosídeos). Nucleosídeos e nucleotídeos também podem ser chamados de "unidades" ou "monômeros".

[035] O termo "nucleosídeo modificado" ou "modificação de nucleosídeo", conforme usado neste documento, se refere a nucleosídeos modificados em

comparação com o nucleosídeo equivalente de DNA ou RNA pela introdução de uma ou mais modificações da porção de açúcar ou da porção de base (núcleo). Em algumas modalidades, o nucleosídeo modificado compreende uma fração de açúcar modificada. O termo núcleos ido modificado também pode ser aqui utilizado alternadamente com o termo "análogo de nucleosídeo" ou modificados "unidades" ou modificados "monômeros".

[036] O termo "ligação internucleosídeo modificado" é definido como geralmente entendido pelo técnico no assunto como ligações diferentes das ligações fosfodiéster (PO) ou ligações fosfato naturais que acoplaram covalentemente dois nucleosídeos. Os nucleotídeos com ligação internucleosídeo modificada também são denominados "nucleotídeos modificados". Em algumas modalidades, a ligação internucleosídeo modificada aumenta a resistência à nuclease do oligonucleotídeo em comparação com uma ligação fosfodiéster. Para oligonucleotídeos de ocorrência natural, a ligação internucleosídeo inclui grupos fosfato, criando uma ligação fosfodiéster entre nucleosídeos adjacentes. Ligações internucleosídeos modificadas são particularmente úteis na estabilização de oligonucleotídeos para uso *in vivo* e podem servir para proteger contra a clivagem de nucleases em regiões de nucleosídeos de DNA ou RNA no oligonucleotídeo divulgado aqui, por exemplo, dentro da região de lacuna de um oligonucleotídeo gapmer, bem como em regiões de nucleosídeos modificados.

[037] Em algumas modalidades, o oligonucleotídeo compreende uma ou mais ligações internucleosídicas modificadas do fosfodiéster natural para uma ligação que é, por exemplo, mais resistente ao ataque de nuclease. A resistência à nuclease pode ser determinada pela incubação do oligonucleotídeo no soro sanguíneo ou usando um ensaio de resistência à nuclease [por exemplo, fosfodiesterase de veneno de cobra (SVPD)], ambos bem conhecidos na técnica. As ligações internucleosídicas que são

capazes de aumentar a resistência à nuclease de um oligonucleotídeo são referidas como ligações internucleosídicas resistentes à nuclease.

[038] Em algumas modalidades, pelo menos 50% das ligações internucleosídicos no oligonucleotídeo, ou sequência nucleotídica contígua dos mesmos, são modificados, como pelo menos 60%, como pelo menos 70%, como pelo menos 80% ou como pelo menos 90% das ligações internucleosídicos no oligonucleotídeo, ou sequência nucleotídica contígua dos mesmos, são modificadas. Em algumas modalidades, todas as ligações internucleosídicos do oligonucleotídeo ou sua sequência nucleotídica contígua são modificadas.

[039] Será reconhecido que, em algumas modalidades, as ligações internucleosídicos que ligam o oligonucleotídeo a um grupo funcional não nucleotídico, como um conjugado, podem ser fosfodiéster. Em algumas modalidades, as ligações internucleosídicos que ligam o oligonucleotídeo a um grupo funcional não nucleotídico são modificadas.

[040] Em algumas modalidades, todas as ligações internucleosídicos do oligonucleotídeo, ou sua sequência nucleotídica contígua, são ligações internucleosídicos resistentes à nuclease.

[041] Ligações internucleosídicos modificadas podem, por exemplo, ser seleccionado a partir do grupo que compreende fosforotioato, diphosphorothioate, e boranofosfato. Em algumas formas de realização, as ligações internucleosídicos modificadas são compatíveis com a RNase recrutamento H do oligonucleotídeo aqui divulgado, por exemplo, fosforotioato, diphosphorothioate, ou boranofosfato.

[042] Em algumas modalidades, a ligação internucleosídeo compreende enxofre (S), tal como uma ligação internucleosídeo fosforotioato.

[043] Uma ligação internucleosídicos de fosforotioato é particularmente útil devido a resistência à nuclease, benéficos farmacêutica e kinetics e facilidade de fabrico. Em modalidades preferidas, pelo menos 50% das ligações internucleosídicos

no oligonucleotídeo, ou sequência nucleotídica contígua dos mesmos, são fosforotioato, como pelo menos 60%, como pelo menos 70%, como pelo menos 70%, como pelo menos 80 %, ou como pelo menos 90% das ligações internucleosídeos no oligonucleotídeo, ou sequência nucleotídica contígua dos mesmos, são fosforotioato. Em algumas modalidades, todas as ligações internucleosídeos do oligonucleotídeo, ou sua sequência nucleotídica contígua, são fosforotioato.

[044] Em algumas modalidades, o oligonucleotídeo compreende uma ou mais ligações internucleosídeos neutras, particularmente uma ligação internucleosídeos selecionada a partir de fosfotriéster, metilfosfonato, MMI, amida-3, formalcetal ou tioformacetal. Outras ligações internucleosídeos são divulgadas no documento WO2009 / 124238 (incorporado aqui por referência). Numa modalidade, a ligação internucleosídeo é selecionada a partir de ligantes divulgados no documento WO2007 / 031091 (incorporado aqui por referência).

[045] Ligações resistentes a nuclease, tal como fosforotioato ligações, são particularmente úteis nas regiões oligonucleotídicas capazes de nuclease recrutamento quando formando um duplex com o ácido nucleico alvo, tal como a região L de gapmers, ou a região não-nucleosídeo modificado de headmers e tailmers. As ligações de fosforotioato podem, no entanto, também ser úteis em regiões que não recrutam nucleases e / ou regiões que aumentam a afinidade, como as regiões F e F' para gapmers, ou a região nucleosídica modificada de headmers e tailmers.

[046] Cada uma das regiões de design pode, no entanto, compreender ligações internucleosídicas diferentes de fosforotioato, como ligações fosfodiéster, particularmente em regiões onde nucleosídeos modificados, como LNA, protegem a ligação contra a degradação de nucleases. A inclusão de ligações fosfodiéster, como uma ou duas ligações, particularmente entre ou adjacentes a unidades nucleósidas modificadas (tipicamente nas regiões de recrutamento de não nucleases) pode

modificar a biodisponibilidade e / ou a biodistribuição de um oligonucleotídeo. O documento WO2008 / 113832 é aqui incorporado por referência para o ensino de oligonucleotídeos possuindo ligações fosfodiéster.

[047] Em algumas modalidades s, todas as ligações internucleosídeos no oligonucleotídeo são ligações fosforotioato e / ou boranofosfato. Em algumas modalidades s, todas as ligações internucleosídeos no oligonucleotídeo são ligações fosforotioato.

[048] O termo nucleobase inclui a purina (por exemplo, adenina e guanina) e pirimidina (por exemplo, uracila, timina, e citosina) fracção presente em nucleosídeos e nucleotídeos, que formam ligações de hidrogénio em hibridação de ácido nucleico. O termo nucleobase também abrange nucleobases modificadas que podem diferir das nucleobases de ocorrência natural, mas são funcionais durante a hibridação de ácidos nucleicos. Neste contexto “nucleobase” se refere a ambas as bases nucleicas que ocorrem naturalmente, tais como adenina, guanina, citosina, timidina, uracila, xantina, e hipoxantina, bem como variantes que n ocorrem naturalmente.

[049] Em algumas modalidades, a porção nucleobase é modificada alterando a purina ou pirimidina em uma purina ou pirimidina modificada, como purina substituída ou pirimidina substituída, como um nucleobase selecionado a partir de isocitose, pseudoisocitosina, 5-metil- citosina, 5-tiazolo- citosina, 5-propinil-citosina, 5-propinil-uracil, 5-bromouracil 5-tiazolo-uracil, 2-tio-uracil, 2'-timina, inosina, diaminopurina, 6-aminopurina, 2-aminopurina, 2,6 -diaminopurina, e 2-cloro-6-aminopurina.

[050] As porções de bases nucleoticas pode ser indicada pelo código de uma letra para cada base nucleotica correspondente, por exemplo, A, T, G, C, ou L, em que cada letra pode, opcionalmente, incluir bases nucleoticas modificadas de função equivalente. Por exemplo, nos oligonucleotídeos exemplificados, as porções de nucleobases são selecionadas dentre A, T, G, C e 5-metil-

citosina (5mC). Combinações dessas modificações também podem ser usadas. Por exemplo, podem ser utilizados nucleosídeos 5mC LNA. Da mesma forma, 2'-hidroximetil (2'-OMe) 5mC pode ser usado.

[051] O termo "complementaridade" descreve a capacidade de emparelhamento de bases Watson-Crick de nucleosídeos / nucleotídeos. Os pares de bases Watson-Crick são guanina (G) - citosina (C) e adenina (A) - timina (T) / uracil (U). Será entendido que os oligonucleotídeos podem compreender nucleosídeos com nucleobases modificadas, por exemplo, a 5-metil citosina é frequentemente usada no lugar da citosina e, como tal, o termo complementaridade abrange o pareamento de bases de Watson Crick entre nucleobases não modificadas e modificadas.

[052] O termo "% complementar", conforme usado aqui, se refere ao número de nucleotídeos em porcentagem de uma sequência nucleotídica contígua em uma molécula de ácido nucleico (por exemplo, oligonucleotídeo) que, em uma determinada posição, são complementares a (ou seja, formam a base Watson Crick emparelha com) uma sequência nucleotídica contígua, em uma determinada posição de uma molécula de ácido nucleico separada (por exemplo, o ácido nucleico alvo). A porcentagem é calculada contando o número de bases alinhadas que formam pares entre as duas sequências, dividindo pelo número total de nucleotídeos no oligonucleotídeo e multiplicando por 100. Nessa comparação, um nucleobase / nucleotídeo que não se alinha (forma uma base par) é denominado incompatibilidade.

[053] O termo "hibridação" ou "hibridização", conforme usado aqui, deve ser entendido como duas cadeias de ácidos nucleicos (por exemplo, um oligonucleotídeo e um ácido nucleico alvo) formando ligações de hidrogênio entre pares de bases nas cadeias opostas, formando assim um duplex. A afinidade da ligação entre duas cadeias de ácidos nucleicos é a força da hibridação. É frequentemente descrito em termos da temperatura de fusão (Tm) definida como a temperatura à qual metade dos

oligonucleotídeos são duplexados com o ácido nucleico alvo. Em condições fisiológicas, Tm não é estritamente proporcional à afinidade (Mergny e Lacroix, 2003, Oligonucleotides 13: 515-537). A energia livre de Gibbs do estado padrão ΔG° é uma representação mais precisa da afinidade de ligação e está relacionada à constante de dissociação (Kd) da reação por $\Delta G^\circ = -RT\ln(Kd)$, onde R é a constante de gás e T é temperatura absoluta. Portanto, um ΔG° muito baixo da reação entre um oligonucleotídeo e o ácido nucleico alvo reflete uma forte hibridação entre o oligonucleotídeo e o ácido nucleico alvo. ΔG° é a energia associada a uma reação em que as concentrações aquosas são 1M, o pH é 7 e a temperatura é 37 °C. A hibridação de oligonucleotídeos com um ácido nucleico alvo é uma reação espontânea e para reações espontâneas ΔG° é menor que zero. O ΔG° pode ser medido experimentalmente, por exemplo, pelo uso do método de calorimetria de titulação isotérmica (ITC), como descrito em Hansen et al., 1965, Chem. Comm. 36-38 e Holdgate et al., 2005, Drug Discov Today. O especialista saberá que o equipamento comercial está disponível para medições de ΔG° . O ΔG° também pode ser estimado numericamente usando o modelo de vizinho mais próximo, conforme descrito por SantaLucia, 1998, Proc Natl Acad Sci USA. 95: 1460-1465, utilizando paretos termodinâmicos derivados adequadamente descritos por Sugimoto et al., 1995, Biochemistry 34: 11211-11216 e McTigue et al., 2004, Biochemistry 43: 5388-5405. Para ter a possibilidade de modular seu alvo de ácido nucleico pretendido por hibridação, os oligonucleotídeos aqui divulgados hibridam com um ácido nucleico alvo com valores estimados de ΔG° abaixo de -10 kcal para oligonucleotídeos com 10 a 30 nucleotídeos de comprimento. Em algumas modalidades, o grau ou a força da hibridação é medido pelo estado padrão de energia livre de Gibbs ΔG° . Os oligonucleotídeos podem hibridar com um ácido nucleico alvo com valores estimados de ΔG° abaixo da faixa de -10 kcal, como abaixo de -15 kcal, como abaixo de -20 kcal e abaixo de -25 kcal para oligonucleotídeos com 8 a 30 nucleotídeos em

comprimento. Em algumas modalidades, os oligonucleotídeos hibridizam com um ácido nucleico alvo com um valor estimado de ΔG° de -10 a -60 kcal, como -12 a -40, como de -15 a -30 kcal ou de -16 a -27 kcal, de -18 a -25 kcal.

[054] Em algumas modalidades, o oligonucleotídeo divulgado compreende uma sequência nucleotídica contígua de pelo menos 8 nucleotídeos que é complementar ou hibridiza com uma sequência alvo presente na molécula de ácido nucleico alvo. A sequência nucleotídica contígua (e, portanto, a sequência alvo) compreende pelo menos 8 nucleotídeos contíguos, como 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ou 30 nucleotídeos contíguos, tais como 12-25, tais como 14-18 nucleotídeos contíguos.

[055] Em algumas modalidades, o oligonucleotídeo divulgado é um ácido nucleico funcional, como um siRNA, shRNA ou gRNA da nuclease, que inibe, modifica ou exclui a sequência de ácido nucleico alvo.

[056] O termo "modulação da expressão", conforme aqui utilizado, deve ser entendido como um termo geral para a capacidade de um oligonucleotídeo de alterar a quantidade de RNA / proteína UBE3A quando comparado com a quantidade de UBE3A antes da administração do oligonucleotídeo. Alternativamente, a modulação da expressão pode ser determinada por referência a uma experiência de controle em que o oligonucleotídeo divulgado não é administrado. A modulação efetuada pelo O ligonucleotídeo está relacionada com ele a capacidade para reduzir, de remoção, prevenir, diminuir, reduzir ou terminar a supressão do paterna *UBE3A* - AS transcrição, ou seja, por direcionamento para a terminação 5' de *UBE3A*-AS, que está a jusante do *SNORD115-45* snoRNA. A modulação também pode ser vista como a capacidade do oligonucleotídeo de restaurar, aumentar ou melhorar a expressão do *UBE3A* paterno, por exemplo, por remoção ou bloqueio de mecanismos *inibidores* afetados pelo *UBE3A*-AS.

[057] O oligonucleotídeo divulgado pode compreender um ou mais nucleosídeos que possuem uma porção de açúcar modificada, isto é, uma modificação da porção de açúcar quando comparada à porção de açúcar ribose encontrada no DNA e RNA. Numerosos nucleosídeos com modificação da porção de açúcar ribose foram feitos, principalmente com o objetivo de melhorar certas propriedades dos oligonucleotídeos, como afinidade e / ou resistência à nuclease. Tais modificações incluem aqueles em que a estrutura em anel da ribose é modificado, por exemplo, por substituição com um anel de hexose (HNA), ou um anel bicílico, que tipicamente têm uma ponte biradical entre as C2 e C4 carbonos sobre a ribose anel (LNA), ou um anel ribose não ligado que normalmente não possui uma ligação entre os carbonos C2 e C3 (por exemplo, UNA). Outros nucleosídeos modificados com açúcar incluem, por exemplo, nucleosídeos de biciclo-hexose (WO2011/017521) ou nucleosídeos tricíclicos (WO2013/154798). Os nucleosídeos modificados também incluem nucleosídeos onde a porção de açúcar é substituída por uma porção que não seja de açúcar, por exemplo, no caso de ácidos nucleicos peptídicos (PNA) ou ácidos nucleicos de morfolino.

[058] As modificações do açúcar também incluem modificações feitas através da alteração dos grupos substituintes no anel da ribose para outros grupos que não o hidrogênio, ou o grupo 2'-OH encontrado naturalmente nos nucleosídeos de DNA e RNA. Os substituintes podem, por exemplo, ser introduzidos nas posições 2', 3', 4' ou 5'. Os nucleosídeos com porções de açúcar modificadas também incluem nucleosídeos 2' modificados, tais como nucleosídeos 2' substituídos. De fato, muito foco foi gasto no desenvolvimento de nucleosídeos substituídos em 2' e vários nucleosídeos substituídos em 2' foram encontrados para ter propriedades benéficas quando incorporados em oligonucleotídeos, como resistência a nucleosídeos aprimorada e afinidade aprimorada.

[059] Um nucleosídeo 2' modificado com açúcar é um nucleosídeo que possui um substituinte diferente de H ou -OH na posição 2' (nucleosídeo substituído 2') ou compreende um birradical 2' ligado e inclui nucleosídeos 2' substituídos e LNA (nucleosídeos 2' -4 em ponte biradical). Por exemplo, o açúcar modificado em 2' pode fornecer maior afinidade de ligação e / ou resistência à nuclease aumentada ao oligonucleotídeo. Exemplos de nucleosídeos modificados substituídos em 2' são 2'-O-alquil-RNA, 2'-O-metil-RNA (O-Me), 2'-alcoxi-RNA, 2'-O-metoxietil-RNA (MOE), 2'-amino-DNA, 2'-fluoro-RNA e 2'-fluoro-ANA (F-ANA). Para mais exemplos, consulte Freier & Altmann; Nucl. Acid Res., 1997, 25, 4429-4443 e Uhlmann; Curr. Parecer no Drug Development, 2000, 3 (2), 293-213; e Deleavey e Damha, Chemistry and Biology 2012, 19, 937.

[060] Os nucleosídeos de ácido nucleico bloqueado (LNA) são nucleosídeos modificados que compreendem um grupo de ligação (referido como biradical ou ponte) entre C2' e C4' do anel de açúcar ribose de um nucleotídeo. Estes nucleosídeos são também denominados ácido nucleico em ponte ou ácido nucleico bicíclico (BNA) na literatura.

[061] Degradação mediada por nuclease se refere a um oligonucleotídeo capaz de mediar a degradação de uma sequência nucleotídica complementar ao formar um duplex com essa sequência.

[062] Em algumas modalidades, o oligonucleotídeo pode funcionar via degradação mediada por nuclease do ácido nucleico alvo, onde os oligonucleotídeos divulgados são capazes de recrutar uma nuclease, particularmente a endonuclease, preferencialmente endoribonuclease (RNase), como RNase H. Exemplos de projetos de oligonucleotídeos que operam através de mecanismos mediados por nucleases são oligonucleotídeos que, tipicamente, compreendem uma região de pelo menos 5 ou 6 nucleídos de ADN e estão

flanqueados de um lado ou de ambos os lados por afinidade de nucleosídeos reforço, por exemplo, *gapmers*, *headmers*, e *tailmers*.

[063] O termo "*gapmer*", conforme aqui utilizado, se refere a um oligonucleotídeo antisense que compreende uma região de oligonucleotídeos de recrutamento da RNase H (lacuna) que é flanqueada 5' e 3' por um ou mais nucleosídeos modificados para melhorar a afinidade (terminais). Vários projetos de *gapmer* são descritos aqui. Cabeçotes e *tailmers* são oligonucleotídeos capazes de recrutar RNase H onde um dos terminais está ausente, isto é, apenas uma das terminações do oligonucleotídeo compreende nucleosídeos modificados que aumentam a afinidade. Para cabeçadas o terminal 3' está ausente (ou seja, o terminal 5' k compreende nucleosídeos modificados para aumentar a afinidade) e para *tailmers* o terminal 5' está ausente (ou seja, o terminal 3' compreende os nucleosídeos modificados para aumentar a afinidade).

[064] A conjugação do oligonucleotídeo divulgado a uma ou mais porções não nucleotídicas pode melhorar a farmacologia do oligonucleotídeo, por exemplo, afetando a atividade, distribuição celular, captação celular ou estabilidade do oligonucleotídeo. Em algumas modalidades, a porção conjugada modifica ou aprimora as propriedades farmacocinéticas do oligonucleotídeo, melhorando a distribuição celular, biodisponibilidade, metabolismo, excreção, permeabilidade e / ou captação celular do oligonucleotídeo. Em particular, o conjugado pode ter como alvo o oligonucleotídeo específico para um órgão, tecido, ou tipo de célula e assim aumentar a eficácia do oligonucleotídeo em que órgão, tecido, ou tipo de célula. Ao mesmo tempo, o conjugado pode servir para reduzir a atividade do oligonucleotídeo em tipos de células não-alvo, tecidos ou órgãos, por exemplo, fora de atividade alvo ou a atividade em células de tipos, tecidos ou órgãos não-alvo. Os documentos WO 93/07883 e WO 2013/033230 fornecem porções conjugadas adequadas, que são aqui incorporadas por referência. O documento WO 2012/143379 fornece um método de

administração de uma droga através da barreira hematoencefálica por conjugação a um fragmento de anticorpo com afinidade ao receptor de transferrina, que são aqui incorporados por referência.

[065] Em algumas modalidades, a porção não nucleotídica (porção conjugada) é selecionada do grupo que consiste em carboidratos, ligantes receptores da superfície celular, substâncias medicamentosas, hormônios, substâncias lipofílicas, polímeros, proteínas, peptídeos, toxinas (por exemplo, toxinas bacterianas), vitaminas, proteínas virais (por exemplo, capsídeos) ou combinações dos mesmos. Em algumas modalidades, a porção não nucleotídica de um anticorpo ou fragmento de anticorpo, tal como um anticorpo ou fragmento de anticorpo que facilita a entrega através da barreira hematoencefálica, em particular um anticorpo ou fragmento de anticorpo direcionado ao receptor de transferrina.

[066] O termo "sujeito" se refere a qualquer indivíduo que é alvo de administração ou tratamento. O sujeito pode ser um vertebrado, por exemplo, um mamífero. Assim, o sujeito pode ser um paciente humano ou veterinário. O termo "paciente" se refere a um sujeito sob tratamento de um médico, por exemplo, médico.

[067] O termo "terapeuticamente eficaz" se refere à quantidade da composição utilizada é de quantidade suficiente para melhorar uma ou mais causas ou sintomas de uma doença ou distúrbio. Essa melhoria requer apenas uma redução ou alteração, não necessariamente eliminação.

[068] O termo "farmaceuticamente aceitável" se refere aos compostos, materiais, composições e / ou formas de dosagem, que estão dentro do escopo de um julgamento médico adequado, adequado para uso em contato com tecidos de seres humanos e animais sem toxicidade, irritação excessiva, resposta alérgica ou outros problemas ou complicações proporcionais a uma relação benefício / risco razoável.

[069] O termo "tratamento" se refere ao tratamento médico de um paciente com a intenção de curar, melhorar, estabilizar ou prevenir uma doença, condição

patológica ou distúrbio. Este termo inclui tratamento ativo, isto é, tratamento direcionado especificamente para a melhoria de uma doença, condição patológica ou distúrbio, e também inclui tratamento causal, isto é, tratamento direcionado para a remoção da causa da doença associada, condição patológica ou transtorno. Além disso, esse termo inclui tratamento paliativo, ou seja, tratamento destinado ao alívio dos sintomas, e não à cura da doença, condição patológica ou distúrbio; tratamento preventivo, isto é, tratamento direcionado a minimizar ou inibir parcial ou completamente o desenvolvimento da doença, condição patológica ou distúrbio associada; e tratamento de suporte, isto é, tratamento empregado para suplementar outra terapia específica direcionada à melhoria da doença, condição patológica ou distúrbio associada.

[070] O termo "inibir" se refere a uma diminuição em uma atividade, resposta, condição, doença ou outro parâmetro biológico que os especialistas na arte apreciarão podem ser avaliados em um momento específico, de modo que, em algumas modalidades, a inibição pode ser ou compreender um atraso no início ou redução na frequência. Em algumas formas de realização, a inibição pode incluir, mas não está limitado a, ablação completa da atividade, resposta, condição, ou doença. Este pode também incluir, por exemplo uma redução de 10% na atividade, resposta, condição ou doença como comparado com o nativo nível ou controle. Assim, a redução pode ser 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100% ou qualquer quantidade de redução entre os níveis, em comparação com os níveis nativos ou de controle.

[071] Os oligonucleotídeos *antisense* (ASOs) foram projetados para atingir exons na *terminação 5'* do transcrito do gene hospedeiro SNORD115 (AF400500), que engloba os *snoRNAs* SNORD115-46, SNORD115-47, SNORD115-48 e SNORD109B e acredita-se que representam os *Terminação 5'* da transcrição antisense *UBE3A* (*UBE3A-AS*). Em particular, o ácido nucleico alvo pode ser

a terminação 5' de *UBE3A-AS*, correspondendo à posição 25.511,5 77 a 25.516, 681 no conjunto do genoma humano do cromossomo 15 humano hg19. Em algumas modalidades, o ácido nucleico alvo é um dos cinco exons localizados na terminação 5' de *UBE3A-AS*, que pode corresponder às posições 25.511, 577 a 25.511.761 (exon 1), 25.512.059 a 25.512.191 (exon 2), 25.513.476 a 25.513.600 (exon 3), 25.514.752 a 25.514.880 (exon 4) e 25.516.565 a 25, 516, 681 (exon 5).

[072] Portanto, em algumas formas de realização, o ácido nucleico alvo é ATGATGA TATGGAAGAAAAGCACTCTT TG GCCTGTTGTGACTGGGACA GTTGACAGCACCCAGGTGTCCCTTAATGA AA ATGCTCTGACACCAATGCATCC TAGCA TCACAGCTTCAGGAAGCCTCT CAAGTGTGCATGGGGAGTACTATGTC TTTCATCAATAATGAAATCTTC TGATTG (exon 1, SEQ ID NO: 1).

[073] Em algumas modalidades, o ácido nucleico alvo é TAAGACATGCTGCCAAGAGATGTGCCATTCTATTATAAAAAGATCAG TA GCTTCC TTTACCGACGTGTATATTCTATCTAGAACATTGAGCTATGGA AG ACTCCCACCT AAGGGAATTAGTTTACA 2 (Exon).

[074] Em algumas modalidades, o ácido nucleico alvo é ATAAAGACTGCTGAGAAGA G CACCCTCTGGTGTTCACAGAGGCAAGTGCTA CCGCAC A GGCATGCTGCAGTGAATTAACTGATCCT C TGTCCCTGCAACCGT TGTTAAGGATGCT ATTCT, NO.

[075] Em algumas modalidades, o ácido nucleico alvo é AAAAGACTGTGGAGGAAGAAACCCCTTACCTGTTGTCAGGGAGAAACTGA CA CCACTCAACTGCCTGGCACTGAAAATGTGGCATCCAGTCCACTTACCA TC AGTGTAAAGGAAACCATCTCTG (Exon 4).

[076] Em algumas modalidades, o ácido nucleico alvo é ATAAGGATGACTGAGGAAGA G TACTCTTGGCTTGTGACACCAGCACAGCTG ACACACCCAGATATCTGTTGGTCTCCTGTGAACCTTCAACCAGGATTAAAGGAT GC CACTCTG (Exon 5, SEQ ID).

[077] Em algumas modalidades, o ASO divulgado tem a sequência de ácidos nucleicos TAGAGGTGAAGGCCAGGCAC (ASO-1, SEQ ID NO: 6).

[078] Em algumas modalidades, o ASO tem a sequência de ácidos nucleicos GTACTCTCCTCAGTCATCC (ASO-2, SEQ ID NO: 7).

[079] Em algumas modalidades, o ASO divulgado tem a sequência de ácido nucleico TGTCAAGTTCTCCCTGAACA (ASO-3, SEQ ID NO: 8).

[080] Em algumas modalidades, o ASO divulgado tem a sequência de ácido nucleico TAGAATGGCACATCTCTTGG (ASO-4, SEQ ID NO: 9).

[081] Em algumas modalidades, o ASO divulgado tem a sequência de ácido nucleico GTTTCTTCCTCCACAGTCT (ASO-6, SEQ ID NO: 10).

Em algumas modalidades, o ASO divulgado tem a sequência de ácido nucleico CTGGTGTCAACAAGCCAAAG (ASO-7, SEQ ID NO: 11).

[082] ASOs adicionais que podem atingir o exon 1 da *terminação* 3' da região *SNORD115* são fornecidos abaixo na Tabela 1. Exemplos de ASOs que podem atingir o exon 2 da *terminação* 3' da *SNORD115* são fornecidos abaixo na Tabela 2. Exemplos de ASOs que pode atingir o exon 3 da *terminação* 3' do *SNORD115* são fornecidos abaixo na Tabela 3. Exemplos de ASOs que podem direcionar o exon 4 da *terminação* 3' do *SNORD115* são fornecidos abaixo na Tabela 4. Exemplos de ASOs que podem direcionar o exon 5 da *terminação* 3' do *SNORD115* são fornecidos abaixo na Tabela 5.

x

Tabela 1. ASOs do Exon 1	
Sequência alvo (5' → 3')	ASO (5' → 3')
GAAAAAUGCUCUUGACACC (SEQ ID NO: 12)	GGTGTCAAGAGCATTTC (SEQ ID NO: 15)
GAAAAAUGCUCUUGACACCA (SEQ ID NO: 13)	TGGTGTCAAGAGGCATTTC (SEQ ID NO: 16)
GAAAAAUGCUCUUGACACCAA (SEQ ID NO: 14)	TTGGTGTCAAGAGGCATTTC (SEQ ID NO: 17)

Tabela 2. ASOs do Exon 2	
Sequência alvo (5' → 3')	ASO (5' → 3')

CAUGCUGCCAAGAGAUGU (SEQ ID NO: 18)	ACATCTCTTGGCAGCATG (SEQ ID NO: 67)
CAUGCUGCCAAGAGAUGUG (SEQ ID NO: 19)	CACATCTCTTGGCAGCATG (SEQ ID NO: 68)
CAUGCUGCCAAGAGAUGUGC (SEQ ID NO: 20)	GCACATCTCTTGGCAGCATG (SEQ ID NO: 69)
AUGCUGCCAAGAGAUGUG (SEQ ID NO: 21)	CACATCTCTTGGCAGCAT (SEQ ID NO: 70)
AUGCUGCCAAGAGAUGUGC (SEQ ID NO: 22)	GCACATCTCTTGGCAGCAT (SEQ ID NO: 71)
AUGCUGCCAAGAGAUGUGCC (SEQ ID NO: 23)	GGCACATCTCTTGGCAGCAT (SEQ ID NO: 72)
UGCUGCCAAGAGAUGUGCC (SEQ ID NO: 24)	GGCACATCTCTTGGCAGCA (SEQ ID NO: 73)
UGCUGCCAAGAGAUGUGCCA (SEQ ID NO: 25)	TGGCACATCTCTTGGCAGCA (SEQ ID NO: 74)
GCUGCCAAGAGAUGUGCCA (SEQ ID NO: 26)	TGGCACATCTCTTGGCAGC (SEQ ID NO: 75)
GCUGCCAAGAGAUGUGCCAU (SEQ ID NO: 27)	ATGGCACATCTCTTGGCAGC (SEQ ID NO: 76)
CUGCCAAGAGAUGUGCCA (SEQ ID NO: 28)	TGGCACATCTCTTGGCAG (SEQ ID NO: 77)
CUGCCAAGAGAUGUGCCAU (SEQ ID NO: 29)	ATGGCACATCTCTTGGCAG (SEQ ID NO: 78)
CUGCCAAGAGAUGUGCCAUU (SEQ ID NO: 30)	AATGGCACATCTCTTGGCAG (SEQ ID NO: 79)
UGCCAAGAGAUGUGCCAU (SEQ ID NO: 31)	ATGGCACATCTCTTGGCA (SEQ ID NO: 80)
UGCCAAGAGAUGUGCCAUU (SEQ ID NO: 32)	AATGGCACATCTCTTGGCA (SEQ ID NO: 81)
UGCCAAGAGAUGUGCCAUC (SEQ ID NO: 33)	GAATGGCACATCTCTTGGCA (SEQ ID NO: 82)
GCCAAGAGAUGUGCCAUU (SEQ ID NO: 34)	AATGGCACATCTCTTGGC (SEQ ID NO: 83)
GCCAAGAGAUGUGCCAUCU (SEQ ID NO: 35)	GAATGGCACATCTCTTGGC (SEQ ID NO: 84)
GCCAAGAGAUGUGCCAUCU (SEQ ID NO: 36)	AGAATGGCACATCTCTTGGC (SEQ ID NO: 85)
CCAAGAGAUGUGCCAUCU (SEQ ID NO: 37)	GAATGGCACATCTCTTGG (SEQ ID NO: 86)
CCAAGAGAUGUGCCAUCU (SEQ ID NO: 38)	AGAATGGCACATCTCTTGG (SEQ ID NO: 87)
CCAAGAGAUGUGCCAUCUA (SEQ ID NO: 39)	TAGAATGGCACATCTCTTGG (SEQ ID NO: 88)
CAAGAGAUGUGCCAUCUC (SEQ ID NO: 40)	AGAATGGCACATCTCTTGG (SEQ ID NO: 89)

CAAGAGAUGUGCCAUCUA (SEQ ID NO: 41)	TAGAATGGCACATCTCTTG (SEQ ID NO: 90)
CAAGAGAUGUGCCAUCUAU (SEQ ID NO: 42)	ATAGAATGGCACATCTCTTG (SEQ ID NO: 91)
UCCUUUACCGACGUGUAU (SEQ ID NO: 43)	ATACACGTCGGTAAAGGA (SEQ ID NO: 92)
UCCUUUACCGACGUGUUA (SEQ ID NO: 44)	TATACACGTCGGTAAAGGA (SEQ ID NO: 93)
UCCUUUACCGACGUGUUAU (SEQ ID NO: 45)	ATATACACGTCGGTAAAGGA (SEQ ID NO: 94)
CCUUUACCGACGUGUUA (SEQ ID NO: 46)	TATACACGTCGGTAAAGG (SEQ ID NO: 95)
CCUUUACCGACGUGUUAU (SEQ ID NO: 47)	ATATACACGTCGGTAAAGG (SEQ ID NO: 96)
CCUUUACCGACGUGUUAUU (SEQ ID NO: 48)	AATATACACGTCGGTAAAGG (SEQ ID NO: 97)
ACCGACGUGUUAUUCUAUC (SEQ ID NO: 49)	GATAGAATATACACGTCGGT (SEQ ID NO: 98)
CCGACGUGUUAUUCUAUC (SEQ ID NO: 50)	GATAGAATATACACGTCGG (SEQ ID NO: 99)
CCGACGUGUUAUUCUAUCU (SEQ ID NO: 51)	AGATAGAATATACACGTCGG (SEQ ID NO: 100)
UCUAGAACAUUGAGCUAUGG (SEQ ID NO: 52)	CCATAGCTCAATGTTCTAGA (SEQ ID NO: 101)
CAUUGAGCUAUGGAAGAC (SEQ ID NO: 53)	GTCTTCCATAGCTCAATG (SEQ ID NO: 102)
CUAUGGAAGACUCCCACCUA (SEQ ID NO: 54)	TAGGTGGGAGTCTTCCATA (SEQ ID NO: 103)
UAUGGAAGACUCCCACCUA (SEQ ID NO: 55)	TAGGTGGGAGTCTTCCATA (SEQ ID NO: 104)
UAUGGAAGACUCCCACCUAA (SEQ ID NO: 56)	TTAGGTGGGAGTCTTCCATA (SEQ ID NO: 105)
AUGGAAGACUCCCACCUA (SEQ ID NO: 57)	TAGGTGGGAGTCTTCCAT (SEQ ID NO: 106)
AUGGAAGACUCCCACCUAA (SEQ ID NO: 58)	TTAGGTGGGAGTCTTCCAT (SEQ ID NO: 107)
UGGAAGACUCCCACCUAA (SEQ ID NO: 59)	TTAGGTGGGAGTCTTCCA (SEQ ID NO: 108)
GACUCCCACCUAAGGGAAUU (SEQ ID NO: 60)	AATTCCCTTAGGTGGAGTC (SEQ ID NO: 109)
ACUCCCACCUAAGGGAAU (SEQ ID NO: 61)	ATTCCCTTAGGTGGAGT (SEQ ID NO: 110)
ACUCCCACCUAAGGGAAUU (SEQ ID NO: 62)	AATTCCCTTAGGTGGAGT (SEQ ID NO: 111)
ACUCCCACCUAAGGGAAUUA (SEQ ID NO: 63)	TAATTCCCTTAGGTGGAGT (SEQ ID NO: 112)

CUCCCACCUAAGGGAAUU (SEQ ID NO: 64)	ID	AATTCCCTTAGGTGGGAG (SEQ ID NO: 113)	ID
CUCCCACCUAAGGGAAUUA (SEQ ID NO: 65)	ID	TAATTCCCTTAGGTGGGAG (SEQ ID NO: 114)	
UCCCACCUAAGGGAAUUA (SEQ ID NO: 66)	ID	TAATTCCCTTAGGTGGGA (SEQ ID NO: 115)	

Tabela 3. ASOs do Exon 3

Sequência alvo (5' → 3')	ASO (5' → 3')
GAUAAAGACUGCUGAGAAGA (SEQ ID NO: 116)	TCTTCTCAGCAGTCTTATC (SEQ ID NO: 139)
AUAAAGACUGCUGAGAAGAG (SEQ ID NO: 117)	CTCTTCTCAGCAGTCTTAT (SEQ ID NO: 140)
UAAAGACUGCUGAGAAGAGC (SEQ ID NO: 118)	GCTCTTCTCAGCAGTCTTA (SEQ ID NO: 141)
AAAGACUGCUGAGAAGAGCA (SEQ ID NO: 119)	TGCTCTTCTCAGCAGTCTT (SEQ ID NO: 142)
AAGACUGCUGAGAAGAGCAC (SEQ ID NO: 120)	GTGCTCTTCTCAGCAGTCTT (SEQ ID NO: 143)
AGACUGCUGAGAAGAGCACC (SEQ ID NO: 121)	GGTGCTCTTCTCAGCAGTCT (SEQ ID NO: 144)
GACUGCUGAGAAGAGCACCC (SEQ ID NO: 122)	GGGTGCTCTTCTCAGCAGTC (SEQ ID NO: 145)
CAAGUGCUACCGCACAGGCA (SEQ ID NO: 123)	TGCCTGTGCGGTAGCACTT (SEQ ID NO: 146)
AAGUGCUACCGCACAGGCAU (SEQ ID NO: 124)	ATGCCTGTGCGGTAGCACTT (SEQ ID NO: 147)
AGUGCUACCGCACAGGCAUG (SEQ ID NO: 125)	CATGCCTGTGCGGTAGCACT (SEQ ID NO: 148)
UGCUACCGCACAGGCAUGC (SEQ ID NO: 126)	AGCATGCCTGTGCGGTAGCA (SEQ ID NO: 149)
UACCGCACAGGCAUGCUGCA (SEQ ID NO: 127)	TGCAGCATGCCTGTGCGGTA (SEQ ID NO: 150)
GCACAGGCAUGCUGCAGUGA (SEQ ID NO: 128)	TCACTGCAGCATGCCTGTG (SEQ ID NO: 151)
CACAGGCAUGCUGCAGUGAA (SEQ ID NO: 129)	TTCACTGCAGCATGCCTGTG (SEQ ID NO: 152)
ACAGGCAUGCUGCAGUGAAU (SEQ ID NO: 130)	ATTCACTGCAGCATGCCTGT (SEQ ID NO: 153)
CAGGCAUGCUGCAGUGAAUU (SEQ ID NO: 131)	AATTCACTGCAGCATGCCTG (SEQ ID NO: 154)
AGGCAUGCUGCAGUGAAUUU (SEQ ID NO: 132)	AAATTCACTGCAGCATGCCT (SEQ ID NO: 155)
GGCAUGCUGCAGUGAAUUUA (SEQ ID NO: 133)	TAAATTCACTGCAGCATGCC (SEQ ID NO: 156)

GCAUGCUGCAGUGAAUUUAA (SEQ ID NO: 134)	TTAAATTCACTGCAGCATGC (SEQ ID NO: 157)
CAUGCUGCAGUGAAUUUAAAC (SEQ ID NO: 135)	GTAAATTCACTGCAGCATG (SEQ ID NO: 158)
GCAGUGAAUUUAACUGAUCC (SEQ ID NO: 136)	GGATCAGTTAACATTCACTGC (SEQ ID NO: 159)
UCCCUGCAACCGUUGUUUAA (SEQ ID NO: 137)	TTAAACAAACGGTTGCAGGG (SEQ ID NO: 160)
CCCUGCAACCGUUGUUUAAAG (SEQ ID NO: 138)	CTTAAACAAACGGTTGCAGGG (SEQ ID NO: 161)

Tabela 4. ASOs do Exon 4

Sequência alvo (5' → 3')	ASO (5' → 3')
AAAAGACUGUGGAGGAAGA (SEQ ID NO: 162)	TCTTCCTCCACAGTCTTT (SEQ ID NO: 237)
AAAAGACUGUGGAGGAAGAA (SEQ ID NO: 163)	TTCTTCCTCCACAGTCTTT (SEQ ID NO: 238)
AAAGACUGUGGAGGAAGAA (SEQ ID NO: 164)	TTCTTCCTCCACAGTCTTT (SEQ ID NO: 239)
AAAGACUGUGGAGGAAGAAA (SEQ ID NO: 165)	TTTCTTCCTCCACAGTCTTT (SEQ ID NO: 240)
AAGACUGUGGAGGAAGAAAA (SEQ ID NO: 166)	TTTCTTCCTCCACAGTCTT (SEQ ID NO: 241)
AGACUGUGGAGGAAGAAAAC (SEQ ID NO: 167)	GTTCCTTCCTCCACAGTCT (SEQ ID NO: 242)
ACUGUGGAGGAAGAAAAC (SEQ ID NO: 168)	GTTCCTTCCTCCACAGT (SEQ ID NO: 243)
ACUGUGGAGGAAGAAAACC (SEQ ID NO: 169)	GGTTTCCTTCCTCCACAGT (SEQ ID NO: 244)
ACUGUGGAGGAAGAAAACCC (SEQ ID NO: 170)	GGGTTTCCTTCCTCCACAGT (SEQ ID NO: 245)
CUGUGGAGGAAGAAAACC (SEQ ID NO: 171)	GGTTTCCTTCCTCCACAG (SEQ ID NO: 246)
CUGUGGAGGAAGAAAACCC (SEQ ID NO: 172)	GGGTTTCCTTCCTCCACAG (SEQ ID NO: 247)
AAAACCCUUUACCCUGUUG (SEQ ID NO: 173)	CAACAGGGTAAAGGGTTTT (SEQ ID NO: 248)
AAAACCCUUUACCCUGUUGU (SEQ ID NO: 174)	ACAACAGGGTAAAGGGTTTT (SEQ ID NO: 249)
AAACCCUUUACCCUGUUGU (SEQ ID NO: 175)	AACAACAGGGTAAAGGGTTT (SEQ ID NO: 250)
UUGUUCAGGGAGAACUG (SEQ ID NO: 176)	CAGTTCTCCCTGAACAA (SEQ ID NO: 251)
UUGUUCAGGGAGAACUGAC (SEQ ID NO: 177)	GTCAGTTCTCCCTGAACAA (SEQ ID NO: 252)

UGUUCAGGGAGAAACUGA (SEQ ID NO: 178)	TCAGTTCTCCCTGAACA (SEQ ID NO: 253)
UGUUCAGGGAGAAACUGAC (SEQ ID NO: 179)	GTCAGTTCTCCCTGAACA (SEQ ID NO: 254)
UGUUCAGGGAGAAACUGACA (SEQ ID NO: 180)	TGTCAGTTCTCCCTGAACA (SEQ ID NO: 255)
GUUCAGGGAGAAACUGACA (SEQ ID NO: 181)	TGTCAGTTCTCCCTGAAC (SEQ ID NO: 256)
UCAGGGAGAAACUGACACCA (SEQ ID NO: 182)	TGGTGTCAAGTTCTCCCTGA (SEQ ID NO: 257)
CAGGGAGAAACUGACACCA (SEQ ID NO: 183)	TGGTGTCAAGTTCTCCCTG (SEQ ID NO: 258)
AGGGAGAAACUGACACCA (SEQ ID NO: 184)	TGGTGTCAAGTTCTCCCT (SEQ ID NO: 259)
AGGGAGAAACUGACACCA (SEQ ID NO: 185)	GTGGTGTCAAGTTCTCCCT (SEQ ID NO: 260)
AGGGAGAAACUGACACCACU (SEQ ID NO: 186)	AGTGGTGTCAAGTTCTCCCT (SEQ ID NO: 261)
GGGAGAAACUGACACCAC (SEQ ID NO: 187)	GTGGTGTCAAGTTCTCCC (SEQ ID NO: 262)
GGGAGAAACUGACACCACU (SEQ ID NO: 188)	AGTGGTGTCAAGTTCTCCC (SEQ ID NO: 263)
GGGAGAAACUGACACCACUC (SEQ ID NO: 189)	GAGTGGTGTCAAGTTCTCCC (SEQ ID NO: 264)
GGAGAAACUGACACCACU (SEQ ID NO: 190)	AGTGGTGTCAAGTTCTCC (SEQ ID NO: 265)
GGAGAAACUGACACCACUC (SEQ ID NO: 191)	GAGTGGTGTCAAGTTCTCC (SEQ ID NO: 266)
GGAGAAACUGACACCACUCA (SEQ ID NO: 192)	TGAGTGGTGTCAAGTTCTCC (SEQ ID NO: 267)
GAGAAACUGACACCACUC (SEQ ID NO: 193)	GAGTGGTGTCAAGTTCTC (SEQ ID NO: 268)
GAGAAACUGACACCACUCA (SEQ ID NO: 194)	TGAGTGGTGTCAAGTTCTC (SEQ ID NO: 269)
GAGAAACUGACACCACUCAA (SEQ ID NO: 195)	TTGAGTGGTGTCAAGTTCTC (SEQ ID NO: 270)
AGAACUGACACCACUCA (SEQ ID NO: 196)	TGAGTGGTGTCAAGTTCT (SEQ ID NO: 271)
AGAACUGACACCACUCAA (SEQ ID NO: 197)	TTGAGTGGTGTCAAGTTCT (SEQ ID NO: 272)
AGAACUGACACCACUCAAC (SEQ ID NO: 198)	GTTGAGTGGTGTCAAGTTCT (SEQ ID NO: 273)
GAAACUGACACCACUCAA (SEQ ID NO: 199)	TTGAGTGGTGTCAAGTTTC (SEQ ID NO: 274)
GAAACUGACACCACUCAAC (SEQ ID NO: 200)	GTTGAGTGGTGTCAAGTTTC (SEQ ID NO: 275)

GAAACUGACACCACUCAACU (SEQ ID NO: 201)	AGTTGAGTGGTGTCAAGTTTC (SEQ ID NO: 276)
AAACUGACACCACUCAAC (SEQ ID NO: 202)	GTTGAGTGGTGTCAAGTTT (SEQ ID NO: 277)
AAACUGACACCACUCAACU (SEQ ID NO: 203)	AGTTGAGTGGTGTCAAGTTT (SEQ ID NO: 278)
AAACUGACACCACUCAACUG (SEQ ID NO: 204)	CAGTTGAGTGGTGTCAAGTTT (SEQ ID NO: 279)
AACUGACACCACUCAACU (SEQ ID NO: 205)	AGTTGAGTGGTGTCAAGTT (SEQ ID NO: 280)
AACUGACACCACUCAACUG (SEQ ID NO: 206)	CAGTTGAGTGGTGTCAAGTT (SEQ ID NO: 281)
AACUGACACCACUCAACUGC (SEQ ID NO: 207)	GCAGTTGAGTGGTGTCAAGTT (SEQ ID NO: 282)
ACUGACACCACUCAACUG (SEQ ID NO: 208)	CAGTTGAGTGGTGTCAAGT (SEQ ID NO: 283)
ACUGACACCACUCAACUGC (SEQ ID NO: 209)	GCAGTTGAGTGGTGTCAAGT (SEQ ID NO: 284)
ACUGACACCACUCAACUGCC (SEQ ID NO: 210)	GGCAGTTGAGTGGTGTCAAGT (SEQ ID NO: 285)
CUGACACCACUCAACUGC (SEQ ID NO: 211)	GCAGTTGAGTGGTGTCAAG (SEQ ID NO: 286)
CUGACACCACUCAACUGCC (SEQ ID NO: 212)	GGCAGTTGAGTGGTGTCAAG (SEQ ID NO: 287)
CUGACACCACUCAACUGCCU (SEQ ID NO: 213)	AGGCAGTTGAGTGGTGTCAAG (SEQ ID NO: 288)
UGACACCACUCAACUGCC (SEQ ID NO: 214)	GGCAGTTGAGTGGTGTCAAG (SEQ ID NO: 289)
UGACACCACUCAACUGCCU (SEQ ID NO: 215)	AGGCAGTTGAGTGGTGTCAAG (SEQ ID NO: 290)
UGACACCACUCAACUGCCUG (SEQ ID NO: 216)	CAGGCAGTTGAGTGGTGTCAAG (SEQ ID NO: 291)
GACACCACUCAACUGCCU (SEQ ID NO: 217)	AGGCAGTTGAGTGGTGTCAAG (SEQ ID NO: 292)
GACACCACUCAACUGCCUG (SEQ ID NO: 218)	CAGGCAGTTGAGTGGTGTCAAG (SEQ ID NO: 293)
GACACCACUCAACUGCCUGG (SEQ ID NO: 219)	CCAGGCAGTTGAGTGGTGTCAAG (SEQ ID NO: 294)
ACACCACUCAACUGCCUG (SEQ ID NO: 220)	CAGGCAGTTGAGTGGTGTCAAG (SEQ ID NO: 295)
ACACCACUCAACUGCCUGG (SEQ ID NO: 221)	CCAGGCAGTTGAGTGGTGTCAAG (SEQ ID NO: 296)
ACACCACUCAACUGCCUGGC (SEQ ID NO: 222)	GCCAGGCAGTTGAGTGGTGTCAAG (SEQ ID NO: 297)
CACCACUCAACUGCCUGGCA (SEQ ID NO: 223)	TGCCAGGCAGTTGAGTGGTGTCAAG (SEQ ID NO: 298)

GAAAAUGUGGCAUCCAGU (SEQ NO: 224)	ID	ACTGGATGCCACATTTTC (SEQ NO: 299)	ID
AAAAUGUGGCAUCCAGUC (SEQ NO: 225)	ID	GACTGGATGCCACATTTT (SEQ NO: 300)	ID
GCAUCCAGUCCACUUUACCA (SEQ ID NO: 226)		TGGTAAAGTGGACTGGATGC (SEQ ID NO: 301)	
CAUCCAGUCCACUUUACC (SEQ NO: 227)	ID	GGTAAAGTGGACTGGATG (SEQ ID NO: 302)	ID
CAUCCAGUCCACUUUACCA (SEQ NO: 228)	ID	TGGTAAAGTGGACTGGATG (SEQ ID NO: 303)	ID
CAUCCAGUCCACUUUACCAU (SEQ ID NO: 229)		ATGGTAAAGTGGACTGGATG (SEQ ID NO: 304)	
AUCCAGUCCACUUUACCA (SEQ NO: 230)	ID	TGGTAAAGTGGACTGGAT (SEQ ID NO: 305)	ID
AUCCAGUCCACUUUACCAU (SEQ ID NO: 231)		ATGGTAAAGTGGACTGGAT (SEQ ID NO: 306)	
AUCCAGUCCACUUUACCAUC (SEQ ID NO: 232)		GATGGTAAAGTGGACTGGAT (SEQ ID NO: 307)	
GUUUAGGAAACCAUCUCUG (SEQ ID NO: 233)		CAGAGATGGTTCCCTAAC (SEQ ID NO: 308)	
UUUAGGAAACCAUCUCUGG (SEQ ID NO: 234)		CCAGAGATGGTTCCCTAAA (SEQ ID NO: 309)	
UUAAGGAAACCAUCUCUGG (SEQ ID NO: 235)		CCAGAGATGGTTCCCTAA (SEQ ID NO: 310)	
UAAGGAAACCAUCUCUGG (SEQ ID NO: 236)		CCAGAGATGGTTCCCTTA (SEQ ID NO: 311)	

Tabela 5. ASOs do Exon 5

Sequência alvo (5' → 3')		ASO (5' → 3')	
AUAAGGAUGACUGAGGAAG (SEQ NO: 312)	ID	CTTCCTCAGTCATCCTTAT (SEQ ID NO: 335)	
AUAAGGAUGACUGAGGAAGA (SEQ ID NO: 313)		TCTTCCTCAGTCATCCTTAT (SEQ ID NO: 336)	
UAAGGAUGACUGAGGAAG (SEQ ID NO: 314)		CTTCCTCAGTCATCCTTA (SEQ ID NO: 337)	
UAAGGAUGACUGAGGAAGA (SEQ ID NO: 315)		TCTTCCTCAGTCATCCTTA (SEQ ID NO: 338)	
UAAGGAUGACUGAGGAAGAG (SEQ ID NO: 316)		CTCTTCCTCAGTCATCCTTA (SEQ ID NO: 339)	
AAGGAUGACUGAGGAAGA (SEQ ID NO: 317)		TCTTCCTCAGTCATCCTT (SEQ ID NO: 340)	
AAGGAUGACUGAGGAAGAG (SEQ ID NO: 318)		CTCTTCCTCAGTCATCCTT (SEQ ID NO: 341)	
AAGGAUGACUGAGGAAGAGU (SEQ ID NO: 319)		ACTCTTCCTCAGTCATCCTT (SEQ ID NO: 342)	

AGGAUGACUGAGGAAGAG (SEQ ID NO: 320)	CTCTTCCTCAGTCATCCT (SEQ ID NO: 343)
AGGAUGACUGAGGAAGAGU (SEQ ID NO: 321)	ACTCTTCCTCAGTCATCCT (SEQ ID NO: 344)
AGGAUGACUGAGGAAGAGUA (SEQ ID NO: 322)	TACTCTTCCTCAGTCATCCT (SEQ ID NO: 345)
GGAUGACUGAGGAAGAGU (SEQ ID NO: 323)	ACTCTTCCTCAGTCATCC (SEQ ID NO: 346)
GGAUGACUGAGGAAGAGUA (SEQ ID NO: 324)	TACTCTTCCTCAGTCATCC (SEQ ID NO: 347)
GGAUGACUGAGGAAGAGUAC (SEQ ID NO: 325)	GTACTCTTCCTCAGTCATCC (SEQ ID NO: 348)
GAUGACUGAGGAAGAGUA (SEQ ID NO: 326)	TACTCTTCCTCAGTCATC (SEQ ID NO: 349)
GAUGACUGAGGAAGAGUAC (SEQ ID NO: 327)	GTACTCTTCCTCAGTCATC (SEQ ID NO: 350)
GAUGACUGAGGAAGAGUACU (SEQ ID NO: 328)	AGTACTCTTCCTCAGTCATC (SEQ ID NO: 351)
AUGACUGAGGAAGAGUAC (SEQ ID NO: 329)	GTACTCTTCCTCAGTCAT (SEQ ID NO: 352)
AUGACUGAGGAAGAGUACU (SEQ ID NO: 330)	AGTACTCTTCCTCAGTCAT (SEQ ID NO: 353)
AUGACUGAGGAAGAGUACUC (SEQ ID NO: 331)	GAGTACTCTTCCTCAGTCAT (SEQ ID NO: 354)
UGACUGAGGAAGAGUACU (SEQ ID NO: 332)	AGTACTCTTCCTCAGTCA (SEQ ID NO: 355)
UGACUGAGGAAGAGUACUC (SEQ ID NO: 333)	GAGTACTCTTCCTCAGTCA (SEQ ID NO: 356)
UGACUGAGGAAGAGUACUCU (SEQ ID NO: 334)	AGAGTACTCTTCCTCAGTCA (SEQ ID NO: 357)

[083] O oligonucleotídeo divulgado é capaz de modular a expressão de *UBE3A* paterno, em particular indução ou regulação positiva de *UBE3A* expresso paternamente em células neuronais. A modulação é conseguida hibridando com a *terminação 5'* de *UBE3A-AS*. Em certas modalidades, o oligonucleotídeo aqui divulgado hibrida com uma sub-sequência do ácido nucleico alvo da SEQ ID NO: 1 com um ΔG° abaixo de -10 kcal, como com um ΔG° entre -10 a -60 kcal, como -12 a -40, como de -15 a -30 kcal ou -16 a -27 kcal, como -18 a -25 kcal.

[084] Em algumas modalidades, os oligonucleotídeos divulgados são capazes de aumentar a expressão de *UBE3A* em pelo menos 20% em comparação com o nível

de expressão de *UBE3A* em uma célula neuronal tratada com solução salina ou um oligonucleotídeo não direcionado, mais preferencialmente em pelo menos 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 80%, 100%, 120%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 210%, 210%, 220%, 230%, 240% ou 250% em comparação com o nível de expressão de *UBE3A* em uma célula neuronal tratada com solução salina ou um oligonucleotídeo não alvo. Em algumas modalidades, os oligonucleotídeos divulgados são capazes de diminuir o nível do transcrito *SNHG14* a jusante de *SNORD115-45* em pelo menos 20% em comparação com o nível do transcrito *SNHG14* a jusante de *SNORD115-45* em uma célula neuronal tratada com solução salina ou não - direcionar o oligonucleotídeo, mais preferencialmente em pelo menos 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ou 95% em comparação com o nível do transcrito *SNHG14* a jusante do *SNORD115-45* em uma célula neuronal tratada com solução salina ou um oligonucleotídeo não direcionado.

[085] A modulação do alvo pelo oligonucleotídeo divulgado é desencadeada por hibridação entre uma sequência nucleotídica contígua do oligonucleotídeo e o ácido nucleico alvo. Em algumas modalidades, o oligonucleotídeo divulgado compreende incompatibilidades entre o oligonucleotídeo e o ácido nucleico alvo. Apesar das incompatibilidades, a hibridação com o ácido nucleico alvo ainda pode ser suficiente para mostrar uma modulação desejada da expressão de *UBE3A*. A afinidade de ligação reduzida resultante de incompatibilidades pode ser vantajosamente compensada pelo aumento do número de nucleotídeos no oligonucleotídeo e / ou um número aumentado de nucleosídeos modificados capazes de aumentar a afinidade de ligação ao alvo, como nucleosídeos modificados de 2', incluindo LNA, presentes no sequência oligonucleotídica.

[086] O oligonucleotídeo *antisense* divulgado pode ter uma sequência nucleotídica contígua de 10 a 30 nucleotídeos de comprimento com pelo menos 90% de complementação, como pelo menos 91%, como pelo menos 92%, como pelo

menos 92%, como pelo menos 93%, como pelo menos 94 %, como pelo menos 95%, como pelo menos 96%, como pelo menos 97%, como pelo menos 98% ou complementaridade de 100% de um dos cinco exons localizados na *terminação 5'* de *UBE3A-AS* aqui divulgado.

[087] Oligonucleotídeo desenho se refere para o padrão de nucleosídeos de açúcar modificações na sequência de oligonucleotídeos. O oligonucleotídeo *antisense* divulgado compreende nucleosídeos modificados por açúcar e também pode compreender DNA, RNA ou nucleosídeos de ácido nucleico arabinô (ANA). Em algumas modalidades, o oligonucleotídeo compreende nucleosídeos modificados por açúcar e nucleosídeos de DNA. Em algumas modalidades, o oligonucleotídeo compreende nucleosídeos modificados por açúcar e nucleosídeos de RNA. Em algumas modalidades, o oligonucleotídeo compreende nucleosídeos modificados por açúcar e nucleosídeos ANA.

[088] Em algumas modalidades s, o oligonucleotídeo compreende pelo menos 1 nucleosídeo modificado, como pelo menos 2, pelo menos 3, pelo menos 4, pelo menos 5, pelo menos 6, pelo menos 7, pelo menos 8, pelo menos 9, pelo menos 10, pelo menos 11, pelo menos 12, pelo menos 13, pelo menos 14, pelo menos 15 ou pelo menos 16 nucleosídeos modificados. Em uma modalidade, o oligonucleotídeo compreende de 1 a 10 nucleosídeos modificados, como de 2 a 9 nucleosídeos modificados, como de 3 a 8 nucleosídeos modificados, como de 4 a 7 nucleosídeos modificados, como 6 ou 7 nucleosídeos modificados.

[089] Em algumas modalidades, o oligonucleotídeo compreende pelo menos uma ligação internucleosídeo modificada. Em algumas modalidades, as ligações internucleosídeos dentro da sequência nucleotídica contígua são ligações internucleosídeos fosforotioato ou boranofosfato.

[090] Em algumas modalidades, o oligonucleotídeo *antisense* divulgado compreende um ou mais nucleosídeos modificados por açúcar, tais como

nucleosídeos 2' modificados por açúcar. Preferencialmente, os oligonucleotídeos *antisense* divulgados compreendem um ou mais nucleosídeos LNA ou nucleosídeo modificado com açúcar 2', em que a posição 2' é substituída por um substituinte selecionado independentemente do grupo que consiste em -F; -CF₃, -CN, -N₃, -NO, -NO₂, -O- (C₁-C₁₀ alquila), -S- (C₁-C₁₀ alquila), -NH- (C₁-C₁₀ alquila), ou -N (C₁-C₁₀ alquila)₂; -O- (C₂-C₁₀ alcenila), -S- (C₂-C₁₀ alcenila), -NH (C₂-C₁₀ alcenila), ou -N (C₂-C₁₀ alcenila)₂; -O- (C₂-C₁₀ alcinila), -S- (C₂-C₁₀ alcinila), -NH (C₂-C₁₀ alcinila), -N (C₂-C₁₀ alcinila)₂, -O- (C₁-C₁₀ alquileno) -O- (C₁-C₁₀ alquila), -O- (C₁-C₁₀ alquileno) -NH- (C₁-C₁₀ alquila), -O- (C₁-C₁₀ alquileno) -NH (C₁-C₁₀ alquila)₂, -NH- (C₁-C₁₀ alquileno) -O- (C₁-C₁₀ alquila), e -N (C₁-C₁₀ alquila) - (C₁-C₁₀ alquileno) -O- (C₁-C₁₀ alquila).

[091] Em algumas modalidades, o oligonucleotídeo divulgado compreende pelo menos uma unidade de LNA, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8 de Unidades LNA, tal como de 2 a 6 Unidades LNA, tal como de 3 a 7 Unidades LNA, 4 a 8 unidades LNA ou 3, 4, 5, 6 ou 7 unidades LNA. Em algumas modalidades, todos os nucleosídeos modificados são nucleosídeos de LNA. Em algumas modalidades, compreende um LNA 2'-4' bi-radical ponte de -L-, em que -L- é -O-CH₂-, em que -CH₂- é opcionalmente substituído. Em algumas modalidades, compreende um LNA 2'-4' bi-radical ponte de -L-, em que -L- é -O-CH₂-. Em algumas modalidades, o LNA compreende uma ponte biradical 2'-4' de -L-, em que -L- é -O-CH (Et)-. Numa outra modalidade, o oligonucleotídeo pode compreender tanto beta-D-oxi-LNA, e um ou mais das seguintes unidades de LNA: tio-LNA, amino-LNA, oxi-LNA, e / ou ENA quer na beta-D configurações alfa-L ou combinações das mesmas. Em uma modalidade adicional, todas as unidades de citosina LNA são 5-metil-citosina. Em algumas modalidades, a sequência oligonucleotídica ou nucleotídica contígua tem pelo menos 1 unidade LNA na terminação 5'e pelo menos 2 unidades LNA na terminação 3' da sequência nucleotídica.

[092] Em algumas modalidades, o oligonucleotídeo divulgado é capaz de recrutar RNase H. Em algumas modalidades s, o oligonucleotídeo tem um design ou estrutura mais *gapmer*, também aqui referido apenas como "Gapmer". Numa estrutura *gapmer*, o oligonucleotídeo compreende pelo menos três regiões estruturais distintas, um terminal 5', um gap e um terminal 3', FGF' na orientação' 5' -> 3'. Nesse projeto, as regiões flanqueadoras F e F' (também denominadas regiões de asa) compreendem um trecho contíguo de nucleosídeos modificados, que são complementares ao ácido nucleico alvo *UBE3A-AS*, enquanto a região *gap*, G, compreende um trecho contíguo de nucleotídeos que são capazes de recrutar uma nuclease, preferencialmente uma endonuclease como RNase, por exemplo, RNase H, quando o oligonucleotídeo está em duplex com o ácido nucleico alvo. Os nucleosídeos que são capazes de recrutar uma nuclease, em particular a RNase H, podem ser selecionados do grupo que consiste em DNA, alfa-L-oxi-LNA, 2'-Fluoro-ANA e UNA. As regiões F e F', flanqueando as terminações 5' e 3'da região G, compreendem preferencialmente nucleosídeos de recrutamento de não nucleases (nucleosídeos com uma estrutura de 3' endo), mas preferencialmente um ou mais nucleosídeos modificados que aumentam a afinidade. Em algumas modalidades, o terminal 3' compreende pelo menos um nucleosídeo LNA, preferencialmente pelo menos 2 nucleosídeos LNA. Em algumas modalidades, o terminal 5' compreende pelo menos um nucleosídeo LNA. Em algumas modalidades, as regiões de flanqueamento 5' e 3' compreendem um nucleosídeo LNA. Em algumas modalidades, todos os nucleosídeos nas regiões de flanqueamento são nucleosídeos de LNA. Em outras modalidades, as regiões de flanqueamento podem compreender tanto nucleosídeos de LNA quanto outros nucleosídeos (terminais mistos), como nucleosídeos de DNA e / ou nucleosídeos não modificados por LNA, como nucleosídeos substituídos em 2'. Nesse caso, a lacuna é definida como uma sequência contígua de pelo menos 5 nucleosídeos de recrutamento de RNase H (nucleosídeos com uma estrutura de 2',

preferencialmente DNA) flanqueados nas terminações 5' e 3' por um nucleosídeo modificado para melhorar a afinidade, preferencialmente LNA, tais como beta-D-oxi-LNA. Consequentemente, os nucleosídeos da região flanqueadora 5' e a região flanqueadora 3' que são adjacentes à região gap são nucleosídeos modificados, preferencialmente nucleosídeos que não recrutam nucleases. Nos oligonucleotídeos com terminais mistos, onde os terminais compreendem DNA, os nucleosídeos 5' e 3' são nucleosídeos modificados.

[093]Métodos para fabricar os oligonucleotídeos divulgados são conhecidos. Em alguns casos, o método utiliza a química da forforamidita (ver, por exemplo, Caruthers et al., 1987, *Methods in Enzymology* vol. 154, páginas 287-313). Numa outra modalidade, o método compreende ainda a reação da sequência nucleotídica contígua com uma fração de conjugação (ligando).

[094]Em algumas modalidades, são utilizadas metodologias de síntese de oligonucleotídeos que fornecem controle da estereoquímica em uma ou mais ligações internucleosídeos modificadas que incluem um átomo quiral. Ver, por exemplo, WO2010 / 064146, WO2014 / 012081, WO2015 / 107425, WO2016 / 079183, WO2016 / 079181, WO2016 / 096938, WO2017 / 194498 e WO2018 / 177825, que são incorporados por referência para essas metodologias.

[095]Os técnicos no assunto apreciarão que os ácidos nucleicos úteis fornecidos pela presente divulgação incluem aqueles que armazenam e / ou expressam sequências de oligonucleotídeos aqui descritos. Em algumas modalidades, esses ácidos nucleicos podem ser ou compreender vetores apropriados para entrega e / ou replicação e / ou expressão em uma célula (por exemplo, uma célula microbiana, por exemplo, para produção e / ou uma célula de mamífero, por exemplo, para tratamento). Os técnicos no assunto estão cientes de uma variedade de tecnologias (por exemplo, tecnologias de ácido nucleico recombinante, como, por exemplo, que utilizam uma ou mais de amplificação, como por reação em cadeia da

polimerase, clivagem como digestão por restrição, ligação como por ligação - seja *in vitro* ou *in vivo*, por exemplo, por reparo de *gap*, etc.).

[096] Também são divulgadas composições farmacêuticas compreendendo qualquer um dos oligonucleotídeos e / ou conjugados de oligonucleotídeos acima mencionados e um diluente, veículo, sal e / ou adjuvante farmaceuticamente aceitável. Um diluente farmaceuticamente aceitável inclui solução salina tamponada com fosfato (PBS) e sais farmaceuticamente aceitáveis incluem, mas não estão limitados a, sais de sódio e potássio. Em algumas modalidades, o diluente é um líquido cefalorraquidiano artificial (aCSF).

[097] Os oligonucleotídeos divulgados podem ser misturados com substâncias ativas ou inertes farmaceuticamente aceitáveis para a preparação de composições ou formulações farmacêuticas. As composições e métodos para a formulação de composições farmacêuticas dependem de vários critérios, incluindo, entre outros, via de administração, extensão da doença ou dose a ser administrada.

[098] Os técnicos no assunto estão cientes de uma variedade de estratégias de formulação úteis para armazenamento e / ou administração de terapêuticas de ácidos nucleicos, tais como terapêuticas de oligonucleotídeos. Veja, por exemplo, Pushpendra et al. "Nucleic Acids as Therapeutics" em *From Nucleic Acid Sequences to Molecular Medicines*, ed. Erdmann e Barciszewski, Springer-Verlag, 2012; Juliano "A Entrega de Oligonucleotídeos Terapêuticos" *Nuc. Ácidos. Res.* 44: 6518, 2016; etc.

[099] Em algumas modalidades, o oligonucleotídeo é formulado na forma de um pró-fármaco. Em particular no que diz respeito a conjugados de oligonucleotídeos, a porção de conjugado pode ser clivada de f o oligonucleotídeo uma vez que a pró-droga é entregue no local de ação, por exemplo, a célula-alvo.

[0100] Também são divulgados métodos para tratamento ou prevenção de uma doença, compreendendo a administração de uma quantidade

terapeuticamente ou profilaticamente eficaz de um oligonucleotídeo, um conjugado de oligonucleotídeo ou uma composição farmacêutica aqui divulgada a um sujeito que sofre ou é suscetível à doença.

[0101] Também é divulgada a utilização dos oligonucleotídeos divulgados para a fabricação de um medicamento para o tratamento de um distúrbio como aqui referido, ou para um método de tratamento de um distúrbio como aqui referido.

[0102] As composições farmacêuticas divulgadas podem ser administradas por via tópica (como na pele, inalação, oftalmologia ou ótica) ou enteral (como oralmente ou através do trato gastrointestinal) ou parenteral (como intravenosa, subcutânea, intramuscular, intracerebral, intracerebroventricular ou intratecal) administração. Em algumas modalidades, as composições farmacêuticas divulgadas são administradas por uma via parenteral, incluindo injeção intravenosa, intra-arterial, subcutânea, intraperitoneal ou intramuscular ou infusão, intratecal ou intracraniana, por exemplo, administração intracerebral ou intraventricular. Em algumas modalidades, o oligonucleotídeo é administrado por injeção intracerebral ou intracerebroventricular. Noutra modalidade, o oligonucleotídeo ativo ou o conjugado de oligonucleotídeo é administrado intratecalmente. Em algumas modalidades, a composição farmacêutica é administrada por injeção intracisterna magna.

[0103] Em algumas modalidades, a terapia de EA com composições farmacêuticas aqui descritas é administrada a indivíduos que sofrem ou são suscetíveis a EA. Em algumas modalidades, um indivíduo foi determinado como tendo uma característica genética associada a um defeito em um gene *UBE3A* materno. Em algumas modalidades, uma característica genética associada ao AS é ou compreende uma exclusão materna. Em algumas modalidades, uma característica genética associada ao AS é ou compreende disomia uniparental. Em algumas modalidades, uma característica genética associada ao AS é ou compreende

uma mutação *UBE3A*. Em algumas modalidades, uma característica genética associada ao AS é ou compreende um defeito de impressão.

[0104] Em algumas modalidades, um indivíduo foi determinado como tendo uma ou mais histórico de desenvolvimento e / ou características de descoberta laboratorial que foram associadas ao EA, como, por exemplo, um ou mais de:

- (i) história normal de pré-natal e nascimento com perímetro céfálico normal e ausência de defeitos congênitos graves;
- (ii) dificuldades de alimentação no recém-nascido e / ou na infância;
- (iii) atraso no desenvolvimento evidente entre 6 e 12 meses de idade, algumas vezes associado ao hipotônio truncal;
- (iv) movimentos instáveis dos membros e / ou aumento do sorriso;
- (v) progressão atrasada mas avançada do desenvolvimento (sem perda de habilidades);
- (vi) perfis laboratoriais metabólicos, hematológicos e químicos normais;
- (vii) cérebro estruturalmente normal quando avaliado por ressonância magnética ou tomografia computadorizada (pode apresentar leve atrofia cortical ou dismielinização).

[0105] Alternativa ou adicionalmente, em algumas modalidades, um indivíduo foi determinado para exibir um ou mais recursos clínicos que estão consistentemente associados ao SA, como, por exemplo, um ou mais de:

- (i) atraso no desenvolvimento, funcionalmente grave;
- (ii) distúrbio do movimento ou do equilíbrio, geralmente ataxia da marcha e / ou movimento trêmulo dos membros. Em algumas modalidades, esse distúrbio de movimento pode ser leve. Em algumas modalidades, esse distúrbio de movimento pode não aparecer como ataxia franca, mas pode ser ou envolver, por exemplo, oscilações para a frente, instabilidade, falta de jeito ou movimentos bruscos e rápidos;

(iii) singularidade comportamental: qualquer combinação de risadas / sorrisos frequentes; aparente comportamento feliz; personalidade facilmente excitável, geralmente com movimentos agitados ou agitando as mãos; comportamento hipermotor;

(iv) comprometimento da visão, como por exemplo, uso ausente ou mínimo de palavras; alternativamente ou adicionalmente, habilidades de comunicação receptivas e não verbais superiores às verbais.

[0106] Alternativa ou adicionalmente, em algumas modalidades, um indivíduo foi determinado para exibir um ou mais recursos clínicos que são frequentemente (por exemplo, cerca de 80% do tempo) associados ao AS, como, por exemplo, um ou mais dos seguintes:

(i) retardou o crescimento desproporcional da circunferência da cabeça, geralmente resultando em microcefalia (≤ 2 DP do OFC normal) aos 2 anos de idade. Em algumas modalidades, a microcefalia é mais pronunciada naquelas com deleções 15q11.2-q13;

(ii) convulsões, início geralmente < 3 anos. de idade. Em algumas modalidades, a gravidade da convulsão pode diminuir com a idade, mas independentemente, em algumas modalidades, o distúrbio convulsivo dura por toda a vida adulta;

(iv) um EEG anormal, com um padrão característico, como é conhecido na técnica. Em algumas modalidades, as anormalidades no EEG podem ocorrer nos primeiros 2 anos de vida e podem preceder as características clínicas, e podem não estar correlacionadas aos eventos de crises clínicas.

[0107] Alternativamente ou adicionalmente, em algumas modalidades, um indivíduo foi determinado para exibir um ou mais recursos clínicos que às vezes (por exemplo, cerca de 20 a 80% do tempo) estão associados ao AS, como, por exemplo, um ou mais dos seguintes:

- (i) em lat occiput
- (ii) sulco cipital
- iii) língua rotativa
- (iv) empuxo de língua; distúrbios da sucção / deglutição
- (v) problemas de crescimento e / ou hipotonia truncal durante a infância
- (vi) prognatia
- (vii) boca com dentes largos e espaçados
- (viii) baba presente
- (ix) comportamentos excessivos de mastigação / boca
- (x) estrabismo
- (xi) pele pigmentada, cabelos claros e cor dos olhos, em algumas modalidades determinadas em comparação com a família e tipicamente vistas apenas em casos de exclusão
 - (xii) reflexos hiperativos do tendão profundo dos membros inferiores
 - (xiii) posição dobrada e flexionada do braço, especialmente durante a deambulação
 - (xiv) marcha baseada em ide com tornozelos pronados ou posicionados em valgo
 - (xv) aumento da sensibilidade ao calor
 - (xvi) ciclos de vigília anormal do sono e menor necessidade de sono
 - (xvii) uma atração / fascínio pela água; fascínio por itens enrugados, como certos papéis e plásticos
 - (xviii) comportamentos alimentares anormais
 - (xix) obesidade (na criança mais velha)
 - (xx) escoliose
 - (xxi) constipação

[0108] Em algumas modalidades, um regime terapêutico para o tratamento de AS com um ácido nucleico terapêutico (por exemplo, um oligonucleotídeo terapêutico como um ASO), conforme descrito neste documento, é ou compreende a administração de uma ou mais doses de uma composição farmacêutica que compreende e / ou fornece um oligonucleotídeo como aqui descrito.

[0109] Em algumas modalidades, um sujeito a quem um regime terapêutico fornecido é administrado está recebendo ou recebeu uma ou mais outras terapêuticas com AS, incluindo, por exemplo, uma ou mais outras terapêuticas com ácidos nucleicos (por exemplo, um ou mais outros oligonucleotídeos que têm como alvo *UBE3A*-AS) Ver, por exemplo, WO2014004572A3, US9617539B2, US20170362592A1 e EP2864479B1.

[0110] Em algumas modalidades, um sujeito a quem um regime terapêutico fornecido é administrado sofreu ou está sofrendo de uma ou mais convulsões e / ou está recebendo ou recebeu terapia anti-convulsão. Por exemplo. Em algumas modalidades, um sujeito pode ter recebido ou estar recebendo um ou mais de ácido valpróico, clonazepam, fenobarbital, topiramato, carbamazepina, lamotrigina, níveltiracetam, fenitoína, zonisamida, etossuxaminde, gabapentina, felbatame, oxcarbazepina, traxam, ACabal, nitraz, mysoline, vigabatrin, etc. Em algumas modalidades particulares, um sujeito pode ter recebido ou estar recebendo um ou mais de ácido valpróico, clonazepam, fenobarbital, topiramato, carbamazepina, lamotrigina e / ou levetiracetam.

[0111] Alternativa ou adicionalmente, em algumas modalidades, um sujeito pode ter recebido ou estar recebendo terapia dietética, como, por exemplo, uma dieta cetogênica, terapia de baixo índice glicêmico, etc.

[0112] Ainda mais, alternativamente ou adicionalmente, em algumas modalidades, um sujeito pode ter recebido ou estar recebendo tratamento com um estimulador de nervo vagal.

[0113] Como será evidente para os versados na técnica que leem a presente divulgação, os métodos de tratamento fornecidos envolvem a administração de um ou ambos de um oligonucleotídeo, conforme descrito aqui e uma terapia adicional (por exemplo, um oligonucleotídeo alternativo e / ou terapia antiepileptica e / ou uma ou mais outras intervenções terapêuticas), para que o sujeito receba terapia combinada (por exemplo, seja exposto a ela simultaneamente, por exemplo, por sobreposição de dosagem etc.). Também é divulgada a utilização de um oligonucleotídeo aqui divulgado para a fabricação de um medicamento em que o medicamento está em uma forma de dosagem para administração intratecal.

[0114] Também é divulgada a utilização de um oligonucleotídeo aqui divulgado para a fabricação de um medicamento em que o medicamento está em uma forma de dosagem para administração intracerebral ou intraventricular.

[0115] Também é divulgada a utilização de um oligonucleotídeo aqui divulgado para a fabricação de um medicamento em que o medicamento está em uma forma de dosagem para administração intracerebroventricular.

[0116] Em algumas modalidades, o oligonucleotídeo divulgado neste documento é para uso em um tratamento combinado com outro agente terapêutico. O agente terapêutico pode por exemplo ser medicação anticonvulsivante.

[0117] Um número de modalidades da invenção foi descrito. No entanto, será entendido que várias modificações podem ser feitas sem se afastar do espírito e escopo da invenção. Por conseguinte, outras modalidades estão dentro do escopo das reivindicações a seguir.

EXEMPLOS

Exemplo 1:

Resultados

[0118] A análise de sequenciação de RNA do CNS de camundongo e humano identificou uma região que se acredita ser importante para a estabilidade e /

ou transcrição de *UBE3A-AS*. Análises adicionais da região mostraram baixos níveis de conservação de sequência entre camundongo e humano (Figura s 1A-1D).

[0119] Com base nessas descobertas, os ASOs específicos de camundongos foram projetados para atingir uma região específica no transcrito *Ube3a-AS* t (Tabela 6 e Figura 2 A). Para testar se os ASOs que atingem esta região reativam a expressão do alelo *Ube3a* paterno, culturas neuronais do hipocampo primário foram geradas a partir do modelo de rato repórter *Ube3aYFP* (*Ube3a* + / YFP; Figura 2B) e tratadas aos 7 dias *in vitro* (DIV) com um ASO de controle [ASO-C (10 μ M, n = 3)], três ASOs segmentação *UBE3A-AS* [ASO-1,1, ASO-1,2, ASO-3,1 (1 μ M, 5 μ M, e 15 μ M, n = 3)], e ASO-B (1 μ M, 5 μ M, e 15 μ M, n = 3)]. Como controle positivo, os neurônios também foram tratados com Topotecan [Topo (300 nM, n = 3)] e um controle negativo do veículo [Veh (1%, n = 3); Figura 2C]. Três dias após o tratamento (10 DIV), a imagem imunofluorescente foi usada para quantificar os níveis de proteína *Ube3aYFP* paterna em células individuais. Comparado aos controles (ASO-C e Veh), cada tratamento aumentou substancialmente os níveis de proteína paterna de *Ube3aYFP*, com níveis semelhantes alcançados nos tratamentos ASO-1,1 (15 μ M), ASO-3,1 (15 μ M) e topotecano (Figuras 2D e 2E).

[0120] Os ASOs específicos para humanos foram então projetados para atingir essa região, que incluía quatro ASOs direcionados para regiões não polimórficas em humanos e regiões conservadas (100%) com macacos (*Rhesus* e *Cynomolgus*) (Tabela 7 e Figura 3A). As células precursoras neurais de células-tronco pluripotentes induzidas por humanos (iPSC) foram diferenciadas em neurônios GABAérgicos por 14 DIV e, em seguida, tratadas com um controle ASO [ASO-C (10 μ M, n = 3)], topotecano [Topo (1 μ M, n = 2)] e seis ASOs direcionados para *UBE3A-AS* [ASO-1, ASO-2, ASO-3, ASO-4, ASO-5 e ASO-6 (10 μ M, n = 3)]. Além disso, foi incluído um ASO direcionado a uma região intrônica a jusante do *SNORD109B* (ASO-7). Seis dias após o tratamento (20 DIV), o RNA foi isolado dos

neurônios e os níveis de RNA no estado estacionário de *UBE3A-AS* e *UBE3A* foram estimados em relação ao tratamento controle (Figura 3B). Com exceção do ASO-7, cada ASO diminuiu significativamente os níveis de RNA do *UBE3A-AS*, com o ASO-2 e o ASO-4 tendo o maior efeito (Tabela 8 e Figura 3C). Os níveis de RNA do *UBE3A* também aumentaram após o tratamento com cada ASO (Figura 3D).

[0121] A potência do ASO-4 foi ainda examinada devido ao seu efeito nos níveis de RNA do *UBE3A-AS*. Os neurônios derivados do iPSC GABAérgicos foram tratados aos 14 DIV com uma curva de resposta da dose de 10 pontos ½ log de ASO-4 e Topotecan, como controle positivo e para comparações entre o tratamento [1 nM, 3 nM, 10 nM, 30 nM, 100 nM, 300 nM, 1 µM, 3 µM, 10 µM e 30 µM (ASO-4, n = 6; Topotecano, n = 2)]. Aos 20 DIV, os níveis de RNA no estado estacionário de *UBE3A-AS* foram medidos e as curvas de resposta à dose ajustadas para estimar o IC_{50} e E_{max} (isto é, inibição máxima de *UBE3A-AS*) (Tabela 9 e Figura 4 A). As curvas de resposta à dose de ASO-4 e Topotecan foram significativamente diferentes (teste de paralelismo: $F_{(3,145)} = 11,2$, $p < 0,0001$), portanto, as potências relativas não foram estimadas. Um teste de equivalência indicado que a IC_{50} e E_{max} de ASO-4 e topotecano não foram equivalentes [ASO-4 / Topotecano IC_{50} relação: = 1,2 (limite de confiança inferior = 1,1; confiança Limite superior = 1,3) ; Razão E_{max} = -4,1 (Limite inferior de confiança = -12,9; Limite superior de confiança = 4,8)].

[0122] Os efeitos do ASO-4 e topotecano foram depois examinadas no *SNORD116*, *IPW*, *SNORD115*, e *SNORD109A* ARN, que estão localizados a montante da região alvo a ASO-4 (ver Figura 1A). Com exceção do *SNORD116*, o ASO-4 teve um efeito significativo nos níveis de RNA de *IPW*, *SNORD115* e *SNORD109A* / B, mas não de maneira dependente da dose. Em contraste, o Topotecano teve um efeito significativo nos níveis de

RNA *SNORD116*, *IPW*, *SNORD115* e *SNORD109A* / *B*, dependentes da dose (Tabela 10 e Figuras 4B-4 E). Tanto o ASO-4 quanto o *topotecano* aumentaram os níveis totais de RNA *UBE3A* de maneira dependente da dose, exceto o topotecano em concentrações mais altas (3 μ M, 10 μ M e 30 μ M ; Figura 4 F).

[0123] A potência do ASO-4 foi examinada em neurônios derivados de iPSC em um momento posterior na diferenciação. GABAérgica neurônios iPSC derivados foram tratados em 59 DIV com um controle ASO [ASO-C, 10 μ M (n = 3)] e ASO-4 [1 μ M, 5 μ M, e 10 μ M (n = 3)], e os níveis de RNA no estado estacionário de *UBE3A*-AS e *UBE3A* foram medidos como descrito acima (Figura 4G). Ao contrário dos neurônios tratados com ASO-4 em um momento anterior, os níveis de RNA de *UBE3A* e *UBE3A*-AS eram altamente inversamente correlacionados (Figura s 4H e 4 I). Por exemplo, o efeito de ASO-4 (10 μ M) em *UBE3A*-AS níveis de ARN foi semelhante entre os neurônios tratados com 14 e 59 DIV [20 DIV: *UBE3A*-AS: \downarrow 87% (95% de intervalos de confiança (IC): 80 a 95%); 65 DIV: \downarrow 81% (IC 95%: 74 a 88%)], enquanto o efeito do ASO-4 nos níveis de RNA *UBE3A* foi substancialmente maior nos neurônios tratados em 59 DIV [20 DIV: \uparrow 30% (IC 95%: 16 a 44%); 65 DIV: \uparrow 86% (IC 95%: 59% a 113%)].

[0124] ASOs adicionais visando a *terminação 5'* de *UBE3A*-AS foram então projetados para otimizar as sequências alvo de ASO-4 (ASO-4.1, ASO-4.2, ASO-4.3 e ASO-4.4), bem como duas outras regiões de destino, ASO-3 (ASO-3.1 e ASO-3.2) e ASO-6 (ASO-6.1) (Tabela 11). Além disso, o ASO-4 foi fabricado em dois fornecedores diferentes para fins comparativos (ASO-4.S, Sigma; ASO-4.I, Integrated DNA Technologies). Neurônios derivados de iPSC humanos (GABAérgicos) foram tratados a 14 DIV com uma curva de dose de 5 pontos $\frac{1}{2}$ log de ASO-3.1, ASO-3.2, ASO-4.S, ASO-4.I, ASO-4.1, 4.2-ASO, ASO-4.3, 4.4-ASO, e ASO-6.1 [30 nM, 100 nM, 300 nM, 1 μ M (n = 6)]. Aos 20 DIV, a IC₅₀ e E_{max} de cada ASO foi estimado como descrito acima (Figura 5 A - B e Tabela 12). As curvas de

resposta à dose foram semelhantes entre os ASOs (teste de paralelismo: $F_{(16.513)} = 1,6, p = 0,06$), com ASO-4 e ASO-6.1 com a maior potência relativa (Tabela 13). Não foi observada diferença significativa entre ASO-4.S e ASO-4.I.

[0125] A potência do ASO-4 e do ASO-6.1 foi examinada em neurônios derivados de iPSC em um momento posterior na diferenciação. Os neurônios derivados do iPSC GABAérgicos foram tratados a 29 DIV com uma curva de resposta à dose de 10 pontos $\frac{1}{2} \log$ de ASO-4 e ASO-6.1 [1 nM, 3 nM, 10 nM, 30 nM, 100 nM, 300 nM, 1 μ M, 3 μ M, 10 μ M e 30 μ M (n = 3)]. Aos 35 DIV, a IC_{50} e E_{max} de cada ASO foi estimado como descrito acima (Figura 5 CD e Tabela 14). As curvas de resposta à dose de ASO-4 e ASO-6.1 não foram semelhantes (teste de paralelismo: $F_{(3.172)} = 22,7, p < 0,0001$). Um teste de equivalência indicado que ASO-4 e ASO-6.1 tinha potências equivalentes, mas diferente de valores de E_{max} [ASO-6.1 / ASO-4 relação: $IC_{50} = 1,03$ (limite de confiança inferior = 1,0; limite de confiança superior = 1,1); $E_{max} = -1,3$ (Limite inferior de confiança = -2,6; Limite superior de confiança = -0,08)], com o ASO-6.1 tendo a maior inibição dos níveis de *UBE3A*-AS. O efeito de ASO-4 e ASO-6.1 nos níveis de RNA *UBE3A* foi semelhante, com cada tratamento aumentando os níveis de RNA de maneira dependente da dose (Figura 5D).

[0126] ASO-4 e ASO-6.1 também foram examinados em neurônios glutamatérgicos derivados de iPSC. Os neurônios glutamatérgicos derivados de iPSC foram tratados a 14 DIV com uma curva de resposta à dose de 10 pontos $\frac{1}{2} \log$ de ASO-4 e ASO-6.1 [1 nM, 3 nM, 10 nM, 30 nM, 100 nM, 300 nM, 1 μ M, 3 μ M, 10 μ M e 30 μ M (n = 3)]. Aos 20 DIV, a IC_{50} e E_{max} de cada ASO foi estimado como descrito acima (Figura 5 E-F e Tabela 15). As curvas de resposta à dose de ASO-4 e ASO-6.1 foram semelhantes e não significativamente diferentes (teste de paralelismo: $F_{(3.165)} = 1,9, p = 0,1$), com o ASO-6.1 tendo a maior potência relativa (Tabela 16). Como esperado, ASO-4 e ASO-6.1 aumentaram os níveis de RNA de *UBE3A* de maneira dependente da dose (Figura 5F); no entanto, não havia um alto

grau de variação de cada concentração que não foi atribuível a um tratamento ($R^2 = 0,17$).

Conclusões

[0127] No sentido de desenvolver uma terapia para AS, foram realizadas experiências para determinar se os ASOs direcionados a uma região específica inibem *Ube3a*-AS / *UBE3A*-AS e reativam a expressão do alelo paterno *Ube3a* / *UBE3A* em neurônios de camundongos e humanos. No total, as descobertas mostram que os ASOs direcionados a essa região em neurônios de camundongos e humanos têm atividade *antisense* potente e impressão inversa de *Ube3a* / *UBE3A*.

[0128] Dois dos três ASOs (ASO-1.1 e ASO-3.1) visando a expressão reativada de *Ube3a*-AS do alelo paterno de *Ube3a* nos neurônios de camundongos a um nível semelhante ao alcançado pela concentração ideal de Topotecano (300 nM).

[0129] Da mesma forma, cada um dos ASOs específicos para humanos reduziu significativamente os níveis de RNA no estado estacionário de *UBE3A*-AS em neurônios humanos derivados de iPSC, com maiores concentrações de ASO-4 e ASO-6.1, abolindo quase completamente a expressão de *UBE3A*-AS. Dado que o ASO-4 e o ASO-6.1 têm como alvo regiões 100% conservadas entre humanos e macacos, a eficácia desses ASOs pode ser examinada *in vivo* em macacos *Cynomolgus* ou *Rhesus*. Diferentemente do Topotecano, o ASO-4 tem um pequeno efeito, se houver, nos RNAs *SNORD116*, *IPW*, *SNORD115* ou *SNORD109A* / *B upstream*, consistente com a noção de que o ASO termina a transcrição na região alvo ou a jusante.

[0130] Baixas concentrações (3 nM) de ASO-4 e ASO-6.1 reduziram significativamente os níveis de RNA de *UBE3A*-AS ; no entanto, concentrações mais elevadas (≥ 100 nm) de ASO foram necessárias para aumentar *UBE3A* níveis de ARN. Isso pode refletir um certo limite necessário para o *UBE3A*-AS inibir a transcrição do *UBE3A*, ou um atraso entre o tempo em que a inativação do *UBE3A*-

AS leva à reativação do *UBE3A* paterno ou a sensibilidade do ensaio usado para quantificar os níveis de RNA do *UBE3A*.

[0131] Coletivamente, as descobertas sugerem que os ASOs que visam uma região candidata no *UBE3A*-AS *abolem* quase completamente a impressão do *UBE3A* nos neurônios e revelam pelo menos dois ASOs para desenvolvimento clínico futuro.

[0132] Derivados de ASO-4 e ASO-6.1 que são compostos de diferentes modificações de RNA [2'-hidroximetil (2'-OMe), 2'-metoxi-etyl 2'-MOE e ácido nucleico bloqueado (LNA)] e backbones [phosphorothioate (PS) e fosfodiéster (PO)] também foram projetados (Tabela 17).

Tabela 6. Oligonucleotídeos *Ube3a*-AS de camundongo

ASO	RNA Modificação	RNA Espinha dorsal	DNA Espinha dorsal	Projeto (5'-3')	Sequência	ID SEQ
ASO-B	2'-OMe	PS	PS	5-10-5	C ^{O*} C ^{O*} A ^{O*} G ^{O*} C ^{O*} c [*] t [*] t [*] g [*] t [*] t [*] * g [*] g [*] a [*] t [*] A ^{O*} U ^{O*} C ^{O*} A ^{O*} U ^{O*}	SEQ ID NO: 358
ASO-1.1	2'-OMe	PS	PS	5-10-5	C ^{O*} C ^{O*} A ^{O*} C ^{O*} A ^{O*} t [*] t [*] t [*] c [*] c [*] t [*] * c [*] t [*] c [*] a [*] U ^{O*} G ^{O*} G ^{O*} A ^{O*} A ^{O*}	SEQ ID NO: 359
ASO-1.2	2'-OMe	PS	PS	5-10-5	G ^{O*} A ^{O*} G ^{O*} U ^{O*} G ^{O*} t [*] t [*] t [*] g [*] c [*] a [*] * a [*] a [*] c [*] c [*] A ^{O*} A ^{O*} A ^{O*} G ^{O*} U ^{O*}	SEQ ID NO: 360
ASO-3.1	2'-OMe	PS	PS	5-10-5	U ^{O*} G ^{O*} U ^{O*} U ^{O*} U ^{O*} c [*] t [*] t [*] t [*] g [*] g [*] * t [*] g [*] a [*] t [*] U ^{O*} C ^{O*} U ^{O*} G ^{O*} C ^{O*}	SEQ ID NO: 361

Letra maiúscula, RNA; letra minúscula, DNA; O, 2'-OMe; PS & *, fosforotioato

Tabela 7. Oligonucleotídeos *UBE3A*-AS humanos

ASO	RNA Modificação	RNA Espinha dorsal	DNA Espinha dorsal	Projeto (5'-3')	Sequência	ID SEQ
-----	-----------------	--------------------	--------------------	-----------------	-----------	--------

ASO-1	2'-OMe	PS	PS	5-10-5	U ^{O*} A ^{O*} G ^{O*} A ^{O*} G ^{O*} g [*] t [*] g [*] a [*] a [*] g * g [*] c [*] c [*] a [*] G ^{O*} G ^{O*} C ^{O*} A ^{O*} C ^O	SEQ ID NO: 362
ASO-2	2'-OMe	PS	PS	5-10-5	G ^{O*} U ^{O*} A ^{O*} C ^{O*} U ^{O*} c [*] t [*] t * c [*] c [*] t [*] c * a [*] g [*] t [*] C ^{O*} A ^{O*} U ^{O*} C ^{O*} C ^O	SEQ ID NO: 363
ASO-3 ^c	2'-OMe	PS	PS	5-10-5	U ^{O*} G ^{O*} U ^{O*} C ^{O*} A ^{O*} g [*] t [*] t * t [*] c [*] t [*] c * c [*] c [*] t [*] G ^{O*} A ^{O*} A ^{O*} C ^{O*} A ^O	SEQ ID NO: 364
ASO-4 ^c	2'-OMe	PS	PS	5-10-5	U ^{O*} A ^{O*} G ^{O*} A ^{O*} A ^{O*} t [*] g [*] g [*] c [*] a [*] c * a [*] t [*] c [*] t * C ^{O*} U ^{O*} U ^{O*} G ^{O*} G ^O	SEQ ID NO: 365
ASO-5 ^c	2'-OMe	PS	PS	5-10-5	G ^{O*} U ^{O*} U ^{O*} U ^{O*} U ^{O*} c [*] t [*] t * c [*] c [*] t [*] c * c [*] a [*] c [*] A ^{O*} G ^{O*} U ^{O*} C ^{O*} U ^O	SEQ ID NO: 366
ASO-6 ^c	2'-OMe	PS	PS	5-10-5	C ^{O*} U ^{O*} G ^{O*} G ^{O*} U ^{O*} g [*] t [*] c [*] a [*] a [*] c * a [*] a [*] g [*] c [*] C ^{O*} A ^{O*} A ^{O*} A ^{O*} G ^O	SEQ ID NO: 367

Abreviações: C, conservadas com macacos e não polimórficas; letra maiúscula, nucleotídeo de RNA; letra minúscula, nucleotídeo de DNA; O, 2'-OMe; PS & *, fosforotioato

Tabela 8. Análise de ASOs humanos nos níveis de RNA *UBE3A-AS* e *UBE3A*

<i>UBE3A-AS</i>					
ASO 1	ASO 2	Diferença	IC inferior	IC superior	Adj. P
ASO-C	ASO-2	0,89	0,82	0,97	<.0001
ASO-R	ASO-2	0,87	0,80	0,95	<.0001
ASO-C	ASO-4	0,87	0,80	0,95	<.0001
ASO-R	ASO-4	0,85	0,78	0,93	<.0001
ASO-C	ASO-6	0,83	0,75	0,90	<.0001
ASO-R	ASO-6	0,81	0,74	0,89	<.0001
ASO-C	ASO-3	0,79	0,71	0,86	<.0001
ASO-R	ASO-3	0,77	0,70	0,85	<.0001
ASO-C	ASO-5	0,71	0,63	0,78	<.0001
ASO-R	ASO-5	0,69	0,62	0,77	<.0001
ASO-C	Topo	0,66	0,59	0,73	<.0001
ASO-R	Topo	0,64	0,57	0,72	<.0001
ASO-C	ASO-1	0,51	0,43	0,58	<.0001
ASO-R	ASO-1	0,49	0,41	0,56	<.0001
ASO-1	ASO-2	0,38	0,31	0,46	<.0001
ASO-1	ASO-4	0,36	0,29	0,44	<.0001
ASO-1	ASO-6	0,32	0,25	0,40	<.0001
ASO-1	ASO-3	0,28	0,21	0,36	<.0001
Topo	ASO-2	0,23	0,16	0,31	<.0001
Topo	ASO-4	0,21	0,14	0,29	<.0001
ASO-1	ASO-5	0,20	0,13	0,28	<.0001
ASO-5	ASO-2	0,18	0,11	0,26	<.0001
Topo	ASO-6	0,17	0,10	0,24	0,0002
ASO-5	ASO-4	0,16	0,09	0,24	0,0003
ASO-1	Topo	0,15	0,08	0,23	0,0004
Topo	ASO-3	0,13	0,06	0,20	0,0018
ASO-5	ASO-6	0,12	0,04	0,20	0,0035
ASO-3	ASO-2	0,10	0,03	0,18	0,0111
ASO-3	ASO-4	0,08	0,01	0,16	0,0360
ASO-5	ASO-3	0,08	0,00	0,15	0,0381
ASO-6	ASO-2	0,06	-0,01	0,14	0,11
Topo	ASO-5	0,05	-0,02	0,13	0,18
ASO-6	ASO-4	0,04	-0,03	0,12	0,27
ASO-3	ASO-6	0,04	-0,03	0,12	0,28
ASO-4	ASO-2	0,02	-0,06	0,09	0,58
ASO-C	ASO-R	0,02	-0,06	0,09	0,64

UBE3A

ASO 1	ASO 2	Diferença	IC inferior	IC superior	Adj. P
ASO-4	ASO-C	0,30	0,16	0,44	0,0004
ASO-4	ASO-R	0,29	0,14	0,45	0,001
ASO-2	ASO-C	0,21	0,09	0,34	0,002
ASO-2	ASO-R	0,21	0,07	0,35	0,006
ASO-1	ASO-C	0,18	0,06	0,31	0,007
Topo	ASO-C	0,18	0,04	0,32	0,01
ASO-1	ASO-R	0,18	0,04	0,32	0,02
Topo	ASO-R	0,18	0,03	0,33	0,02
ASO-4	ASO-3	0,17	0,03	0,31	0,02
ASO-5	ASO-C	0,16	0,04	0,29	0,01
ASO-6	ASO-C	0,16	0,04	0,29	0,01
ASO-5	ASO-R	0,16	0,02	0,30	0,03
ASO-6	ASO-R	0,16	0,02	0,30	0,03
ASO-4	ASO-6	0,13	-0,007	0,27	0,06
ASO-4	ASO-5	0,13	-0,007	0,27	0,06
ASO-3	ASO-C	0,13	0,00	0,26	0,04
ASO-3	ASO-R	0,13	-0,015	0,27	0,08
ASO-4	Topo	0,11	-0,04	0,27	0,1
ASO-4	ASO-1	0,11	-0,03	0,25	0,1
ASO-2	ASO-3	0,08	-0,04	0,21	0,2
ASO-4	ASO-2	0,08	-0,06	0,22	0,2
ASO-1	ASO-3	0,05	-0,07	0,18	0,4
Topo	ASO-3	0,05	-0,09	0,19	0,4
ASO-2	ASO-6	0,05	-0,08	0,18	0,4
ASO-2	ASO-5	0,05	-0,08	0,17	0,4
ASO-5	ASO-3	0,03	-0,09	0,16	0,6
ASO-6	ASO-3	0,03	-0,09	0,16	0,6
ASO-2	Topo	0,03	-0,1	0,17	0,7
ASO-2	ASO-1	0,03	-0,01	0,16	0,6
ASO-1	ASO-6	0,02	-0,1	0,15	0,7
Topo	ASO-6	0,02	-0,1	0,16	0,8
ASO-1	ASO-5	0,02	-0,1	0,15	0,7
Topo	ASO-5	0,02	-0,1	0,16	0,8
ASO-R	ASO-C	0,00	-0,1	0,14	0,9
ASO-5	ASO-6	0,00	-0,1	0,13	0,9
ASO-1	Topo	0,00	-0,1	0,14	1,00

Abreviações: ASO-C, ASO-control; Topo, Topotecano; Ajustado; IC, intervalo de confiança de 95%

Tabela 9. IC₅₀ e E_{max} de ASO-4 e Topotecano

Tratamento	Estimativa do IC ₅₀ (M)	IC ₅₀ IC95% (M)	E _{max} Estimativa	E _{max} IC95% (M)	30 μM (média)

AS O-4	6.13E-07	3,47E-07	1.08E-06	-0,06	-0,23	0,10	0,09
Topo	3.37E-08	1,85E-08	6.14E-08	0,26	0,20	0,32	0,21

Estimativas de parâmetros de modelo completo a partir do modelo de regressão logística de 4 parâmetros (Hill). IC₅₀ e os intervalos de confiança representam a concentração molar. E_{max} 30 μM e os valores representam normalizados *UBE3A*-AS níveis de RNA em relação ao veículo.

Tabela 10. Análise do ASO-4 e do Topotecano nos níveis de RNA *UBE3A*, *SNORD116*, *SNORD115*, *SNORD109A / B* e *IPW*

Tratamento	RNA	DF	DFDen	Relação F	FDR
ASO-4	UBE3A	9	108	16,5	<0,0001
	SNORD109A / B	9	104,9	2,6	0,01
	SNORD115	9	108	4,0	0,0002
	SNORD116	9	108	1,74	0,09
	IPW	9	108	4,1	0,0002
Topotecano	UBE3A	9	29	5,6	0,0002
	SNORD109A / B	9	29	28,2	<0,0001
	SNORD115	9	29	4,60	0,001
	SNORD116	9	29	7,12	<0,0001
	IPW	9	29	49,8	<0,0001

Regressão linear de mínimos quadrados. Abreviações: DF, graus de liberdade; DFDen, graus de densidade de liberdade

Tabela 11. Oligonucleotídeos anti-sentido humanos *UBE3A*-AS otimizados

ASO	RNA Modificação	RNA Espinha dorsal	DNA Espinha dorsal	Projeto (5'-3')	Sequência	ID SEQ
ASO-3.1 ^c	2'-OMe	PS	PS	4-10-5	G ^O * U ^O * U ^O * G ^O * a * g * t * g * g * t * g * t * c * a * G ^O * U ^O * U ^O * U ^O * C ^O	SEQ ID NO: 368
ASO-3.2 ^c	2'-OMe	PS	PS	4-10-4	U ^O * U ^O * G ^O * A ^O * g * t * g * g * t * g * t * c * a * g * U ^O * U ^O * U ^O * C ^O	SEQ ID NO: 369

ASO-6.1 ^c	2'-OMe	PS	PS	4-10-4	C ^{O*} U ^{O*} G ^{O*} G ^{O*} t * g * t * c * a * a * c * a * a * g * C ^{O*} C ^{O*} A ^{O*} A ^O	SEQ ID NO: 370
ASO-4.1 ^c	2'-OMe	PS	PS	5-10-5	A ^{O*} U ^{O*} A ^{O*} G ^{O*} A ^{O*} a * t * g * g * c * a * c * a * t * c * U ^{O*} C ^{O*} U ^{O*} U ^{O*} G ^O	SEQ ID NO: 371
ASO-4.2 ^c	2'-OMe	PS	PS	4-10-5	A ^{O*} G ^{O*} A ^{O*} A ^{O*} t * g * g * c * a * c * a * t * c * t * C ^{O*} U ^{O*} U ^{O*} G ^{O*} G ^O	SEQ ID NO: 372
ASO-4.3 ^c	2'-OMe	PS	PS	4-10-5	U ^{O*} A ^{O*} G ^{O*} A ^{O*} a * t * g * g * c * * a * c * a * t * * c * U ^{O*} C ^{O*} U ^{O*} U ^{O*} G ^O	SEQ ID NO: 373
ASO-4.4 ^c	2'-OMe	PS	PS	4-10-4	A ^{O*} G ^{O*} A ^{O*} A ^{O*} t * g * g * c * a * c * a * t * c * t * C ^{O*} U ^{O*} U ^{O*} G ^O	SEQ ID NO: 374

^c, conservado com macaque e não polimórfico; letra maiúscula, nucleotídeo de RNA; letra minúscula, nucleotídeo de DNA; O, 2'-OMe; PS & *, fosforotioato

Tabela 12. IC₅₀ e E_{max} de Optimized ASO sequências alvo

Grupo	Estimativa do IC ₅₀	IC ₅₀ IC95% (M)		3 μ M (média)
6.1	5.20E-07	3.33E-07	8.11E-07	0,23
4.0	1.06E-06	9.31E-07	1.21E-06	0,29
4.2	1.08E-06	8.62E-07	1.35E-06	0,31
3.2.	1.88E-06	1.39E-06	2.56E-06	0,44

4.3.	2.03E-06	1.67E-06	2,47E-06	0,40
4.4.	2.11E-06	1,73E-06	2.59E-06	0,44
4.1	2.27E-06	1,92E-06	2,68E-06	0,42
3.1.	2.98E-06	2.45E-06	3,62E-06	0,51

Estimativas de parâmetros de modelo completo a partir do modelo de regressão logística de 3 parâmetros. IC₅₀ e os intervalos de confiança representam a concentração molar. E_{max} (3 uM) valores representam normalizados *UBE3A*-AS níveis de RNA em relação ao veículo.

Tabela 13. Potência relativa de ASOs otimizados

ASO	IC ₅₀ (M)	Potência relativa	Erro padrão
ASO 3.1	2,81 E -06	0,53	0,059
ASO 3.2	1,85 E -06	0,81	0,086
ASO 4.1	2,25 E -06	0,66	0,072
ASO 4.2	1,24 E -06	1,21	0,13
ASO 4.3	1,96 E -06	0,76	0,081
ASO 4.4	2.04 E -06	0,73	0,079
ASO 6.1	7.20 E -07	2,07	0,21
ASO 4.1	8.28 E -07	1,80	0,19
ASO 4.S	1,49 E -06	1	0 0

Estimativas de parâmetros de modelo paralelo a partir do modelo de regressão logística de 3 parâmetros. A potência representa a concentração molar. Abreviações: M, molar; Erro padrão, erro padrão da média.

Tabela 14. IC₅₀ e E_{max} de ASO-4 e ASO-6.1 em GABAérgica iPSC Neurons

ASO	Estimativa do IC ₅₀	IC ₅₀ IC95% (M)	E _{max} Estimativa	E _{max} IC95%	30 μ M (média)
ASO-4	7.77E-07	6.86E-07	8.79E-07	0,08	0,05 0,11 0,11
ASO-6.1	5.17E-07	3,41E-07	7.82E-07	-0,11	-0,22 0,01 0,06

Estimativas de parâmetros de modelo completo a partir do modelo de regressão logística de 4 parâmetros (Hill). IC₅₀ e os intervalos de confiança representam a concentração molar. E_{max} 30 uM e os valores representam normalizados *UBE3A*-AS níveis de RNA em relação ao veículo.

Tabela 15. IC₅₀ e E_{max} de ASO-4 e ASO-6.1 em glutamatérgica iPSC Neurons

ASO	Estimativa do IC ₅₀	IC ₅₀ IC95% (M)	E _{max} Estimativa	E _{max} IC95%	30 μM (média)
ASO-4	1.21E-04	1.12E-13	1,32E + 05	-1,45	-9,01 6.12 0,17

ASO-6.1	2.44E-07	2.39E-08	2.50E-06	-0,27	-1,24	0,70	0,04
Estimativas de parâmetros de modelo completo a partir do modelo de regressão logística de 4 parâmetros (Hill). IC ₅₀ e os intervalos de confiança representam a concentração molar. E _{max} 30 uM e os valores representam normalizados <i>UBE3A</i> -AS níveis de RNA em relação ao veículo.							

Quadro 1 6. Potência relativa de ASO-4 e ASO-6.1 em neurônios glutamatérgicos			
ASO	IC ₅₀ (M)	Potência relativa	Erro padrão
ASO-4	3.06 E -06	1	0 0
ASO-6.1	7.8 E -07	3,89	0,72

Estimativas de parâmetros de modelo paralelo a partir do modelo de regressão logística de 4 parâmetros. Abreviações: M, molar

Tabela 17. Derivados de ASO-4 e ASO-6.1						
ASO	RNA Mod.	Espinha dorsal	Ligações de pedidos	Projeto (5'-3')	Sequência (5'-3')	ID SEQ
ASO-4.0.PS.O	OMe	PS	0 0	5-10-5	U ⁰ * A ⁰ * G ⁰ * A ⁰ * A ⁰ * t [*] g [*] g [*] c [*] a [*] c [*] a [*] t [*] c [*] t [*] C ⁰ * U ⁰ * U ⁰ * G ⁰ * G ⁰	SEQ ID NO: 375
ASO-4.0.PO-1.O	OMe	PS / PO	2	5-10-5	U ⁰ * A ⁰ * G ⁰ * A ⁰ * A ⁰ -t [*] g [*] g [*] c [*] a [*] c [*] a [*] t [*] c [*] tC ⁰ * U ⁰ * U ⁰ * G ⁰ * G ⁰	SEQ ID NO: 376
ASO-4.0.PO-2.O	OMe	PS / PO	0 0	5-10-5	L ⁰ * Um ⁰ -G ⁰ * Um ⁰ -A ⁰ * TG [*] GC [*] ca [*] a [*] CT [*] C ⁰ U ⁰ * U ⁰ -G ⁰ * L ⁰	SEQ ID NO: 377
ASO-4.0.PS.M	MOE	PS	0 0	5-10-5	T ^M * A ^M * G ^M * A ^M * A ^M * t [*] g [*] g [*] * c [*] a [*] c [*] a [*] t [*] c [*] * t [*] 5mC ^M * T ^M * T ^M * G ^M * G ^M	SEQ ID NO: 378
ASO-4.0.PO-1.M	MOE	PS / PO	2	5-10-5	T ^M * A ^M * G ^M * A ^M * A ^M -t [*] g [*] g [*] c [*] a [*] c [*] a [*] t [*] c [*] t-5mC ^M * T ^M * T ^M * G ^M * G ^M	SEQ ID NO: 379

ASO-4.0.PO-2.M	MOE	PS / PO	9	5-10-5	T ^H * U ^H -G ^M * A ^M -A ^M * T ^G * G ^C * ca * a * ct * 5mC ^H -T ^H * T ^H - G ^M * L ^M	SEQ ID NO: 380
ASO-4.4.PS.L	LNA	PS	0 0	3-11-4	A ^L * G ^L * A ^L * a * t * g * g * c * a * c * a * t * c * t * 5mC ^L * T ^L * T ^L * G ^L	SEQ ID NO: 381
ASO-4.4.PO-1.L	LNA	PS / PO	2	3-11-4	A ^L * G ^L * A ^L -a * t * g * g * c * a * c * a * t * c * t-5mC ^L * T ^L * T ^L * G ^L	SEQ ID NO: 382
ASO-4.4.PO-2.L	LNA	PS / PO	8	3-11-4	Um ^G * G ^G -A ^L * a * GG * CA * CA * tc * t-5mC ^G * T ^G - T ^G * G ^G	SEQ ID NO: 383
ASO-6.1.PS.O	OMe	PS	0 0	4-10-4	C ^O * U ^O * G ^O * G ^O * t * g * t * c * a * a * c * a * a * g * C ^O * C ^O * A ^O * A ^O	SEQ ID NO: 384
ASO-6.1.PO-1.O	OMe	PS / PO	2	4-10-4	C ^O * U ^O * G ^O * G ^O -t * g * t * c * a * a * c * a * a * gC ^O * C ^O * A ^O * A ^O	SEQ ID NO: 385
ASO-6.1.PO-2.O	OMe	PS / PO	8	4-10-4	C ^O * U ^O -G ^O * G ^O -t * gt * ca * ac * aa * gC ^O * C ^O - A ^O * A ^O	SEQ ID NO: 386
ASO-6.1.PS.M	MOE	PS	0 0	4-10-4	5mC ^M * T ^M * G ^M * G ^M * t * g * t * c * a * a * c * a * a * g * 5mC ^M * 5mC ^M * A ^M * A ^M	SEQ ID NO: 387
ASO-6.1.PO-1.M	MOE	PS / PO	2	4-10-4	5mC ^M * T ^M * G ^M * G ^M -t * g * t * c * a * a * c * a * a * g- 5mC ^M * 5mC ^M * A ^M * A ^M	SEQ ID NO: 388
ASO-6.1.PO-2.M	MOE	PS / PO	8	4-10-4	5mC ^M * T ^M -G ^M * G ^M -t * gt * ca * ac * aa * g-5mC ^M * 5mC ^M -A ^M * A ^M	SEQ ID NO: 389
ASO-6.1.PS.L	LNA	PS	0 0	3-10-4	T ^L * G ^L * G ^L * t * g * t * c * a * a * c * a * a * g * 5mC ^L * 5mC ^L * A ^L * A ^L	SEQ ID NO: 390

ASO-6.1.PO-1.L	LNA	PS / PO	2	3-10-4	T ^L * G ^L * G ^L -t [*] g [*] * t [*] c [*] a [*] a [*] c [*] a [*] * a [*] g-5mC ^L * 5mC ^L * A ^L * A ^L	SEQ ID NO: 391
ASO-6.1.PO-2.L	LNA	PS / PO	8	3-10-4	T ^L * G ^L -G ^L * tg [*] tc [*] aa [*] ca [*] ag [*] 5mC ^L -5mC ^L -A ^L * A ^L	SEQ ID NO: 392

Letra maiúscula, RNA; letra minúscula, DNA. 5m C

(Ensembl Centroid) e presença / ausência de motivos de sequência associados a alta / baixa eficácia.

Neurônios do hipocampo primários do rato

[0135] Culturas primárias de neurônios do hipocampo foram geradas a partir de filhotes de P0-P1 (*Ube3a* $m^{+/p} +$ e *Ube3a* $m^{+/pYFP}$) cruzando machos *Ube3a* $m^{+/pYFP}$ com fêmeas C57BL / 6J do tipo selvagem. Os genótipos foram determinados usando métodos descritos anteriormente. Resumidamente, os neurônios do hipocampo foram cultivados em meio Neurobasal A (Invitrogen, San Diego, CA) suplementado com B27 (Invitrogen) e penicilina / estreptomicina (Invitrogen) em placas inferiores ópticas de 96 poços revestidas com poli-D-lisina (152028, Thermo Fisher Scientific) e laminina (23017-01, Thermo Fisher Scientific). As culturas foram mantidas a 37 ° C em 5% de CO₂ até o uso.

Mouse Neuron Imaging

[0136] Os neurônios do hipocampo primários do rato foram fixados em 10 DIV (3 dias após o tratamento) com paraformaldeído a 4%. As culturas foram então lavadas duas vezes com 1X PBS, fixadas em paraformaldeído a 4% em PBS por 15 min e depois lavadas três vezes em 1X PBS. As células foram bloqueadas em Triton-X100 a 0,3% em PBS (T-PBS) mais soro de cabra ou burro a 5% por 1-2 horas à temperatura ambiente com agitação suave. As células foram incubadas com anti-GFP [Novus Biologicals, NB 600-308 (coelho)] e anti-NeuN (Millipore, 05-557 (rato)] anticorpos durante 24 horas a 4 °C com agitação suave. As células foram lavadas três vezes em 0,1% de Tween 20 1 PBS por 15 min cada e depois incubadas com anticorpos secundários anti-coelho 488 (Jackson ImmunoResearch, 111-545-144) e anti-camundongo Cy3 (Jackson ImmunoResearch, 115-165-166) por 24 horas a 4 °C no escuro, as células foram lavadas 4 vezes em 0,1% de Tween 20 1X PBS por 15 min cada, e os núcleos foram

marcados usando a coloração Hoechst (Thermo Fisher Scientific) a uma diluição de 1: 1000 na terceira lavagem.

[0137] As placas foram fotografadas usando o software Cytation 5 e Gen5 Image + (BioTek, Winooski, VT). Resumidamente, um objetivo invertido 4X foi usado para gerar imagens de montagem de cada poço, adquirindo imagens com foco automático 5x4 com ladrilhos sobrepostos para a costura automática de imagens. Os filtros utilizados foram DAPI (377.477), GFP (469, 525) e RFP (531, 593). O tempo de exposição e o ganho foram ajustados para cada placa usando os controles negativo e positivo. O foco automático foi realizado nos núcleos (mancha Hoechst, DAPI) para cada poço, com a mesma altura focal usada para os filtros GFP e RFP. As imagens foram unidas pelo software Gen5 Image +.

[0138] A análise de imagem de célula única foi realizada usando o IN Cell Developer 6.0 (GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA). Resumidamente, máscaras de trilha individuais foram geradas para núcleos (mancha de Hoechst, DAPI) ou neurônios maduros (NeuN, RFP), otimizando os parâmetros de inclusão e exclusão com base no tamanho e intensidade das células selecionadas aleatoriamente nas imagens adquiridas. Os valores médios e medianos de intensidade de GFP foram adquiridos dentro dos limites da máscara selecionada, gerando valores de intensidade para Ube3a YFP dentro de cada célula.

Neurônios derivados de células-tronco pluripotentes induzidas por humanos

[0139] As células precursoras neurais derivadas de células-tronco pluripotentes induzidas por GABA ergicas e glutamatérgicas (iPSC) (NRC-100-010-001 e GNC-301-030-001, Cellular Dynamics International, Madison WI) foram diferenciadas em neurônios de acordo com o protocolo do fabricante. Resumidamente, as células precursoras neurais foram descongeladas e ressuspensas em meio quimicamente definido e adicionadas a placas de cultura

estéril revestidas com poli-D-lisina e laminina. O meio foi substituído 24 horas após o revestimento e depois metade do meio foi substituído a cada 3-5 dias depois.

Isolamento de RNA

[0140] Para neurônios iPSC-cultivados, derivadas de RNA de isolamento e de síntese de cDNA foram realizadas utilizando o kit de célula-a-CT (Thermo Fisher Scientific) em um volume de lisado de 55 μ L.

Análise dos níveis de RNA

[0141] Os níveis de RNA no estado estacionário dos transcritos alvo foram medidos utilizando ensaios quantitativos de PCR para transcrição reversa (qRT-PCR) de TaqMan. O volume total da reação foi de 10 μ L, incluindo 2 μ L de cDNA, 1X Gene Expression Master mix (4369016, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) e 1X TaqMan primer assay (Thermo Fisher Scientific). As condições de ciclismo foram de 2 minutos a 50 ° C, 10 minutos a 95 ° C e 40 ciclos de 15 segundos a 95 ° C e 1 minuto a 60 ° C, com leituras realizadas na etapa de 60 ° C de cada ciclo. As reações foram realizadas em um termociclador BIO-RAD T1000 CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Hercules CA), com controle interno (*PPIA*, Hs99999904_m1, Thermo Fisher Scientific) e alvo [*UBE3A*-AS, Hs01372957_m1 ; SNORD116 11, Hs04275268_gH; SNORD115,

Hs04275288_gH; IPW, Hs03455409_s1; SNORD109A / B, AP47WVR (Thermo Fisher Scientific) ; *UBE3A*: ATATGTGGAAGCCGGAATCT dianteiro (SEQ ID NO: 500); reverso: CCCAGAACTCCCTAACAGAA (SEQ ID NO: 501); e sonda: reações de ATGACGGTGGCTATACCAGG (SEQ ID NO: 502)] realizadas juntas. Os dados foram recuperados e analisados com o software BIORAD CFX Maestro (Bio-Rad Laboratories). As amostras com controle interno com valores $Cq \geq 30$ foram filtradas. A qualidade dos dados foi inspecionada visualmente para identificar discrepâncias entre as réplicas técnicas e / ou de chapa. As medições para a

estatística inferencial e estatísticas descritivas consistem em valores de $\Delta \Delta Cq$ ($2^{-\Delta \Delta Cq} = 2^{-(Cq[\text{alvo}] - Cq[\text{controle interno}]) - (Cq[\text{alvo}] - Cq[\text{controle interno}])}$).

Exemplo 2: Identificação da região de destino ASO

[0142] A análise dos dados de sequenciamento de RNA gerados a partir de tecidos e células de camundongos revelou uma região localizada entre a terminação 3' do cluster *Snord115* e a terminação 5' do transcrito *Ube3a* antisense (*Ube3a-AS*) contendo elementos genéticos considerados importantes para o processamento do transcrito do gene hospedeiro *Snord115* e transcrição de *Ube3a-AS* (Figura s 6A - 6D). A análise dos dados de sequenciação de RNA gerado a partir de tecidos humanos revelou uma região situada entre a terminação 3' do *SNORD115* cluster e *SNORD109B* (Figuras 7A - 7G) que continha elementos semelhantes aos observados no rato; no entanto, a análise comparativa dessa região indicou que havia pouca ou nenhuma conservação de sequência entre humanos e roedores.

Materiais e métodos

Sequenciação de RNA

[0143] O RNA foi isolado usando Qiagen RNAeasy Plus (74136, Qiagen, Hilden, Alemanha). A concentração de RNA foi determinada usando Quantificação Fluorométrica Qubit (Thermo Fisher Scientific) e a qualidade do RNA foi avaliada usando um 4200 Agilent TapeStation (Agilent, Santa Clara, CA). As bibliotecas de sequenciação de RNA foram geradas usando o kit Illumina TruSeq Stranded Total RNA (20020597, Illumina, Inc., San Diego, CA) de acordo com o protocolo do fabricante. O sequenciamento de 75 pares de bases foi realizado usando um NextSeq 500 (Illumina, San Diego, CA) no núcleo do Instituto Texas A&M de Ciências e Ciências Genômicas e Society Genomics. As leituras de sequenciação bruta foram processadas usando CASAVA. As sequências FASTQ resultantes foram examinadas usando FASTQC.

[0144] As sequências do FASTQ foram alinhadas ao conjunto de referência humana (hg19) usando Hisat2 (versão 2.1.0), com as seguintes configurações: --fr. Sequências SAM alinhadas foram então convertidas em sequências BAM binárias, indexadas e classificadas usando Samtools. Arquivos BAM de amostras individuais foram mesclados e indexados usando o Samtools. As sequências alinhadas foram filtradas usando o comando view no Samtools para remover leituras alinhadas não exclusivamente (qualidade > 1).

[0145] Um conjunto de transcrição foi gerado para amostras mescladas usando Stringtie (versão 1.3.4.d), com as seguintes opções: (encalhado) --rf -f 0 -j 2. Transcrições de exon único foram excluídas das transcrições montadas usando gffread (GFF) Universidade Johns Hopkins, Centro de Biologia Computacional).

Exemplo 3: Identificação de ASOs principais

[0146] Dezoito ASOs visando as sequências alvo ASO-4 e ASO-6.1 e consistindo em diferentes projetos de backbone e modificações de RNA foram projetados para identificar potenciais ASOs principais (Tabela 17). IPSC normal derivadas de neurônios GABAérgicos () foram tratados com um ponto 10 ½ log curva dose-resposta de cada ASO para comparar os valores de IC₅₀ e E_{max}. As células precursoras neurais foram diferenciadas em neurônios por 18 DIV e, em seguida, tratadas com ASOs de resposta à dose de 10 pontos ½ [1 nM, 3 nM, 10 nM, 30 nM, 100 nM, 300 nM, 1 µM, 3 µM, 10 µM e 30 µM (n = 2)]. Aos 24 DIV, os níveis de RNA no estado estacionário de *UBE3A*-AS foram medidos e as curvas de resposta à dose ajustadas como descrito acima (Figura 8A e Tabela 18). As curvas de resposta à dose foram significativamente diferentes (teste de paralelismo: F_(51,606) = 7,86, p <0,0001; R² = 0,90), assim potências relativas não foram estimados. O agrupamento hierárquico das curvas ajustadas revelou 3 agrupamentos de ASOs, com o agrupamento 1 representando os 9 ASOs mais potentes (Figuras 8B e 8C). Análise do Cluster 1 indicou que o ASO tinha curvas semelhantes (teste de paralelismo:

$F_{(24,299)} = 1,01$, $p = 0,5$; $R^2 = 0,93$), e que ASO-4.4.PS.L foi, pelo menos, 3 vezes tão potente quanto os outros ASOs (Tabela 19). Outras análises, no entanto, indicou que ASO-4.4.PS.L, ASO-6.1.PS.M, e ASO-6.1.PO-1.M tinha equivalentes valores de IC_{50} , enquanto que os outros ASOs foram ligeiramente menos potente (Tabela 20) Com base nas potências relativas e nos critérios de seleção interna, ASO-4.4.PS.L e ASO-6.1.PO-1.O foram investigados mais detalhadamente.

Tabela 18. IC_{50} e E_{max} de ASOs Candidatas

ASO	IC_{50} (M)	IC_{50} IC95% (M)	E_{max}	E_{max} IC95%	$30 \mu M$ (média)	Grup o		
ASO-4.4.PS.L	2.66E-08	3,66E-09	1.93E-07	0,0	-0,23	0,23	0,05	1
ASO-6.1.PS.M	1,47E-07	6.80E-08	3.19E-07	-0,05	-0,21	0,12	0,02	1
ASO-6.1.PO-1.M	1,66E-07	7.15E-08	3,84E-07	-0,02	-0,20	0,16	0,04	1
ASO-4.4.PO-1.L	2.26E-07	8.95E-08	5,71E-07	0,04	-0,17	0,25	0,1	1
ASO-4.0.PO-1.M	2,78E-07	1,52E-07	5.08E-07	0,02	-0,11	0,15	0,05	1
ASO-4.0.PS.M	3.00E-07	1.80E-07	5.00E-07	0,05	-0,06	0,15	0,05	1
ASO-6.1.PO-1.O	3.15E-07	7,98E-08	1.24E-06	-0,1	-0,50	0,26	0,04	1
ASO-6.1.PS.L	3,62E-07	1.37E-07	9.57E-07	-0,07	-0,32	0,18	0,04	1
ASO-6.1.PS.O	5.32E-07	1.20E-07	2.36E-06	-0,2	-0,67	0,29	0,05	1
ASO-6.1.PO-2.L	7.34E-07	5.35E-08	1.01E-05	0,3	-0,11	0,76	0,4	2

ASO-4.0.PO-1.O	7.66E-07	3,70E-07	1.59E-06	0,05	-0,12	0,23	0,1	2
ASO-4.0.PS.O	1.27E-06	5.13E-07	3.13E-06	0,06	-0,20	0,31	0,1	2
ASO-6.1.PO-1.L	1.89E-06	4.42E-07	8.06E-06	0,03	-0,34	0,39	0,2	2
ASO-4.0.PO-2.O	1.30E-04	1,65E-17	1.03E+09	-0,3	-9,51	8,94	0,6	2
ASO-6.1.PO-2.M	2.69E-04	9,85E-16	7.37E+07	-1,2	-13,16	10,77	0,3	2
ASO-4.4.PO-2.L	3,27E+01	0 0	Inf	-2,7	-577	571	0,6	3
ASO-4.0.PO-2.M	1,14E+05	0 0	Inf	-76	-74.958.	74.805	0,5	3
ASO-6.1.PO-2.O	1,93E+10	0 0	Inf	- 556 9	- 85.963.65 0	85.952.51 0	0,3	3
Estimativas de parâmetros de modelo completo a partir do modelo de regressão logística de 4 parâmetros (Hill). IC50 e intervalos de confiança representam a concentração molar. Os valores de Emax e 30 uM representam os níveis normalizados de RNA de UBE3A-AS em relação ao veículo. Abreviações: Inf, infinito; IC 95%, intervalos de confiança de 95%								

Tabela 19. Potência relativa de ASOs no Cluster 1

ASO	IC ₅₀ (M)	Potência relativa	Erro padrão
ASO-4.4.PS.L	5.03E-08	1	0 0
ASO-6.1.PS.M	1,53E-07	0,3	0,08
ASO-6.1.PO-1.M	1.77E-07	0,3	0,07
ASO-6.1.PO-1.O	1.99E-07	0,3	0,06
ASO-4.0.PS.M	2.62E-07	0,2	0,05
ASO-4.0.PO-1.M	2,78E-07	0,2	0,04
ASO-6.1.PS.L	2,81E-07	0,2	0,04
ASO-4.4.PO-1.L	3.22E-07	0,2	0,04
ASO-6.1.PS.O	4.32E-07	0,1	0,03

Estimativas de parâmetros de modelo paralelo a partir do modelo de regressão logística de 4 parâmetros (Hill).

Abreviações: M, molar; Padrão, padrão

Tabela 20. Equivalência de ASOs no Cluster 1 em relação ao ASO-4.4.PS.L

ASO	ASO	Relação IC ₅₀	Limites inferior e superior de confiança		Limite excedido
ASO-4.4.PS.L	ASO-6.1.PO-1.M	0,90	0,81	0,98	Equivalente
	ASO-6.1.PS.M	0,90	0,82	0,98	Equivalente
	ASO-4.0.PO-1.M	0,87	0,79	0,94	Mais baixo
	ASO-4.0.PS.M	0,86	0,79	0,94	Mais baixo
	ASO-4.4.PO-1.L	0,88	0,79	0,96	Mais baixo
	ASO-6.1.PO-1.O	0,86	0,77	0,95	Mais baixo
	ASO-6.1.PS.L	0,85	0,77	0,93	Mais baixo
	ASO-6.1.PS.O	0,83	0,73	0,92	Mais baixo
Dois testes unilaterais					

Materiais e métodos

[0147] Os métodos foram semelhantes aos descritos no Exemplo 2, salvo indicação em contrário.

Exemplo 4: Análise farmacodinâmica de ASO-6.1-PO-1.O e ASO-4.4.PS.L em neurônios da síndrome de Angelman iPSC

[0148] As potências de ASO-6.1.PS.O e ASO-4.4.PS.L foram então examinadas em neurônios derivados de iPSC de um paciente com síndrome de Angelman com uma deleção derivada materna da região 15q11-q13. As células-tronco pluripotentes induzidas foram diferenciadas em neurônios e, em seguida, tratadas com uma curva de resposta à dose de 10 pontos ½ log de ASO-6.1.PO-1.O e ASO-4.4.PS.L [1 nM, 3 nM, 10 nM, 30 nM, 100 nM, 300 nM, 1 µM, 3 µM, 10 µM e 30 µM (n = 3)]. Seis dias após o tratamento, os níveis de RNA no estado estacionário de *UBE3A-AS* foram medidos e as curvas de resposta à dose foram ajustadas como descrito acima (Figura 9A). As curvas de resposta à dose foram

semelhantes entre ASOs (teste de paralelismo: $F_{(3,132)} = 1,07$, $p = 0,4$, $R^2 = 0,82$), com ASO-4.4.PS.L (437 nM) ser aproximadamente 2,7 vezes mais potente que ASO-6.1.PO-1.O (1,22 uM). As valores de IC_{50} eram equivalentes [ASO-6.1.PO-1.O / ASO-4.4.PS.L IC_{50} relação: = 0,96 (limite de confiança inferior = 0,9; confiança Limite superior = 1,0)]. Os valores de E_{max} foram semelhantes (30 uM: ASO-4.4.PS.L = $0,01 \pm 0,0007$; ASO-6.1.PO-1.O = $0,05 \pm 0,004$) mas não considerado equivalente devido aos intervalos de confiança [ASO-6.1.PO-1.O / ASO-4.4.PS.LE max relação: = -9,1 (Baixa confiança limite = -224; confiança superior limite = 205)].

Materiais e métodos

[0149] Os métodos foram semelhantes aos descritos no Exemplo 2, salvo indicação em contrário.

A síndrome de Angelman induziu neurônios derivados de células-tronco pluripotentes

[0150] As células iPS da síndrome de Angelman (iPSCs AG1-0) (ECN001, Kerafast, Boston, MA) foram co-cultivadas em fibroblastos embrionários murinos irradiados em meio de células-tronco embrionárias humanas [DMEM / F12 (11330-057, Gibco Biosciences, Dublin, Irlanda), 20% de substituição Knockout soro (10828-028, Thermo Fisher Scientific), 1X aminoácidos não essenciais, 2 mM de L-glutamina, 7 μ l / ml de 2-mercaptopetanol, e 4 μ g mL de fator de Crescimento de fibroblastos / básico]. Para a primeira passagem, as células AG1-0 foram passadas de acordo com o manual do produto para o meio PluriSTEM Human ES / iPS (SCM130, Millipore Sigma, Burlington, MA), que é livre de alimentador e utiliza Dispase II (SCM133, Millipore Sigma) para dissociar células. A matriz qualificada com hESC Matrigel™ (354277, Corning BD Biosciences, Corning, NY) foi usada como uma matriz extracelular. Na segunda passagem, a matriz foi trocada para vitronectina (CC130, Millipore Sigma). Durante passagens subsequentes, as áreas de diferenciação foram removidas manualmente até que células diferenciadas

representassem aproximadamente <5% das colônias. Após quatro passagens subsequentes, as células AG1-0 foram diferenciadas usando o Kit de Neurogênese Millipore ES / iPS (SCR603, SCM110 e SCM111), mas sem vitronectina como matriz extracelular. A passagem inicial foi realizada com EZ-LiFT (SCM139, Millipore Sigma) para obter células iPS de alta qualidade. As células progenitoras neurais foram congeladas no estágio zero (P₀) e subsequentemente descongeladas para diferenciação. A diferenciação foi realizada em placas de cultura estéreis revestidas com poli-D-lisina (10 µg / ml) e laminina [10 µg / ml (23017-015, Gibco) em meio de diferenciação (SCM111) durante 10 dias de diferenciação. Em alguns casos, as células foram diferenciadas em Cellular Dynamics Maintenance Medium (NRM-100-121-001, Cellular Dynamics International, Madison, WI).

Exemplo 5: Análise de expressão do transcrito policistrônico de PWS nos neurônios iPSC da síndrome de Angelman tratados com ASO-6.1-PO-1.O e ASO-4.4.PS.L

[0151] Para determinar se ASO-4.4.PS.L e ASO-6.1.PO-1.O afetam os níveis de transcritos de RNA codificados pelo transcrito policistrônico do PWS, o sequenciamento de RNA foi realizado em células AS iPSC tratadas com cada ASO e no estado estacionário os níveis de ARN de *SNURF*, *SNRPN*, o *SNORD116* transcrição hospedeiro-gene (*SNHG116*), o *SNORD116* snoRNAs, *IPW*, o *SNORD115* transcrição hospedeiro-gene (*SNHG115*), o *SNORD115* snoRNAs, e *UBE3A-aS* foram quantificados. Os níveis de RNA no estado estacionário *UBE3A* também foram medidos. As células iPSC da síndrome de Angelman foram diferenciadas em neurônios, como descrito acima, e depois tratadas com veículo (1% H₂O, n = 3), ASO-4.4.PS.L (30 u µM, n = 3) e ASO-6.1.PO-1.O (30 µM, n = 3). Seis dias após o tratamento, foi realizada a sequenciação de RNA RNA no RNA total (esgotado o rRNA) isolado das culturas. Para gerar anotações dos transcritos *SNHG116*, *SNHG115* e *UBE3A-AS*, um transcriptoma foi

montado a partir dos dados de RNA-seq do veículo e depois incorporado na anotação do gene de referência. Em relação ao veículo, os níveis de RNA no estado estacionário

de *SNURF*, *SNRPN*, *SNHG116*, snoRNAs *SNORD116* e snoRNAs *SNORD115* foram semelhantes e não significativamente diferentes. O ASO-4.4.PS.L, mas não o ASO-6.1.PO-1.O, reduziu os níveis de *IPW* (1,5 vezes), mas o efeito não foi significativo. ASO-6.1.PO-1.O e ASO-4.4.PS.L reduziram significativamente os níveis de RNA *SNHG115* e *UBE3A-AS*. ASO-6.1.PO-1.O e ASO-4.4.PS.L tiveram um efeito semelhante nos níveis de *SNHG115*; no entanto, o ASO-4.4.PS.L teve um efeito muito maior nos níveis de RNA do *UBE3A-AS* do que o ASO-6.1.PO-1.O (ASO-4.4.PS.L: alteração de -6,1 vezes; ASO-6.1.PO-1.O: alteração de -2,8 vezes). O tratamento com ASO aumentou os níveis de RNA *UBE3A* em aproximadamente 1,2 vezes, mas o efeito não foi significativo (Figura 10 e Tabela 21).

Tabela 21. Efeito do tratamento com ASO nos níveis de RNA dos transcritos policistrônicos de PWS e *UBE3A*

Gene	Tratamento	Diferença	Erro padrão	Relação t	P ajustado
<i>SNURF</i>	ASO-6.1.PO-1.O	-0,53	0,51	-1,02	0,5
	ASO-4.4.PS.L	0,49	0,51	0,96	0,6
<i>SNRPN</i>	ASO-6.1.PO-1.O	0,03	0,11	0,30	0,9
	ASO-4.4.PS.L	-0,02	0,11	-0,16	1,0
<i>SNHG116</i>	ASO-6.1.PO-1.O	-0,07	0,10	-0,75	0,7
	ASO-4.4.PS.L	-0,24	0,10	-2,49	0,08
<i>SNORD116</i>	ASO-6.1.PO-1.O	-0,04	0,46	-0,08	1,0
	ASO-4.4.PS.L	0,27	0,45	0,60	0,8
<i>IPW</i>	ASO-6.1.PO-1.O	0,18	0,37	0,49	0,8

	ASO-4.4.PSL	-0,49	0,37	-1,33	0,4
SNH115G	ASO-6.1.PO-1.O	-0,55	0,09	-5,92	0,002
	ASO-4.4.PSL	-0,58	0,09	-6,33	0,001
SNORD115	ASO-6.1.PO-1.O	0,24	0,52	0,45	0,8
	ASO-4.4.PSL	-0,26	0,49	-0,54	0,8
UBE3A-AS	ASO-6.1.PO-1.O	-1,48	0,06	-24,17	<0,0001
	ASO-4.4.PSL	-1,94	0,06	-31,56	<0,0001
UBE3A	ASO-6.1.PO-1.O	0,74	0,48	1,53	0,3
	ASO-4.4.PSL	0,90	0,48	1,88	0,2
ANOVA unidirecional com o teste de comparação múltipla de Dunnett em relação ao veículo.					

Materiais e métodos

[0152] Os métodos foram semelhantes aos descritos no Exemplo 4, salvo indicação em contrário.

Análise de expressão diferencial de RNAs de PWS

[0153] Os valores normalizados de FPKM (fragmentos por mil por milhão) da anotação do gene RefSeq serão estimados usando Cuffnorm com as configurações padrão e a seguinte opção: -u. Os valores de FPKM de cada anotação de gene foram determinados para cada amostra a partir do arquivo de saída e utilizados para estatísticas descritivas e inferenciais.

Exemplo 6: Análise farmacodinâmica de ASO-6.1-PO-1.O e ASO-4.4.PSL em macacos Cynomolgus

[0154] As regiões alvo ASO-4 e ASO-6 são conservadas em várias espécies de primatas não humanos (NHP), permitindo assim estudos de segurança e eficácia em um modelo animal de grande porte. Para examinar a eficácia de ASO-

4.4.PS.L e ASO-6.1.PO-1.O no sistema nervoso central (SNC), os ASOs foram entregues aos macacos *Cynomolgus* por punção lombar intratecal. Foi administrada aos animais uma única injeção em bolus do veículo (solução salina a 0,9%, n = 5), ASO-6.1.PO-1.O (10 mg, n = 3) e ASO-4.4.PS.L (10 mg, n = 3). Vinte e oito dias após o tratamento, os tecidos do sistema nervoso central (SNC) foram coletados e os níveis de RNA no estado estacionário de *UBE3A-AS* foram medidos. No geral, o ASO-4.4.PS.L teve um efeito maior nos níveis de RNA do *UBE3A-AS* do que o ASO-6.1.PO-1.O (Tabela 22). O ASO-4.4.PS.L reduziu o RNA *UBE3A-AS* na maioria das regiões do SNC, com grandes efeitos no lobo temporal, córtex motor primário, ponte, medula, hipocampo, *globus pallidus*, córtex frontal (corona radiata), córtex pré-frontal e coluna lombar cordão. Da mesma forma, o ASO-6.1.PO-1.O reduziu os níveis de RNA do *UBE3A-AS* na maioria das regiões do SNC, com grandes efeitos observados na ponte, núcleo oculomotor e medula espinhal lombar (Figura 11 e Tabela 23).

Tabela 22. Tamanho do efeito do tratamento com ASO nos níveis de RNA *UBE3A-AS* no CNS

Tratamento	Tratamento*	D de Cohen	Intervalos de confiança de 95%	FDR
Veículo	ASO-4.4.PS.L	1.4	1.0	1.8
ASO-6.1.PO-1.O	ASO-4.4.PS.L	1.0	0,6	1.5
Veículo	ASO-6.1.PO-1.O	0,3	-0,06	0,7

Teste t de Student com valores de P ajustados ao FDR

Tamanhos de efeito d de Cohen: 0,2, pequeno; 0,5, meio; 0,8, grande; 1,2, muito grande

Abreviações: FDR, taxa de descoberta falsa

Tabela 23. Efeito do tratamento com ASO nos níveis de RNA *UBE3A-AS* nas regiões do SNC

Região CNS	ASO	Diferença	Erro padrão	Relação t	P ajustado
Núcleo Caudado	ASO-6.1.PO-1.O	0,10	0,22	0,46	0,9

	ASO-4.4.PSL	-0,21	0,22	-0,94	0,6
Cerebelo	ASO-6.1.PO-1.O	-0,11	0,09	-1,15	0,5
	ASO-4.4.PSL	-0,05	0,09	-0,53	0,8
Côrtex frontal	ASO-6.1.PO-1.O	0,01	0,27	0,04	0,9
	ASO-4.4.PSL	-0,71	0,27	-2,66	0,05
Côrtex frontal (Corona radiata)	ASO-6.1.PO-1.O	-0,08	0,22	-0,34	0,9
	ASO-4.4.PSL	-0,62	0,22	-2,79	0,04
Globus Pallidus	ASO-6.1.PO-1.O	0,10	0,24	0,40	0,9
	ASO-4.4.PSL	-0,38	0,24	-1,54	0,3
Hipocampo	ASO-6.1.PO-1.O	-0,19	0,21	-0,91	0,6
	ASO-4.4.PSL	-0,57	0,21	-2,66	0,05
Medula Espinhal (Lombar)	ASO-6.1.PO-1.O	-0,32	0,20	-1,63	0,2
	ASO-4.4.PSL	-0,87	0,20	-4,46	0,004
Medula	ASO-6.1.PO-1.O	-0,24	0,20	-1,16	0,45
	ASO-4.4.PSL	-0,32	0,20	-1,59	0,3
Núcleo Oculomotor	ASO-6.1.PO-1.O	-0,37	0,29	-1,27	0,4
	ASO-4.4.PSL	-0,18	0,29	-0,62	0,8
Pons	ASO-6.1.PO-1.O	-0,27	0,21	-1,30	0,4
	ASO-4.4.PSL	-0,47	0,21	-2,25	0,1
Motor Cortex	ASO-6.1.PO-1.O	-0,19	0,30	-0,65	0,8
	ASO-4.4.PSL	-0,59	0,30	-1,99	0,1
Putamen	ASO-6.1.PO-1.O	0,07	0,15	0,44	0,9
	ASO-4.4.PSL	-0,04	0,15	-0,25	0,9

Lobo temporal	ASO-6.1.PO-1.O	0,13	0,25	0,54	0,8
	ASO-4.4.PSL	-0,59	0,25	-2,39	0,08
Thalamus	ASO-6.1.PO-1.O	-0,02	0,14	-0,14	0,9
	ASO-4.4.PSL	-0,20	0,14	-1,46	0,3
ANOVA unidirecional com o teste de comparação múltipla de Dunnett em relação ao veículo.					

Materiais e métodos

Administração de ASOs

[0155] Os estudos do NHP foram realizados nos Laboratórios Northern Biomedical Research e Charles River, usando protocolos aprovados pelos respectivos Comitês Institucionais de Cuidado e Uso de Animais. Macacos machos e fêmeas *Cynomolgus* (*Macaca fascicularis*) pesando 2-4 kg foram anestesiados e dose única de 1 mL de ASO ou veículo foi administrada por punção lombar intratecal. A solução de dosagem foi preparada por dissolução de ASO liofilizado no artigo de controle do veículo (cloreto de sódio a 0,9%) e foi filtrada através de um filtro de 0,2 µm. CNS e amostras da medula espinal foram colhidas, e o SNC foi seccionada em 4- mm corte coronal. As amostras de tecido foram congeladas rapidamente e armazenadas a -80 °C até o isolamento do RNA.

Isolamento de RNA

[0156] Foi realizado um punção de tecido de 4 mm em cada região de interesse, da qual aproximadamente metade foi usada para isolamento de RNA. O isolamento do RNA foi realizado usando o kit Qiagen RNeasy Plus Mini (74136, Qiagen) com ruptura de tecido e lise realizada com esferas de aço inoxidável de 5 mm em um TissueLyser II. O ARN foi eluída em dois volumes de 30 µl de água, para um volume total de eluição de 60 µl. O RNA foi quantificado usando o Qubit com o ensaio RNA XR (Q33224, Thermo Fisher Scientific). O ADNc foi sintetizado a partir de 2 µg

de ARN de entrada utilizando o kit High Capacity ARN-a-cDNA (4387406, Thermo Fisher Scientific) num volume total de reacção de 50 µl.

Análise dos níveis de RNA UBE3A-AS nos tecidos

[0157] Os níveis de RNA de *UBE3A-AS* do macaco *Cynomolgus* foram estimados usando PCR quantitativo de transcrição reversa SYBR Green (qRT-PCR). O volume total da reação foi de 10 µl, incluindo 2 µl de cDNA, 1X PowerUp SYBR Green Master mix (A25741, Thermo Fisher Scientific) e 500 nM de cada primer (frente e verso). As condições de ciclismo foram de 2 minutos a 50 °C, 2 minutos a 95 °C e 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C e 1 minuto a 60 °C, com leituras realizadas na etapa de 60 °C de cada ciclo. As reações foram realizadas em um termociclador BIORAD T1000 CFX96, com controle interno (*PPIA*, encaminhamento: GTCTCCTTCGAGCTGTTGC (SEQ ID NO: 503); reverso: CCTTTCTCTCCAGTGCTCAGA (SEQ ID NO: 504)) e alvo (*UBE3A-AS*, encaminhamento: CCTGAC (SEQ ID NO: 505); reverso: GGATCAGACTCCAGGCCTTC (SEQ ID NO: 506)) reações realizadas separadamente. Os dados foram recuperados e a análise inicial foi realizada com o software BIORAD CFX Maestro, com análises estatísticas aprofundadas realizadas com Excel e JMP.

Exemplo 7: ASOs visando limites exônicos de transcrições *UBE3A-AS* emendadas

[0158] Em algumas modalidades, a sequência alvo é um limite exônico envolvendo os exons *UBE3A-AS* 1-5 e *SNORD109B* exons 1-2. As sequências alvo consistem em 38 nucleotídeos (19 nucleotídeos de cada exon) centrados no limite exônico de cada exon (19 nucleotídeos representando as terminações 5' e 3' dos exons adjacentes). Havia 12 segmentos de sequências, com limites exônicos envolvendo os segmentos 1-2, 2-3, 3-4, 5-6, 7-8, 9-10 e 11-12. As coordenadas cromossômicas são fornecidas na Tabela 24. Uma única

sequência de junção mesclada foi criada que mostra os exons emendados (|, junção exônica) e as sequências exônicas intervenientes ([]). ASOs (20, 19 e 18-mer) direcionados para as junções exônicas são fornecidos na Tabela 25.

Sequência de junção mesclada

AATGAAATCTTCTGATTG		TAAGACATGCTGCCAAGAG	[]
ATTAGTTTACACCTTCAG		GATAAAGACTGCTGAGAAG	[]
GTTTAAGGATGCTATTCTG		AAAAGACTGTGGAGGAAGA	[]
TTAAGGAAACCATCTCTGG		GATAAGGATGACTGAGGAA	[]
ATTTAAGGATGCCACTCTG		GTTAAAAGCTGAAACAAC	[]
GAAACTTCAGGGAAAAGAG AAGGCCTGGAATCTGATCC (SEQ ID NO: 489).			

| = Junção exônica 3'-5'

[] = sequência exônica interveniente

Tabela 24. Cromossomo 15 coordenadas de junções exônicas direcionadas

Segmento	Começar	Fim	Região Exônica
1	25, 511, 743	25, 511, 761	3'
2	25, 512, 059	25, 512, 079	5'
3	25, 512, 175	25, 512, 191	3'
4	25, 513, 475	25, 513, 493	5'
5	25, 513, 582	25, 513, 600	3'
6	25, 514, 752	25, 514, 770	5'
7	25, 514, 863	25, 514, 881	3'
8	25, 516, 564	25, 516, 582	5'
9	25, 516, 663	25, 516, 681	3'
10	25, 522, 514	25, 522, 532	5'
11	25, 522, 537	25, 522, 556	3'
12	25, 523, 994	25, 524, 012	5'
Coordenadas do cromossomo humano 15 (conjunto de referência hg19)			

Tabela 25. Lista de ASOs de junção e regiões de destino correspondentes

Tamanho ASO	Sequência alvo (5' -3')		Sequência ASO (5' -3')	
20 anos	GAAACCAUCUCUGGGAUA AG	SE Q ID NO: 393	CTTATCCCAGAGATGGTT TC	SE Q ID NO: 441
	AAACCAUCUCUGGGAUAA GG	SE Q ID NO: 394	CCTTATCCCAGAGATGGT T	SE Q ID NO: 442

	AACCAUCUCUGGGAUAGA	SEQ ID NO: 395	TCCTTATCCCAGAGATGGT	SEQ ID NO: 443
	ACCAUCUCUGGGAUAGAU	SEQ ID NO: 396	ATCCTTATCCCAGAGATG	SEQ ID NO: 444
	CCAUCUCUGGGAUAGGA	SEQ ID NO: 397	CATCCTTATCCCAGAGAT	SEQ ID NO: 445
	CAUCUCUGGGAUAGGAU	SEQ ID NO: 398	TCATCCTTATCCCAGAGA	SEQ ID NO: 446
	AUCUCUGGGAUAGGAUG	SEQ ID NO: 399	GTCATCCTTATCCCAGAG	SEQ ID NO: 447
	UCUCUGGGAUAGGAUGA	SEQ ID NO: 400	AGTCATCCTTATCCCAGA	SEQ ID NO: 448
	CUCUGGGAUAGGAUGAC	SEQ ID NO: 401	CAGTCATCCTTATCCCAG	SEQ ID NO: 449
	UCUGGGAUAGGAUGACU	SEQ ID NO: 402	TCAGTCATCCTTATCCCA	SEQ ID NO: 450
	CUGGGAUAGGAUGACUG	SEQ ID NO: 403	CTCAGTCATCCTTATCCC	SEQ ID NO: 451
	UGGGAUAGGAUGACUGA	SEQ ID NO: 404	CCTCAGTCATCCTTATCC	SEQ ID NO: 452

		NO: 404		NO: 452
	GGGAUAAGGAUGACUGAG GA	SE Q ID NO: 405	TCCTCAGTCATCCTTATC CC	SE Q ID NO: 453
	GGAUAGGAUGACUGAGG AA	SE Q ID NO: 406	TTCCTCAGTCATCCTTAT CC	SE Q ID NO: 454
	GCUGAAACAAACUGAAACU UC	SE Q ID NO: 407	GAAGTTTCAGTTGTTCA GC	SE Q ID NO: 455
	GAAACAAACUGAAACUUCA GG	SE Q ID NO: 408	CCTGAAGTTTCAGTTGTT TC	SE Q ID NO: 456
	AAACAAACUGAAACUUCAG GG	SE Q ID NO: 409	CCCTGAAGTTTCAGTTGT TT	SE Q ID NO: 457
	AACAAACUGAAACUUCAGG GA	SE Q ID NO: 410	TCCCTGAAGTTTCAGTTG TT	SE Q ID NO: 458
	ACAACUGAAACUUCAGGG AA	SE Q ID NO: 411	TTCCCTGAAGTTTCAGTT GT	SE Q ID NO: 459
	CAACUGAAACUUCAGGGAA AA	SE Q ID NO: 412	TTTCCCTGAAGTTTCAGT TG	SE Q ID NO: 460
	ACUGAAACUUCAGGGAAA AG	SE Q ID NO: 413	CTTTCCCTGAAGTTCA GT	SE Q ID NO: 461

19 anos	AACCAUCUCUGGGAUAG G	SE Q ID NO: 414	CCTTATCCCAGAGATGGT	SE Q ID NO: 462
	ACCAUCUCUGGGAUAGG A	SE Q ID NO: 415	TCCTTATCCCAGAGATGGT	SE Q ID NO: 463
	CCAUCUCUGGGAUAGGA U	SE Q ID NO: 416	ATCCTTATCCCAGAGATG G	SE Q ID NO: 464
	CAUCUCUGGGAUAGGAU G	SE Q ID NO: 417	CATCCTTATCCCAGAGAT G	SE Q ID NO: 465
	AUCUCUGGGAUAGGAUG A	SE Q ID NO: 418	TCATCCTTATCCCAGAGA T	SE Q ID NO: 466
	UCUCUGGGAUAGGAUGA C	SE Q ID NO: 419	GTCATCCTTATCCCAGAG A	SE Q ID NO: 467
	CUCUGGGAUAGGAUGAC U	SE Q ID NO: 420	AGTCATCCTTATCCCAGA G	SE Q ID NO: 468
	UCUGGGAUAGGAUGACU G	SE Q ID NO: 421	CAGTCATCCTTATCCCAG A	SE Q ID NO: 469
	CUGGGAUAGGAUGACUG A	SE Q ID NO: 422	TCAGTCATCCTTATCCCA G	SE Q ID NO: 470
	UGGGAUAGGAUGACUGA G	SE Q ID	CTCAGTCATCCTTATCCC A	SE Q ID

		NO: 423		NO: 471
	GGGAUAAGGAUGACUGAG G	SE Q ID NO: 424	CCTCAGTCATCCTTATCC C	SE Q ID NO: 472
	GGAUAGGAUGACUGAGG A	SE Q ID NO: 425	TCCTCAGTCATCCTTATC C	SE Q ID NO: 473
	AACAAACUGAAACUUCAGG G	SE Q ID NO: 426	CCCTGAAGTTTCAGTTGT T	SE Q ID NO: 474
	ACAACUGAAACUUCAGGG A	SE Q ID NO: 427	TCCCTGAAGTTTCAGTTG T	SE Q ID NO: 475
	CAACUGAAACUUCAGGGA A	SE Q ID NO: 428	TTCCCTGAAGTTTCAGTT G	SE Q ID NO: 476
	CAACUGAAACUUCAGGG A	SE Q ID NO: 429	TTCCCTGAAGTTTCAGTT G	SE Q ID NO: 477
18 anos	CCAUCUCUGGGAUAGGA	SE Q ID NO: 430	TCCTTATCCCAGAGATGG	SE Q ID NO: 478
	CAUCUCUGGGAUAGGAU	SE Q ID NO: 431	ATCCTTATCCCAGAGATG	SE Q ID NO: 479
	AUCUCUGGGAUAGGAUG	SE Q ID NO: 432	CATCCTTATCCCAGAGAT	SE Q ID NO: 480

	UCUCUGGGAUAGGAUGA	SE Q ID NO: 433	TCATCCTTATCCCAGAGA	SE Q ID NO: 481
	CUCUGGGAUAGGAUGAC	SE Q ID NO: 434	GTCATCCTTATCCCAGAG	SE Q ID NO: 482
	UCUGGGAUAGGAUGACU	SE Q ID NO: 435	AGTCATCCTTATCCCAGA	SE Q ID NO: 483
	CUGGGAUAGGAUGACUG	SE Q ID NO: 436	CAGTCATCCTTATCCCAG	SE Q ID NO: 484
	UGGGAUAGGAUGACUGA	SE Q ID NO: 437	TCAGTCATCCTTATCCCA	SE Q ID NO: 485
	GGGAUAGGAUGACUGAG	SE Q ID NO: 438	CTCAGTCATCCTTATCCC	SE Q ID NO: 486
	GGAUAGGAUGACUGAGG	SE Q ID NO: 439	CCTCAGTCATCCTTATCC	SE Q ID NO: 487
	ACAACUGAAACUUCAGGG	SE Q ID NO: 440	CCCTGAAGTTTCAGTTGT	SE Q ID NO: 488

Exemplo 8: RNAs de guia siRNA, shRNA e CRISPR visando os exons de UBE3a-AS 1-5

[0159] Como observado acima, em algumas modalidades, o oligonucleotídeo divulgado é um ácido nucleico funcional, como um siRNA, shRNA ou gRNA da nuclease, que inibe, modifica ou exclui a sequência de ácido nucleico alvo.

[0160] Exemplos de siRNA direcionados aos exons de UBE3a-AS 1-5 são fornecidos na Tabela 26. Exemplos de shRNA direcionados aos exons de UBE3a-AS 1-5 são fornecidos na Tabela 27. Exemplos de gRNA direcionados aos exons de UBE3a-AS 1-5 são fornecidos na Tabela 28.

Tabela. 26 siRNA visando os exons de UBE3a-AS 1-5

Sequência alvo	siRNA	
CCCAGGUGUCCUUUAUGAA	SEQ ID NO: 507	TTCATTAAAGGACACCTGGG
CCAGGUGUCCUUUAUGAAA	SEQ ID NO: 508	TTTCATTAAAGGACACCTGG
UGAAAAUGCUCUUGACACCA	SEQ ID NO: 509	TGGTGTCAAGAGCATTTC
GAAAAUGCUCUUGACACCAA	SEQ ID NO: 510	TTGGTGTCAAGAGCATTTC
AAAUGCUCUUGACACCAAUG	SEQ ID NO: 511	CATTGGTGTCAAGAGCATT
AGAUCAGUAGCUUCCUUAC	SEQ ID NO: 512	GTAAAGGAAGCTACTGATCT
UCAGUAGCUUCCUUACCGA	SEQ ID NO: 513	TCGGTAAAGGAAGCTACTGA
UCUAGAACAUUGAGCUAUGG	SEQ ID NO: 514	CCATAGCTCAATGTTCTAGA

CUAGAACAUUGAGCUAUGGA	SEQ ID NO: 515	TCCATAGCTCAATGTTCTAG	SEQ ID NO: 546
AACAUUGAGCUAUGGAAGAC	SEQ ID NO: 516	GTCTTCCATAGCTCAATGTT	SEQ ID NO: 547
ACAUUGAGCUAUGGAAGACU	SEQ ID NO: 517	AGTCTTCCATAGCTCAATGT	SEQ ID NO: 548
CUAUGGAAGACUCCCACCUA	SEQ ID NO: 518	TAGGTGGGAGTCTTCCATAG	SEQ ID NO: 549
UAUGGAAGACUCCCACCUAA	SEQ ID NO: 519	TTAGGTGGGAGTCTTCCATA	SEQ ID NO: 550
CAAGUGCUACCGCACAGGCA	SEQ ID NO: 520	TGCCTGTGCGGTAGCACTTG	SEQ ID NO: 551
AAGUGCUACCGCACAGGCAU	SEQ ID NO: 521	ATGCCTGTGCGGTAGCACTT	SEQ ID NO: 552
UACCGCACAGGCAUGCUGCA	SEQ ID NO: 522	TGCAGCATGCCTGTGCGGT	SEQ ID NO: 553
CAGGCAUGCUGCAGUGAAUU	SEQ ID NO: 523	AATTCACTGCAGCATGCCTG	SEQ ID NO: 554
AGGCAUGCUGCAGUGAAUUU	SEQ ID NO: 524	AAATTCACTGCAGCATGCCT	SEQ ID NO: 555
ACCGUUGUUUAAGGAUGCUA	SEQ ID NO: 525	TAGCATCCTAAACAACGGT	SEQ ID NO: 556
CCGUUGUUUAAGGAUGCUAU	SEQ ID	ATAGCATCCTAAACAACGG	SEQ ID

	NO: 526		NO: 557
CUGUGGAGGAAGAAAACCU	SEQ ID NO: 527	AGGGTTTCTCCTCCACAG	SEQ ID NO: 558
AAGAAAACCCUUUACCCUGU	SEQ ID NO: 528	ACAGGGTAAAGGGTTTCTT	SEQ ID NO: 559
AGAAAACCCUUUACCCUGUU	SEQ ID NO: 529	AACAGGGTAAAGGGTTTCT	SEQ ID NO: 560
CUAACUGCCUGGCACUGAA	SEQ ID NO: 530	TTCAGTGCCAGGCAGTTGAG	SEQ ID NO: 561
AACUGCCUGGCACUGAAAAU	SEQ ID NO: 531	ATTTTCAGTGCCAGGCAGTT	SEQ ID NO: 562
ACUGCCUGGCACUGAAAAUG	SEQ ID NO: 532	CATTTTCAGTGCCAGGCAGT	SEQ ID NO: 563
GGUUUUAAGGAAACCAUCUC	SEQ ID NO: 533	GAGATGGTTCCCTAACAC	SEQ ID NO: 564
GUUUUAAGGAAACCAUCUCUG	SEQ ID NO: 534	CAGAGATGGTTCCCTAAC	SEQ ID NO: 565
AGGAAACCAUCUCUGAUAG	SEQ ID NO: 535	CTTATCAGAGATGGTTCCCT	SEQ ID NO: 566
UCUUUGGCUUGUUGACACCA	SEQ ID NO: 536	TGGTGTCAACAAGCCAAAGA	SEQ ID NO: 567
CUUUGGCUUGUUGACACCAG	SEQ ID NO: 537	CTGGTGTCAACAAGCCAAAG	SEQ ID NO: 568

Tabela 27. shRNA visando os exons de UBE3a-AS 1- 5

GGTGCCTTCTATTATAAAtaacctgaccattaTTTATAATAGAATGGCACCTT TTT	SE Q ID NO: 569
GCTTCATCAATAATGAAAtaacctgaccattaTTTCATTATTGATGAAAGCTT TTT	SE Q ID NO: 570
GGCTTTCATCAATAATGAtaacctgaccattaTCATTATTGATGAAAGACCTT TTT	SE Q ID NO: 571
GAAATCTTCTGATTGTAAAtaacctgaccattaTTACAAATCAGAAGATTCTT TTT	SE Q ID NO: 572
GCACCTAAGGGAATTAGTAtaacctgaccattaTACTAATTCCCTAGGTGCT TTTT	SE Q ID NO: 573
GTTCAACCAGGATTAAAtaacctgaccattaTTTAAATCCTGGTTGAAACTT TTT	SE Q ID NO: 574
GCTTCAACCAGGATTAAAtaacctgaccattaTTAAATCCTGGTTGAAAGCT TTTT	SE Q ID NO: 575
GGAGATGTGCCATTCTATAAtaacctgaccattaTATAGAATGGCACATCTCCT TTTT	SE Q ID NO: 576
GTCTTCAATAATGAAAtaacctgaccattaTTCATTATTGATGAAAGACTT TTT	SE Q ID NO: 577

GATCAATAATGAAATCTTAtaacctgaccattaTAAGATTCATTATTGATCTT TTT	SE Q ID NO: 578
GTGTCTTCATCAATAATAtaacctgaccattaTATTATTGATGAAAGACACTT TTT	SE Q ID NO: 579
GCAATAATGAAATCTTCTAtaacctgaccattaTAGAAGATTCATTATTGCTT TTT	SE Q ID NO: 580
GCATGCTGCAGTGAATTAtaacctgaccattaTAAATTCACTGCAGCATGCT TTTT	SE Q ID NO: 581
GGAAATCTTCTGATTGTAtaacctgaccattaTACAAATCAGAAGATTCCTT TTT	SE Q ID NO: 582
GGTATATTCTATCTAGAAAtaacctgaccattaTTTCTAGATAGAATATACCTT TTT	SE Q ID NO: 583
GTGCTGCAGTGAATTAAAtaacctgaccattaTTAAATTCACTGCAGCACT TTTT	SE Q ID NO: 584
GTGTGCCATTCTATTATAAtaacctgaccattaTTATAATAGAATGGCACACTT TTT	SE Q ID NO: 585
GTTACCATCAGTGTAAAtaacctgaccattaTTAACACACTGATGGTATATT TT	SE Q ID NO: 586
GCCTGCAACCGTTGTTAAtaacctgaccattaTTAAACACGGTTGCAGGCT TTTT	SE Q ID

GTATGTCTTCATCAATAAtaacctgaccattaTTATTGATGAAAGACATACTT TTT	NO: 587 SE Q ID NO: 588
--	---

Tabela 28. RNAs do Guia CRISPR que segmentam os exons de UBE3a-AS 1-5

Strand	Sequência	ID SEQ	PAM
-	ACACTGATGGTAAAGTGGAC	SEQ ID NO: 589	TGG
-	TAGAATATACACGTCGGTAA	SEQ ID NO: 590	AGG
-	TCAACTGTCCCAGTCACAAC	SEQ ID NO: 591	AGG
-	TCTAGATAGAATATACACGT	SEQ ID NO: 592	CGG
-	TCTAGATAGAATATACACGT	SEQ ID NO: 593	CGG
-	CTCCCCATGCACACTTGAGA	SEQ ID NO: 594	AGG
-	CATCCTTAAACAACGGTTGC	SEQ ID NO: 595	AGG
-	GGTGTAAAACTAATTCCCTT	SEQ ID NO: 596	AGG
-	AACAACGGTTGCAGGGACAG	SEQ ID NO: 597	AGG
+	TATGGAAGACTCCCACCTAA	SEQ ID NO: 598	GGG
+	CTATGGAAGACTCCCACCTA	SEQ ID NO: 599	AGG
+	AAGCCTTCTCAAGTGTGCAT	SEQ ID NO: 600	GGG
+	CTATCTAGAACATTGAGCTA	SEQ ID NO: 601	TGG
+	ACCCTCTGGTGTTCACAG	SEQ ID NO: 602	AGG
+	AACCCTTACCCCTGTTGTTC	SEQ ID NO: 603	AGG

[0161] A menos que definido de outra forma, todos os termos técnicos e científicos usados neste documento têm os mesmos significados que são comumente entendidos por um especialista na técnica à qual a invenção divulgada pertence. As

publicações citadas aqui e os materiais para os quais são citadas são especificamente incorporadas por referência.

[0162] Os técnicos no assunto reconhecerão, ou serão capazes de verificar, usando não mais que experimentação de rotina, muitos equivalentes às modalidades específicas da invenção aqui descritas. Tais equivalentes devem ser abrangidos pelas seguintes reivindicações.

REIVINDICAÇÕES

1. Oligonucleotídeo *antisense* CARACTERIZADO pelo fato de compreender uma sequência nucleotídica contígua de 10 a 30 nucleotídeos de comprimento com pelo menos 98% de complementaridade com uma porção contígua da sequência de ácido nucleico SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 ou SEQ ID NO: 5.
2. Oligonucleotídeo, de acordo com a reivindicação 1, CARACTERIZADO pelo fato de que o oligonucleotídeo compreende uma sequência selecionada do grupo que consiste na SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9, 10 ou 11.
3. Oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 2, CARACTERIZADO pelo fato de que compreende um ou mais nucleosídeos modificados.
4. Oligonucleotídeo, de acordo com a reivindicação 3, CARACTERIZADO que o um ou mais nucleosídeos modificados é um "açúcar 2 nucleosídeo modificado.
5. Oligonucleotídeo, de acordo com a reivindicação 4, CARACTERIZADO pelo fato de que um ou mais nucleosídeos 2' modificados com açúcar são selecionados independentemente do grupo que consiste em 2'-O-alquil-RNA, 2'-O-metil-RNA, 2'-alcoxi-RNA, 2' -O-metoxietil-RNA, 2'-amino-DNA, 2'-fluoro-DNA, ácido nucleico arabino (ANA), 2'-fluoro-ANA e nucleosídeos LNA.
6. Oligonucleotídeo, de acordo com a reivindicação 5, CARACTERIZADO pelo fato de que o um ou mais nucleosídeos modificados é um nucleosídeo LNA.
7. Oligonucleotídeo, de acordo com a reivindicação 1, CARACTERIZADO pelo fato de que o oligonucleotídeo compreende pelo menos uma ligação internucleosídeo modificada.
8. Oligonucleotídeo, de acordo com a reivindicação 7, CARACTERIZADO pelo fato de que as ligações internucleosídeos dentro da sequência nucleotídica contígua são ligações internucleosídeos fosforotioato.

9. Oligonucleotídeo, de acordo com a reivindicação 1, CARACTERIZADO pelo fato de que o oligonucleotídeo é capaz de recrutar a RNase H.

10. Oligonucleotídeo, de acordo com a reivindicação 9, CARACTERIZADO pelo fato de que o oligonucleotídeo é um *gapmer*.

11. Oligonucleotídeo, de acordo com a reivindicação 10, CARACTERIZADO pelo fato de que o oligonucleotídeo tem uma sequência de ácido nucleico selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 362 a 392.

12. Composição farmacêutica CARACTERIZADA pelo fato de que compreende um ou mais dos oligonucleotídeo conforme definidos em qualquer uma das reivindicação de 1 a 11 e um diluente, solvente, excipiente, sal e / ou adjuvante farmaceuticamente aceitável.

13. Método para tratar ou prevenir a síndrome de Angelman em um sujeito CARACTERIZADO pelo fato de que compreende a administração de uma quantidade terapeuticamente ou profilaticamente eficaz da composição da reivindicação 12 a um sujeito que sofre ou é suscetível à síndrome de Angelman.

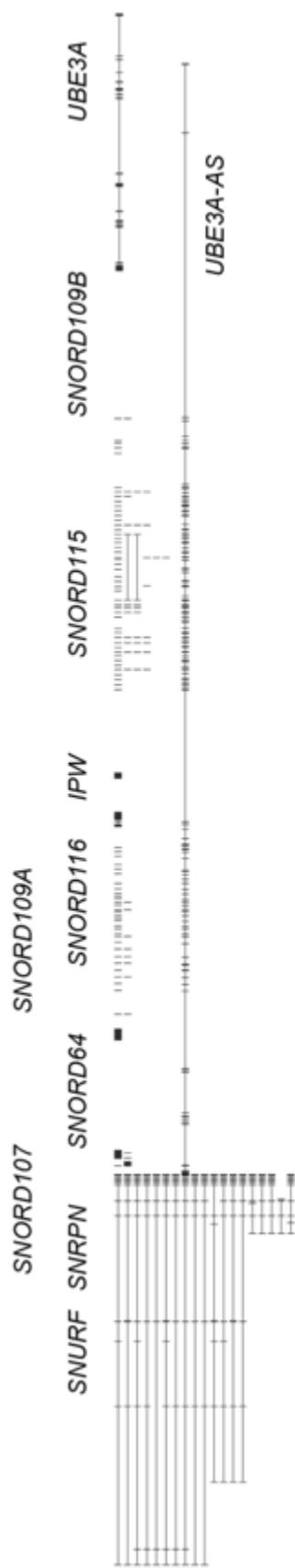


FIG. 1A

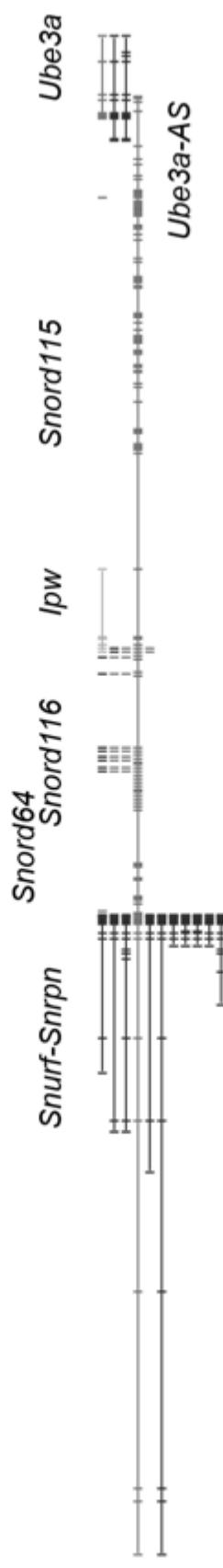


FIG. 1B



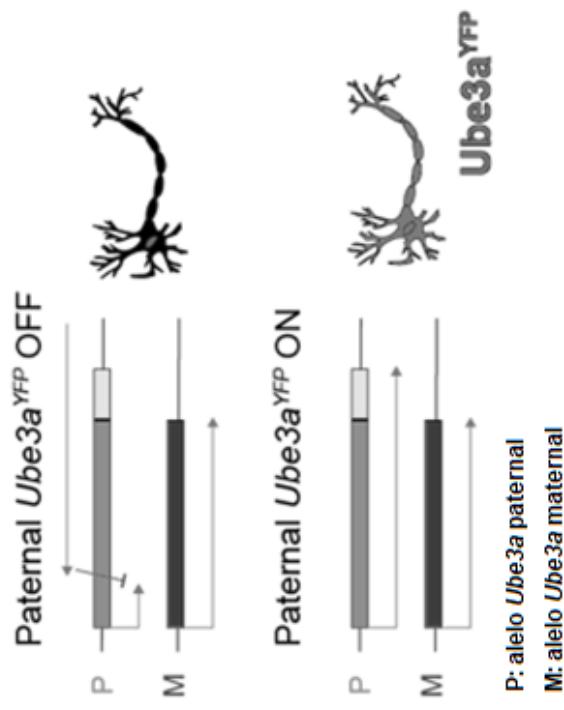
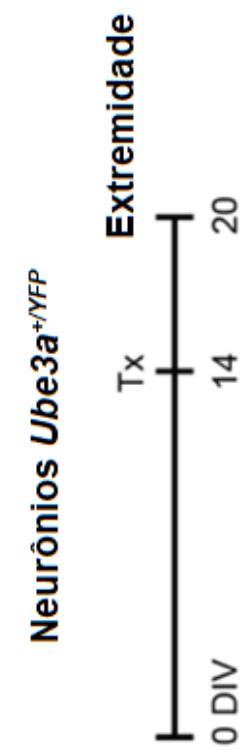
FIG. 1C



FIG. 1D

Ube3a-AS de camundongo

FIG. 2A

**FIG. 2B****FIG. 2C**

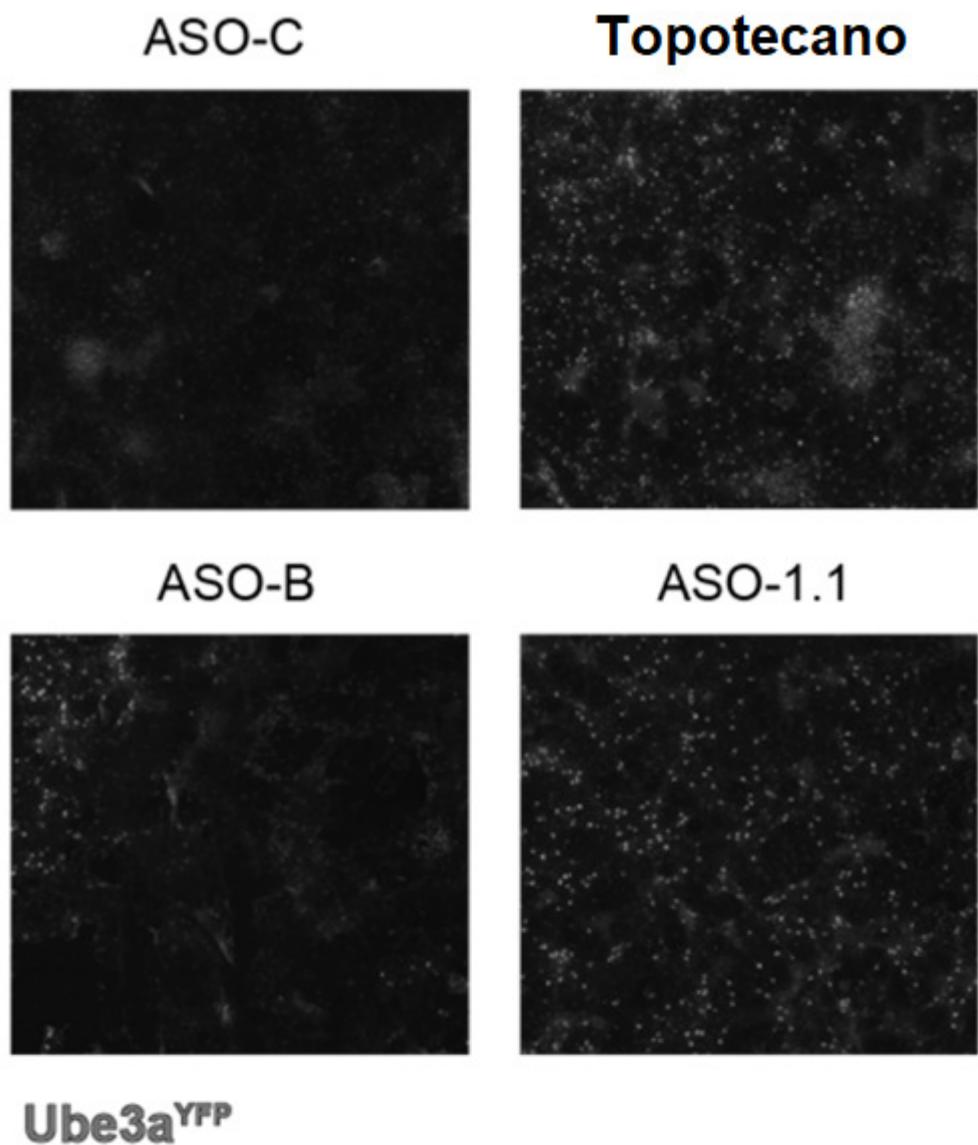


FIG. 2D

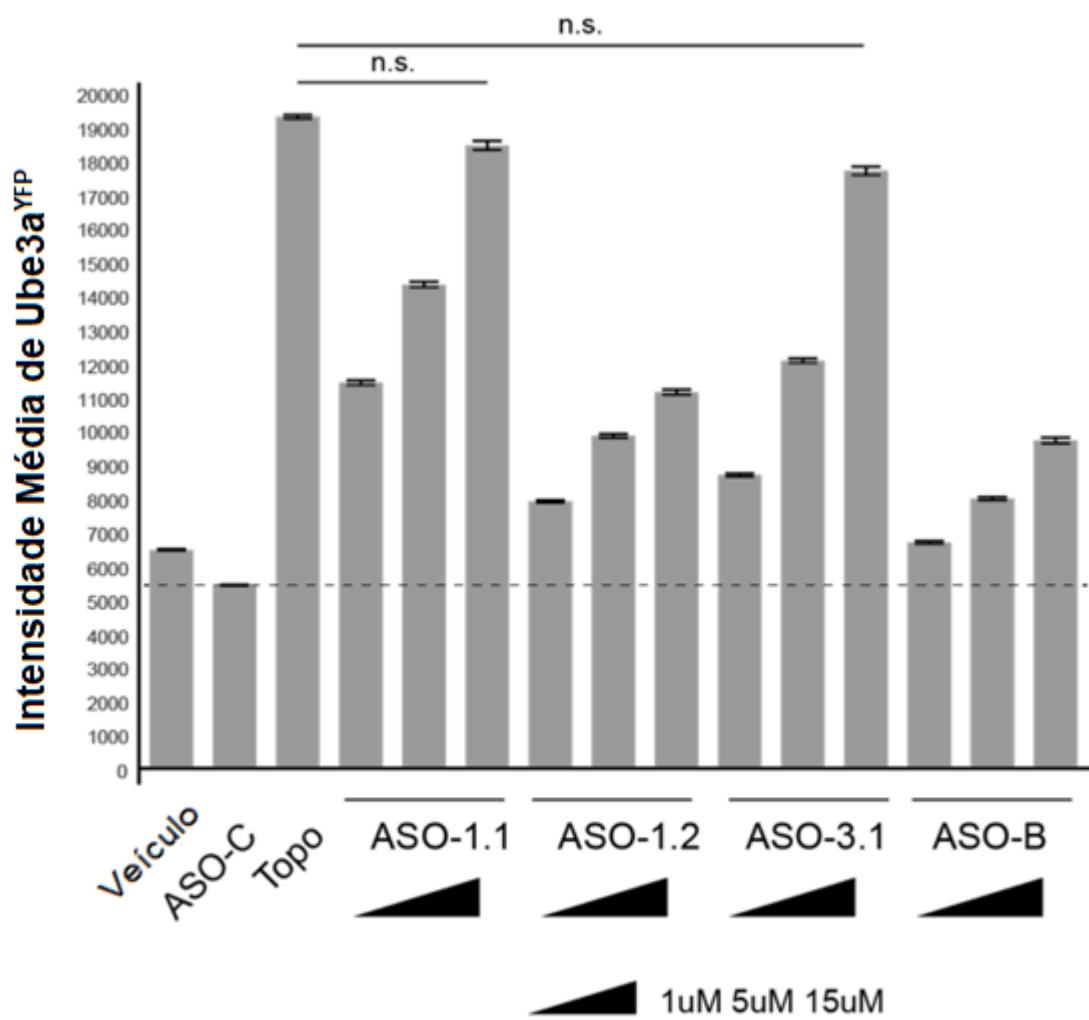


FIG. 2E

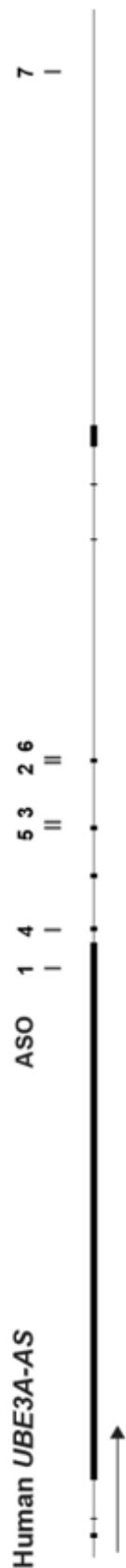


FIG. 3A

Neurônios-iPSC GABAérgicos

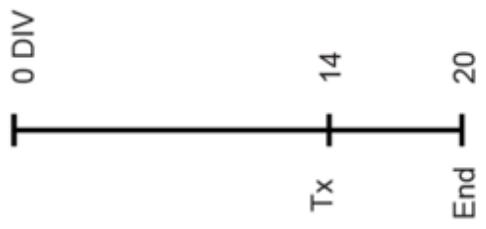


FIG. 3B

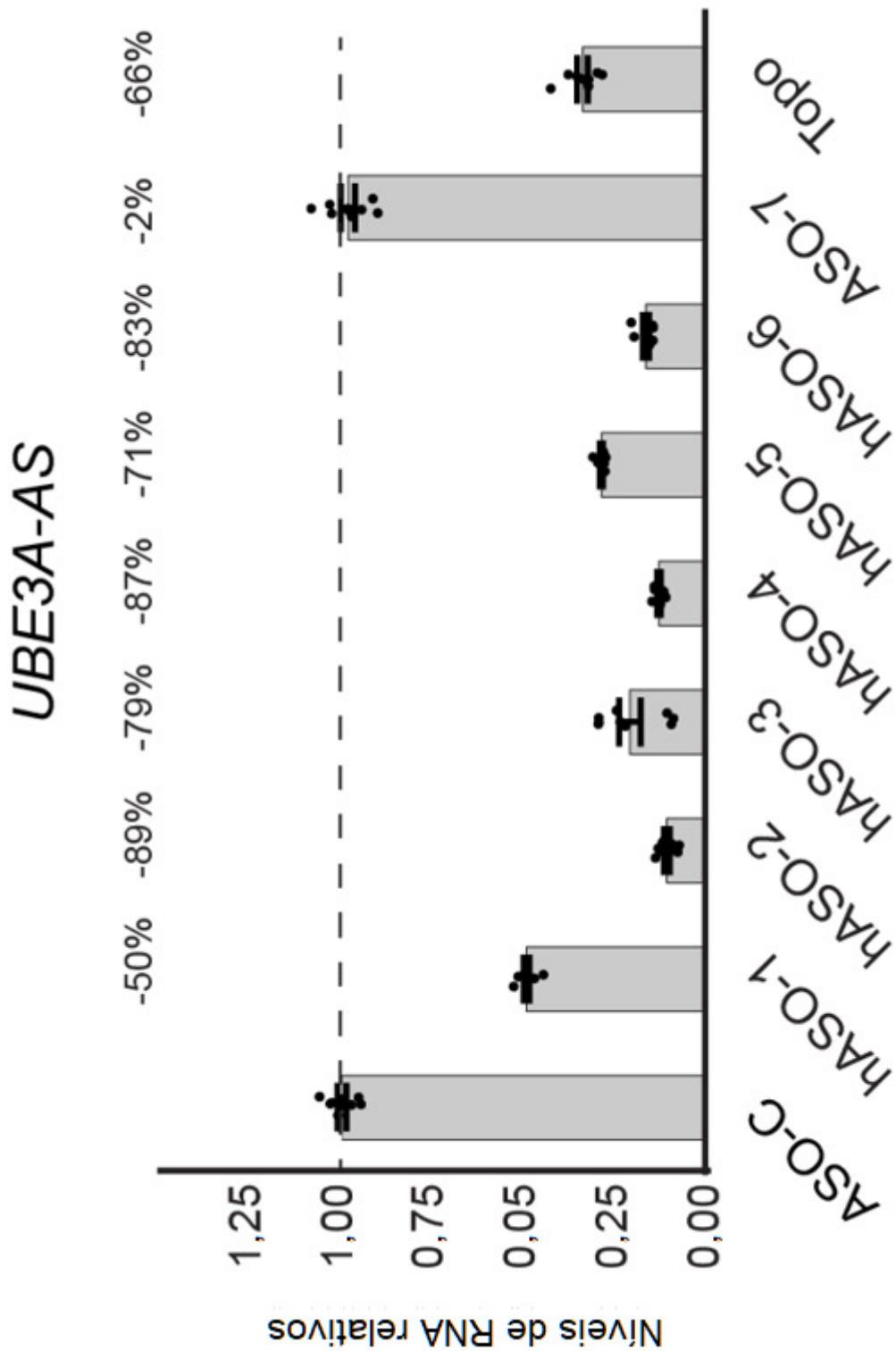
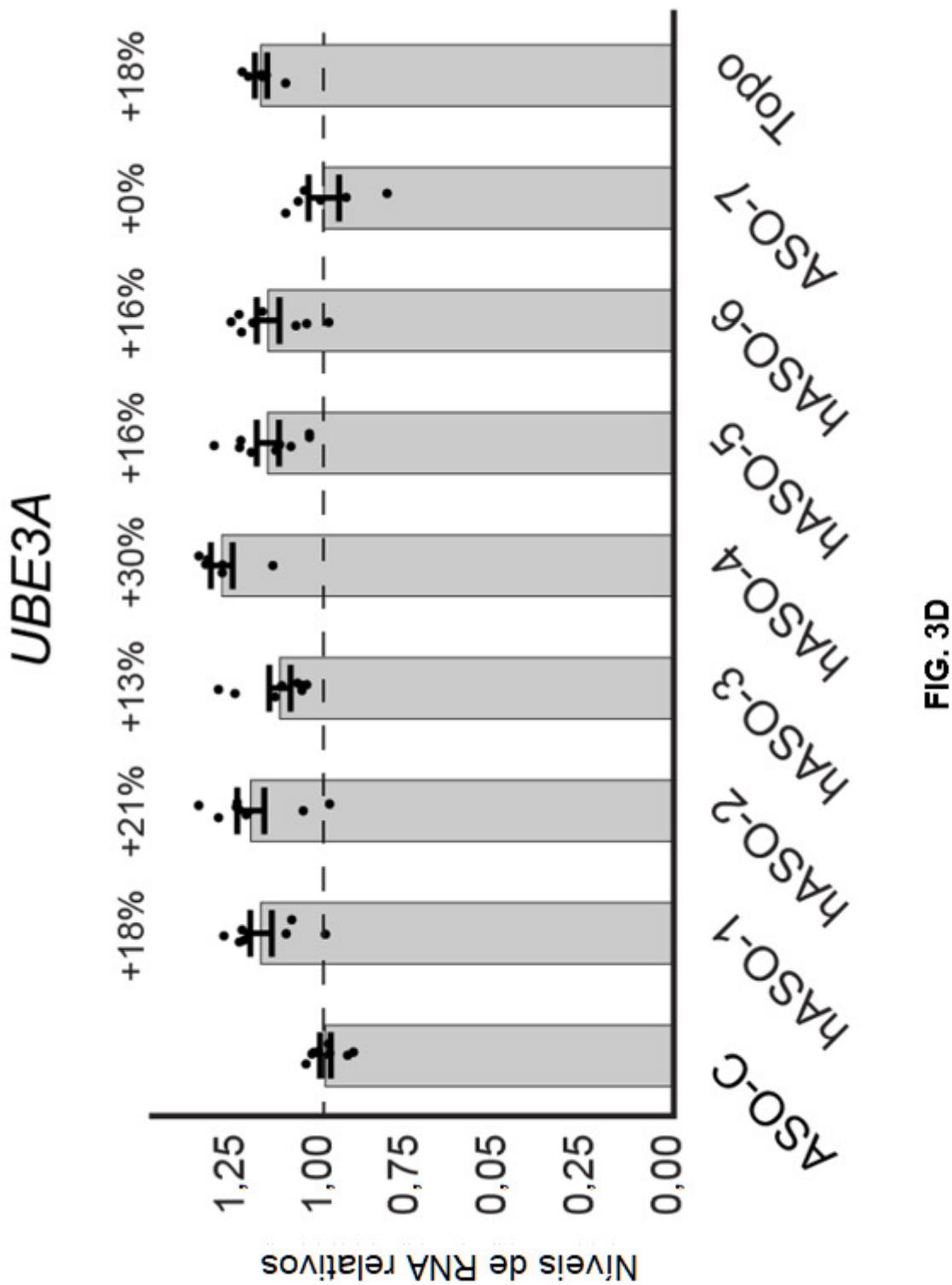


FIG. 3C



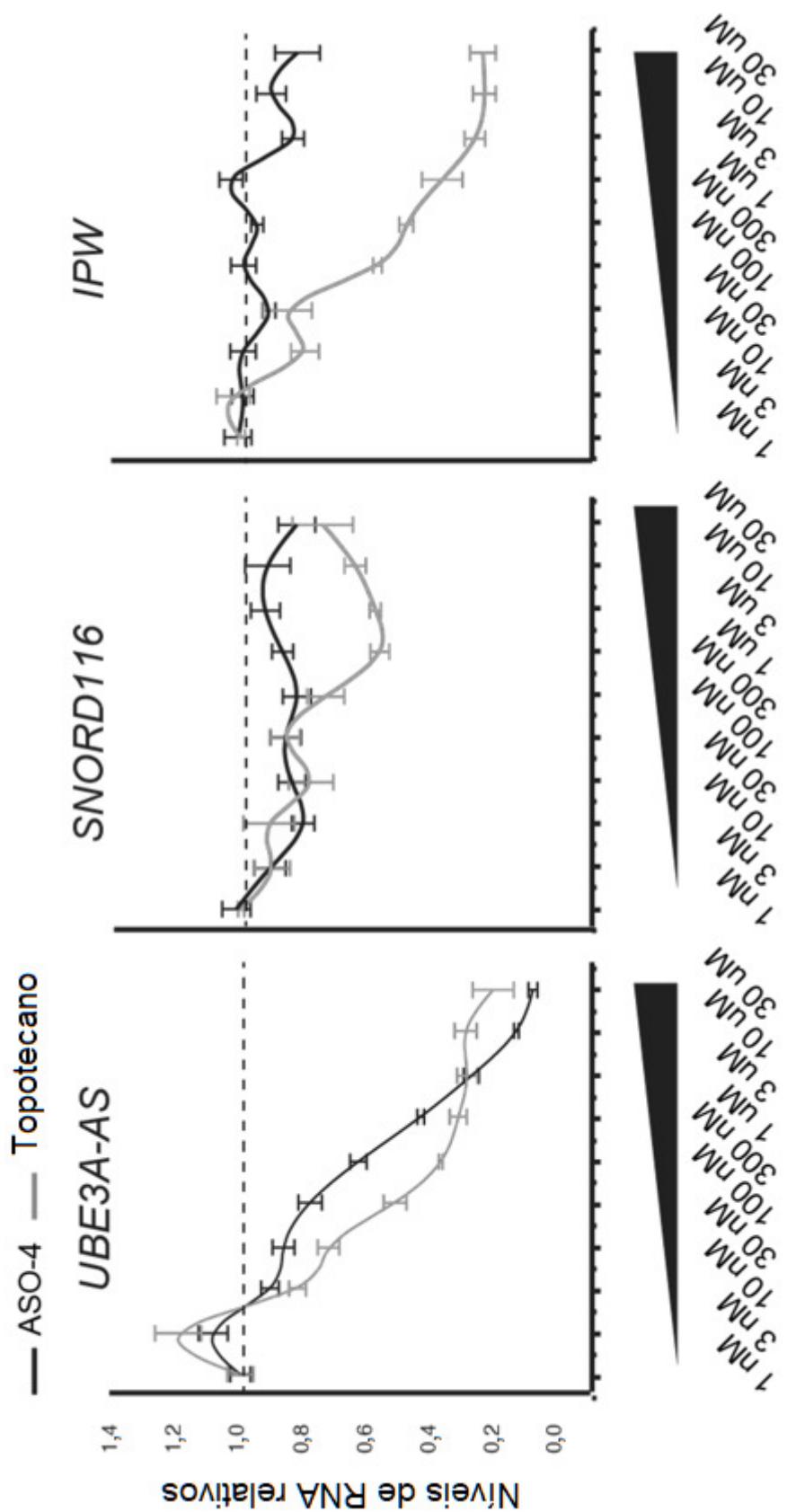


FIG. 4A

FIG. 4C

FIG. 4B



FIG. 4A

FIG. 4C

FIG. 4B

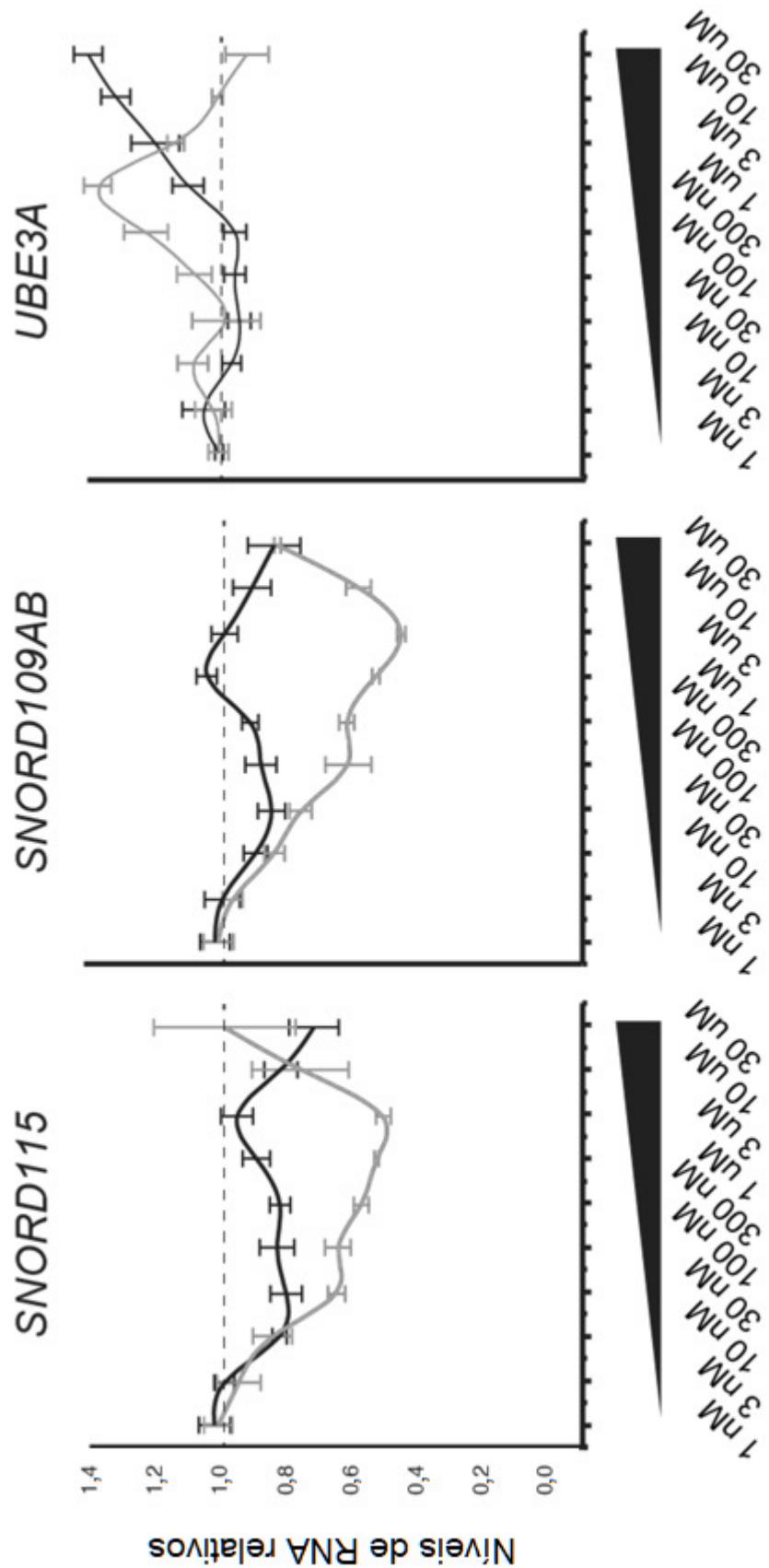


FIG. 4F

FIG. 4E

FIG. 4D

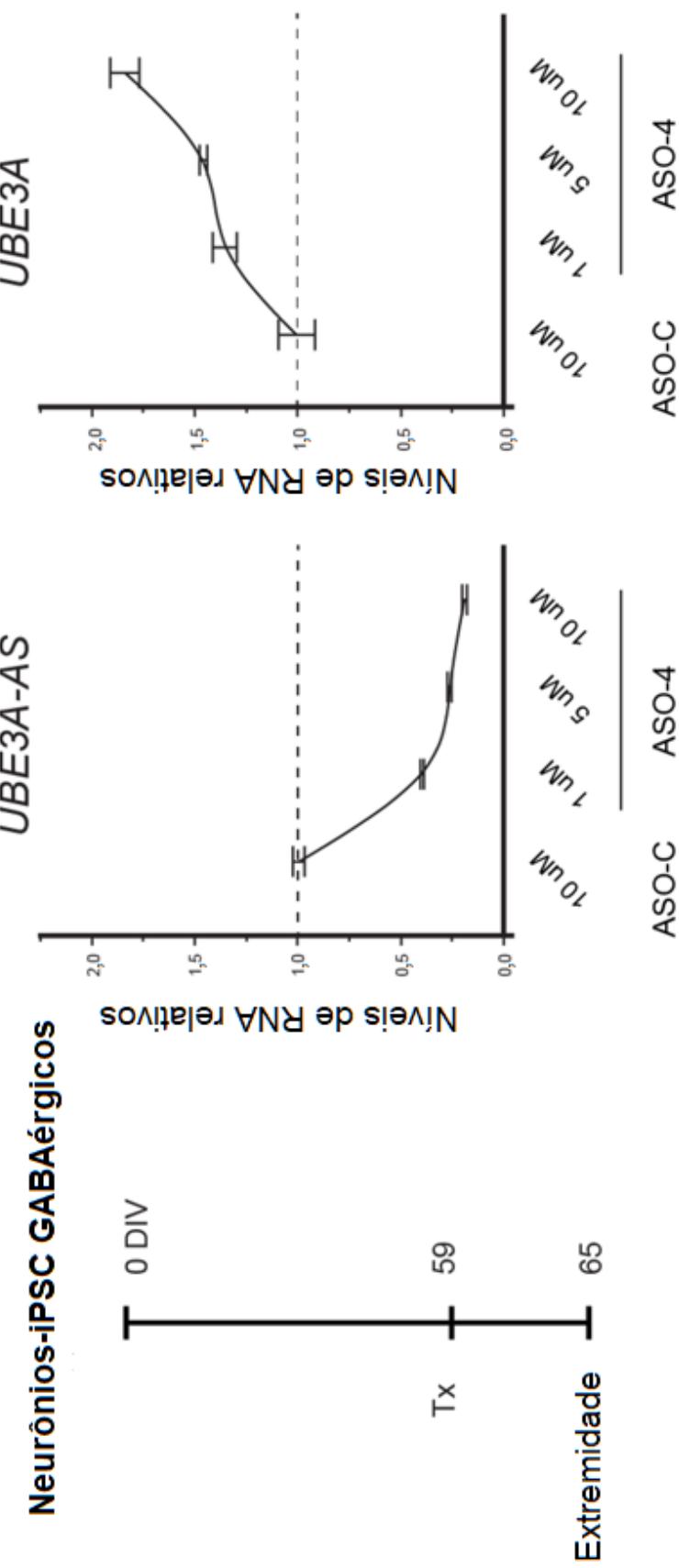


FIG. 4G

FIG. 4H

FIG. 4I

Neurônios-iPSC GABAérgicos

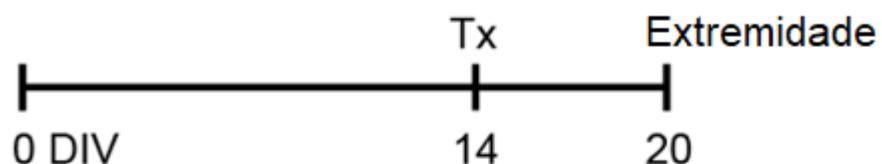


FIG. 5A

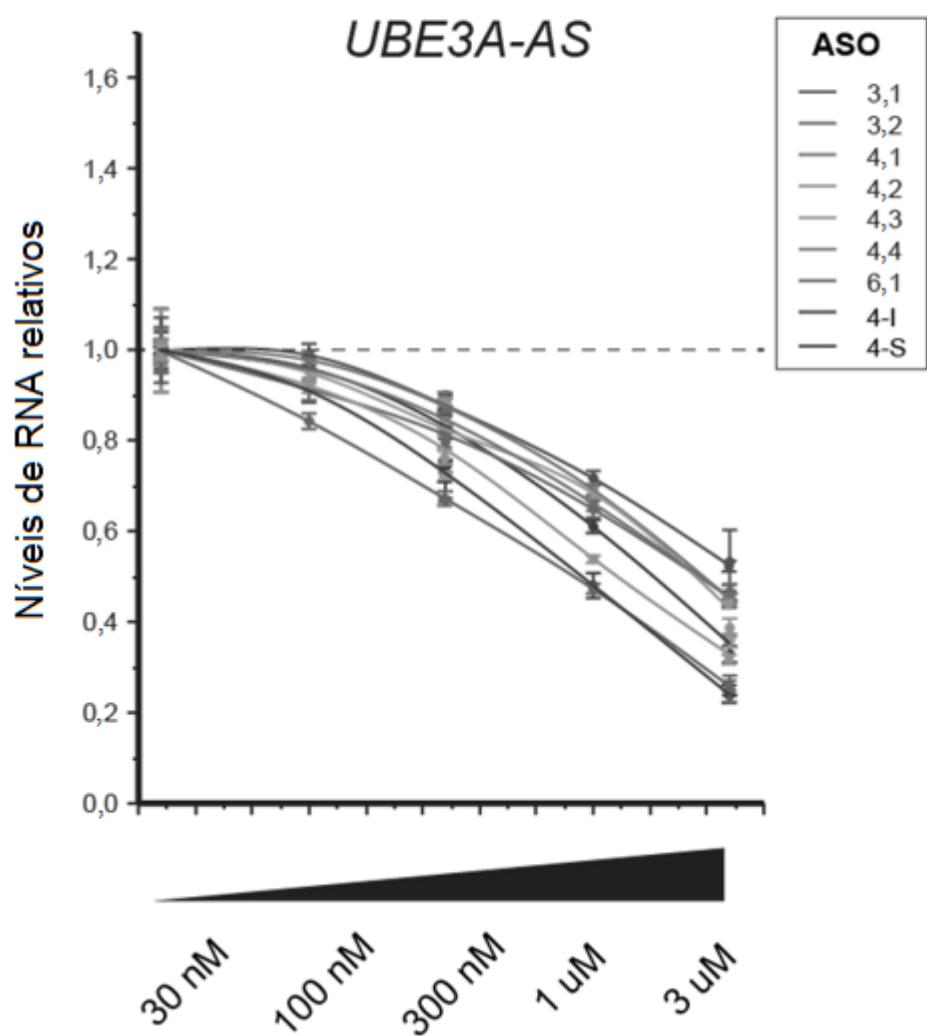


FIG. 5B

Neurônios-iPSC GABAérgicos

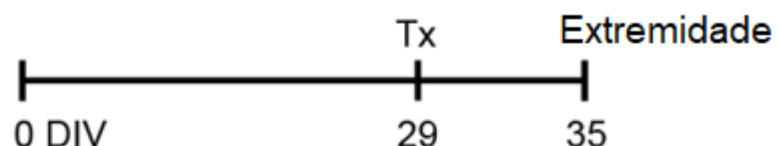


FIG. 5C

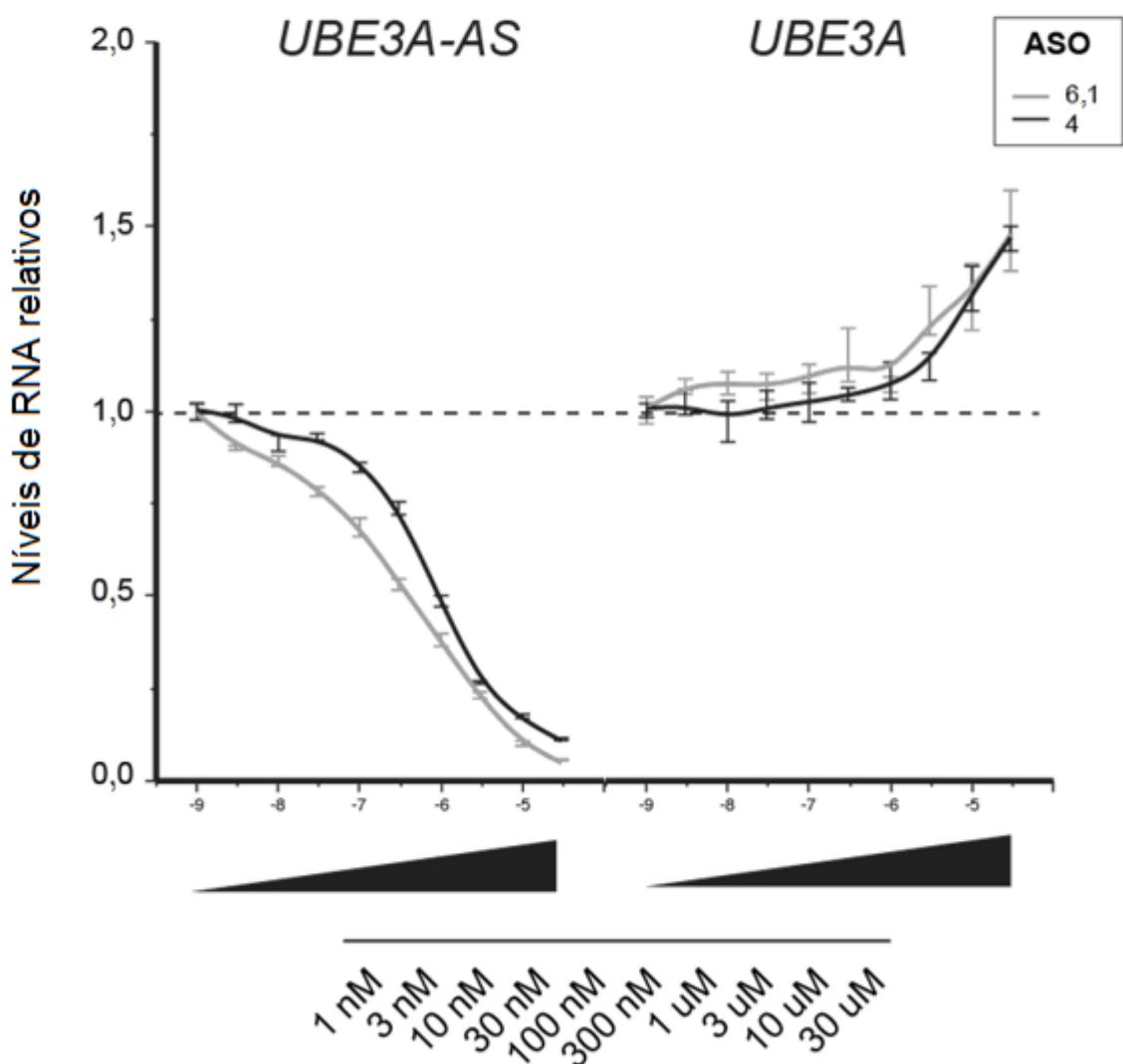
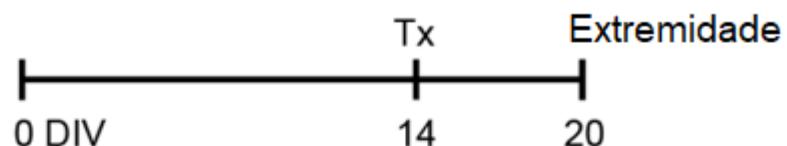
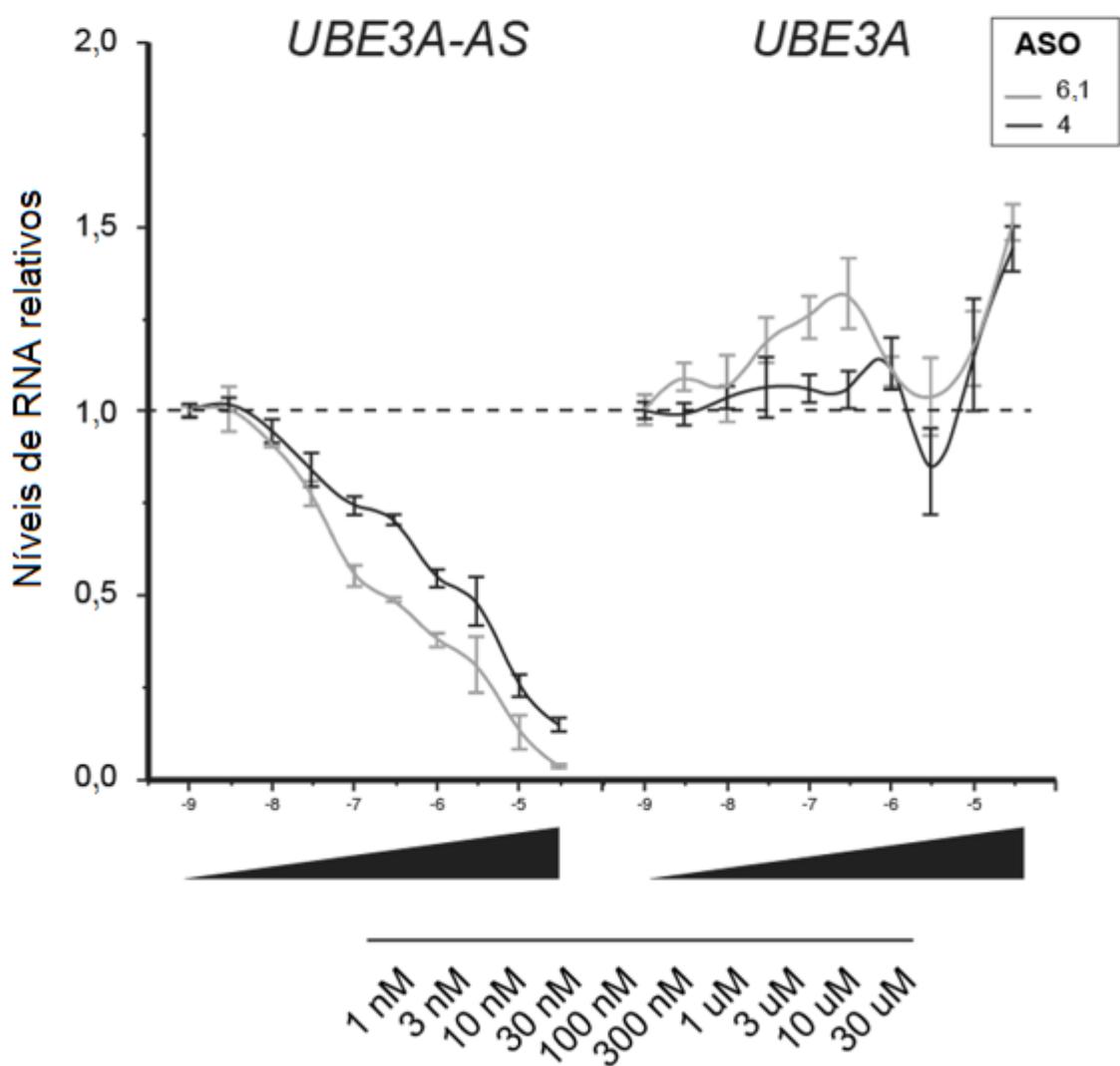


FIG. 5D

Neurônios- iPSC glutamatérgicos

**FIG. 5E****FIG. 5F**

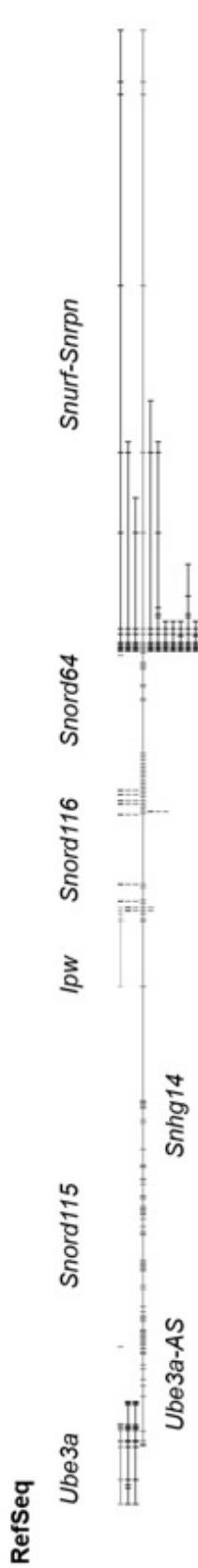


FIG. 6A

Transcrição Reunida de sequência de RNA

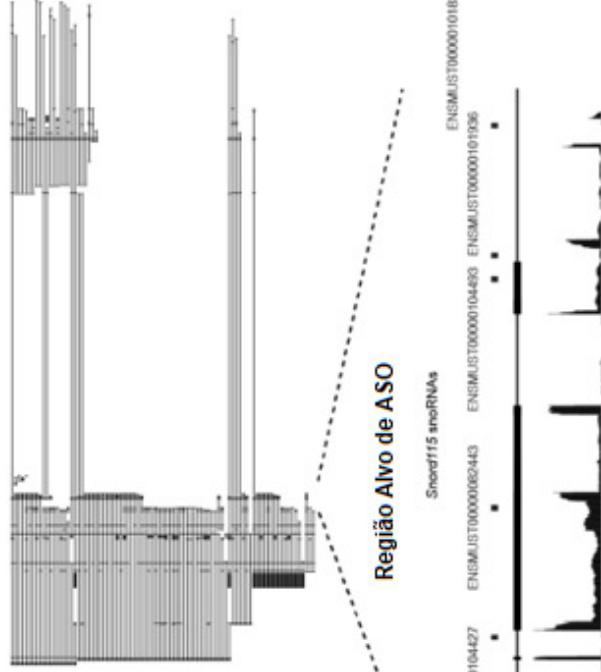


FIG. 6B

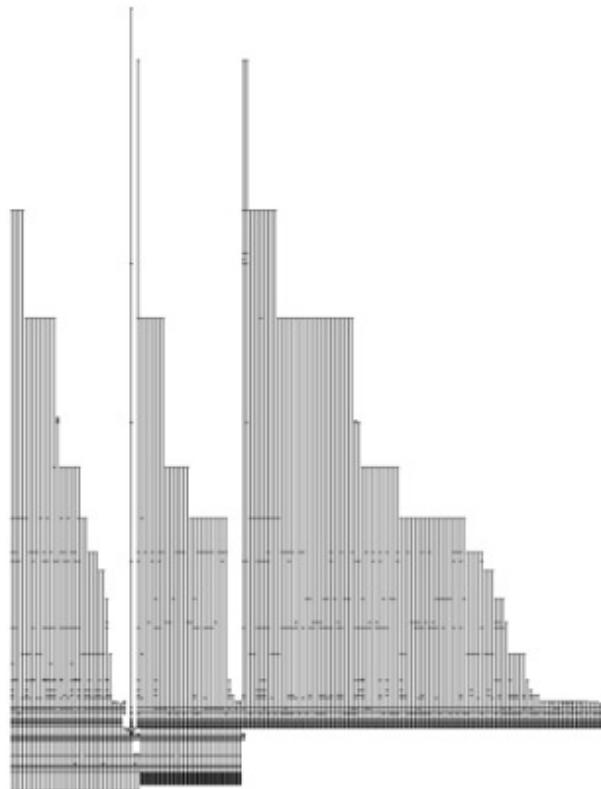


FIG. 6C



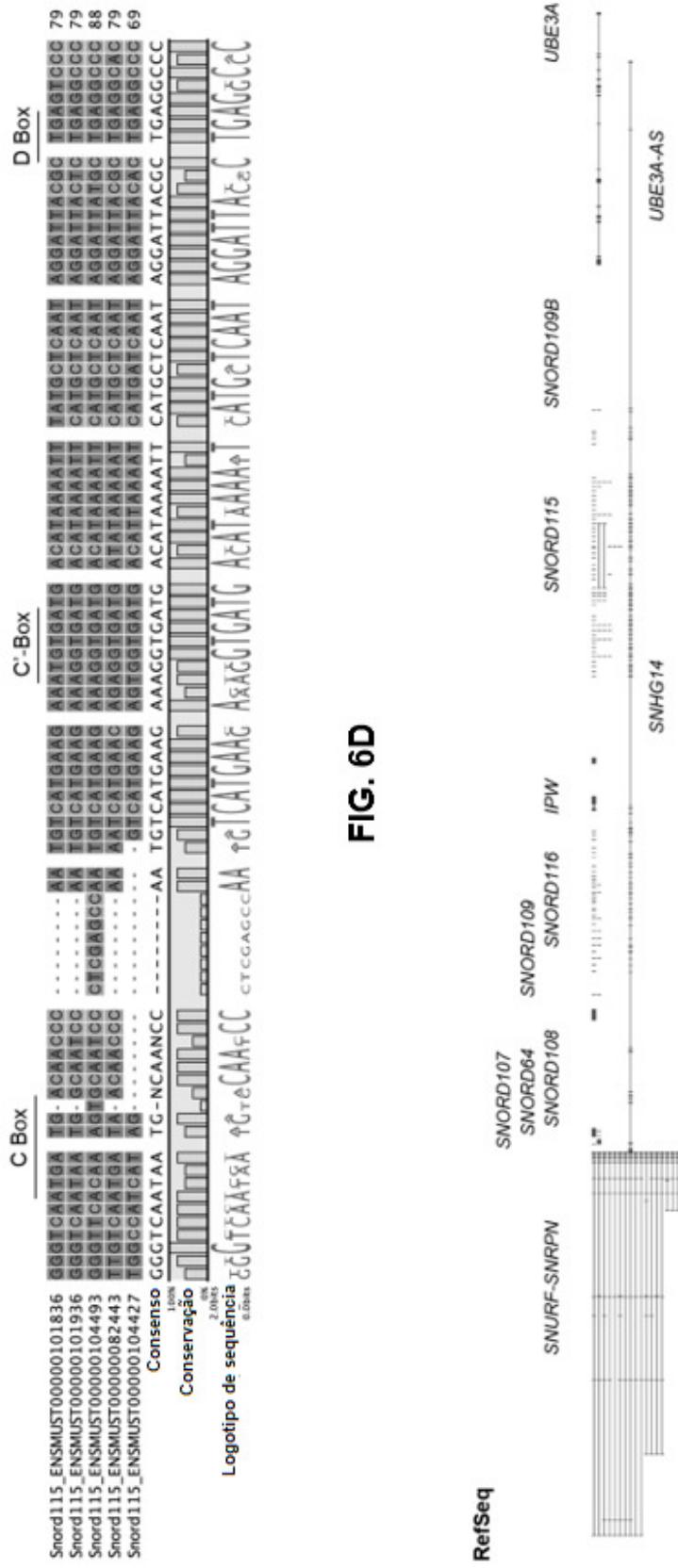


FIG. 6D

FIG. 7A

Transcrição Reunida de Sequência de RNA

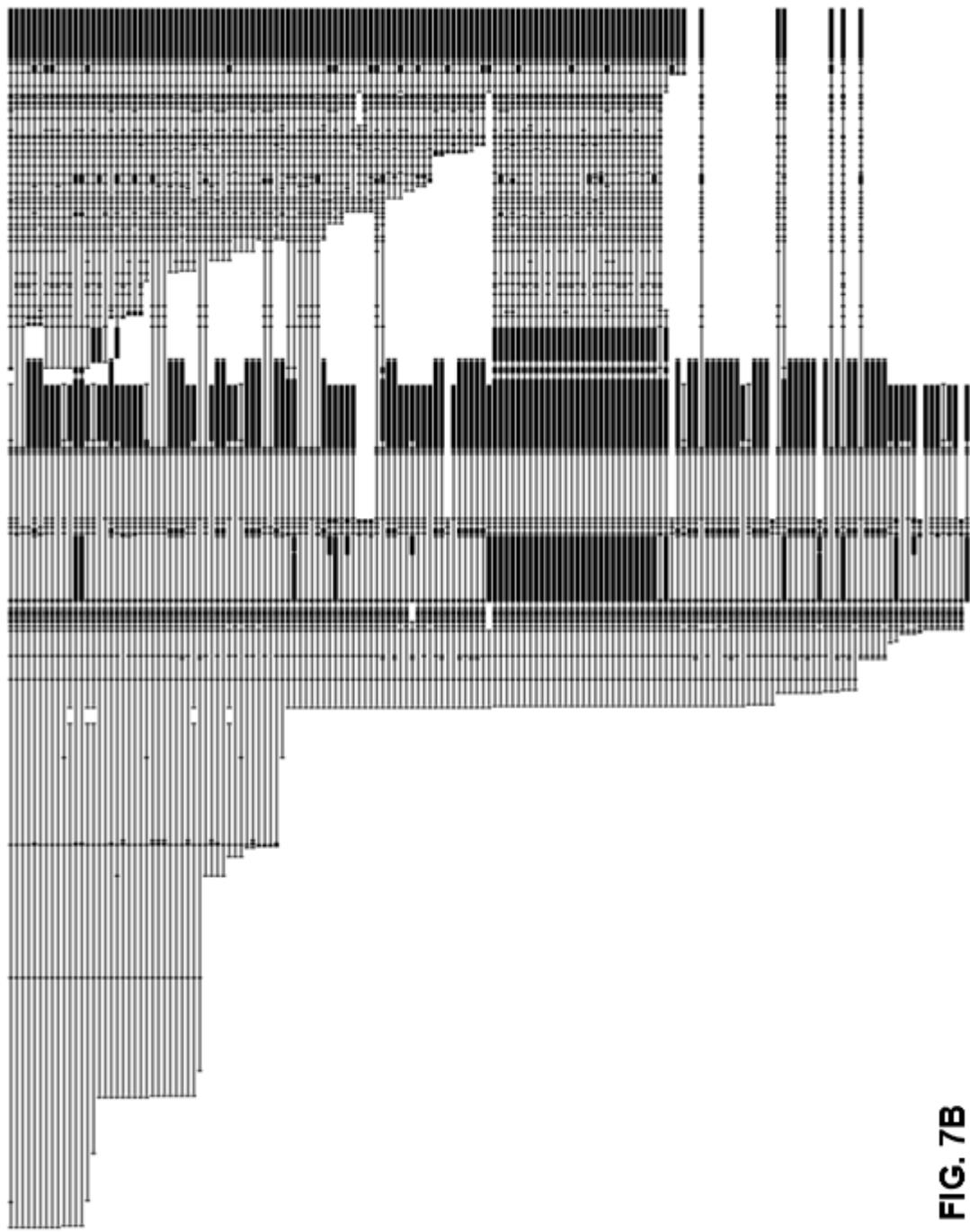


FIG. 7B

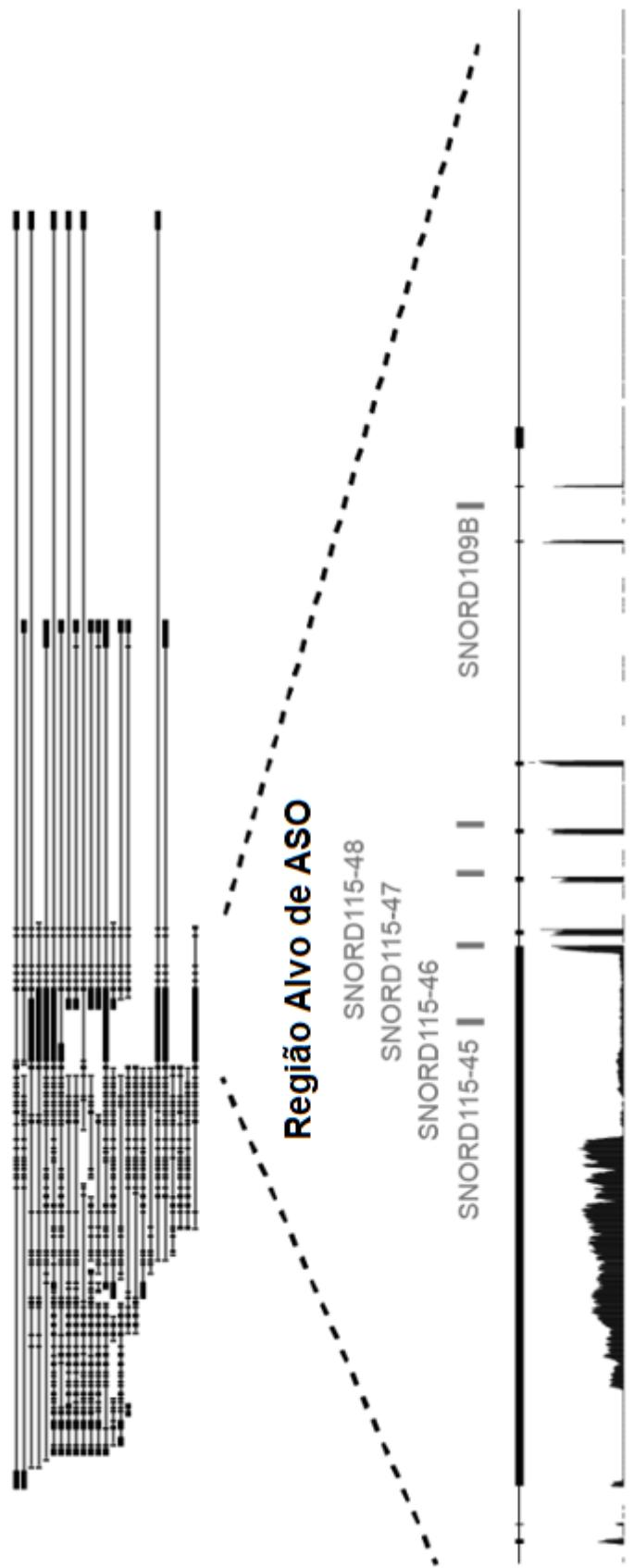
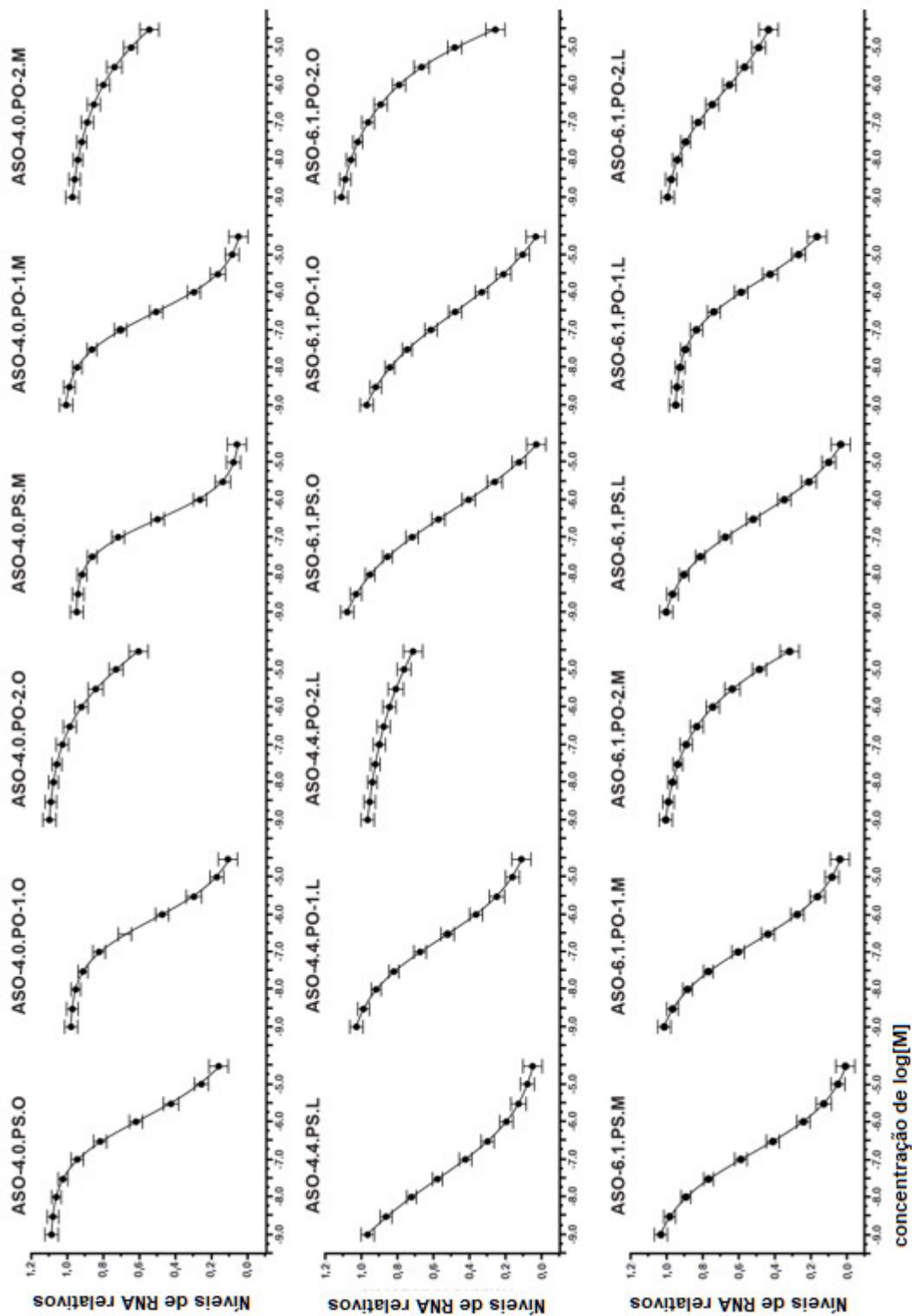


FIG. 7C



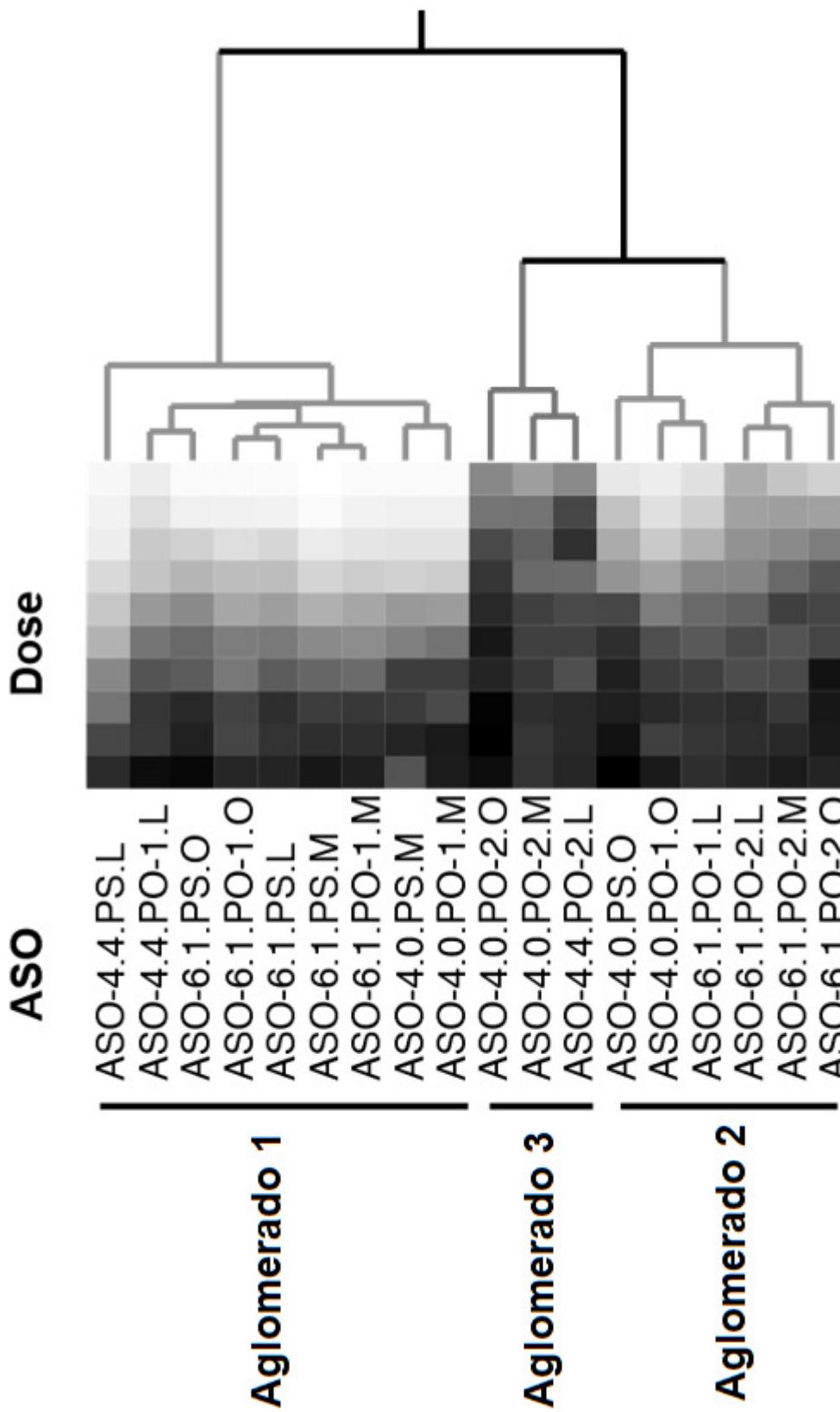


FIG. 8B

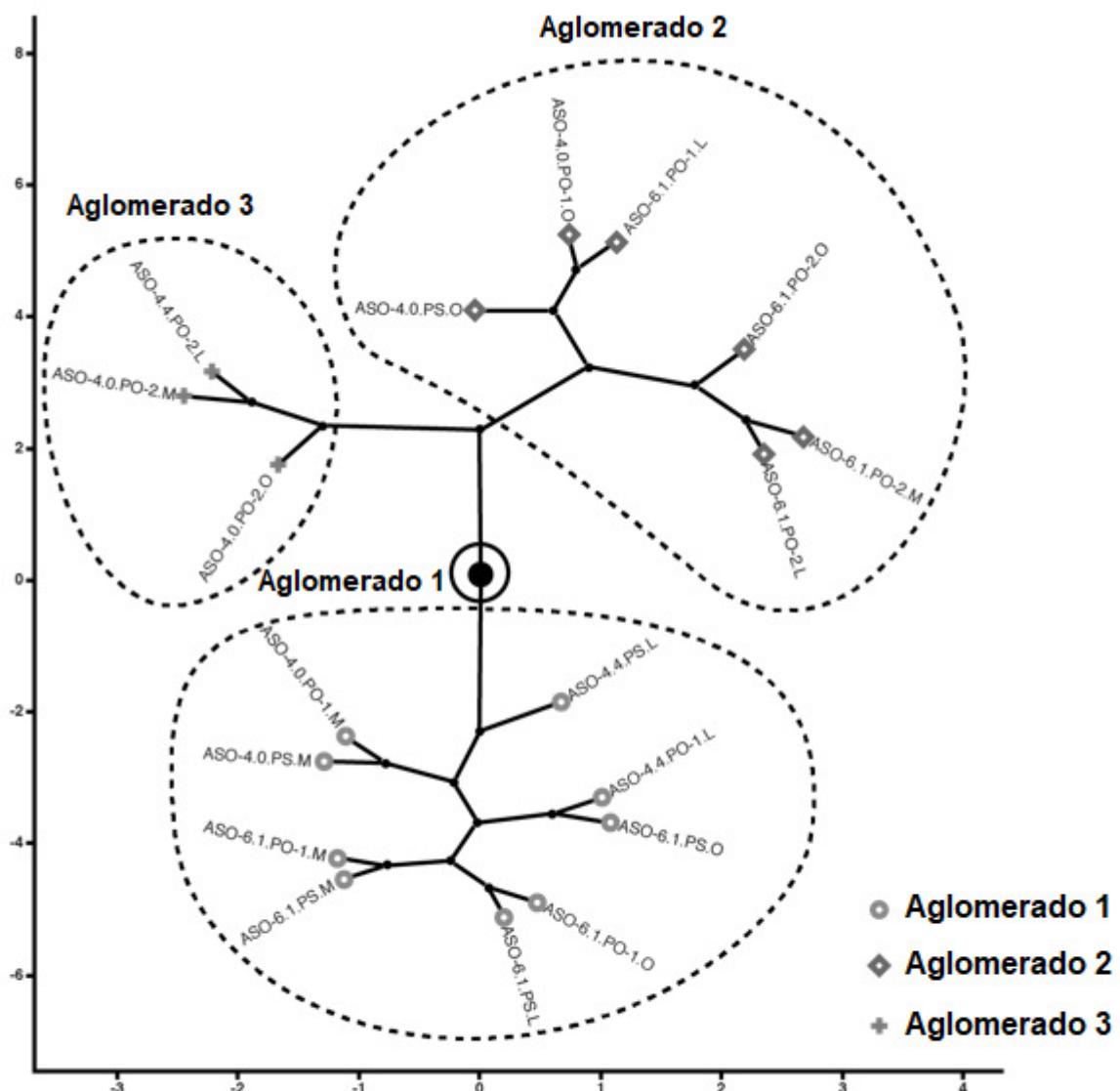


FIG. 8C

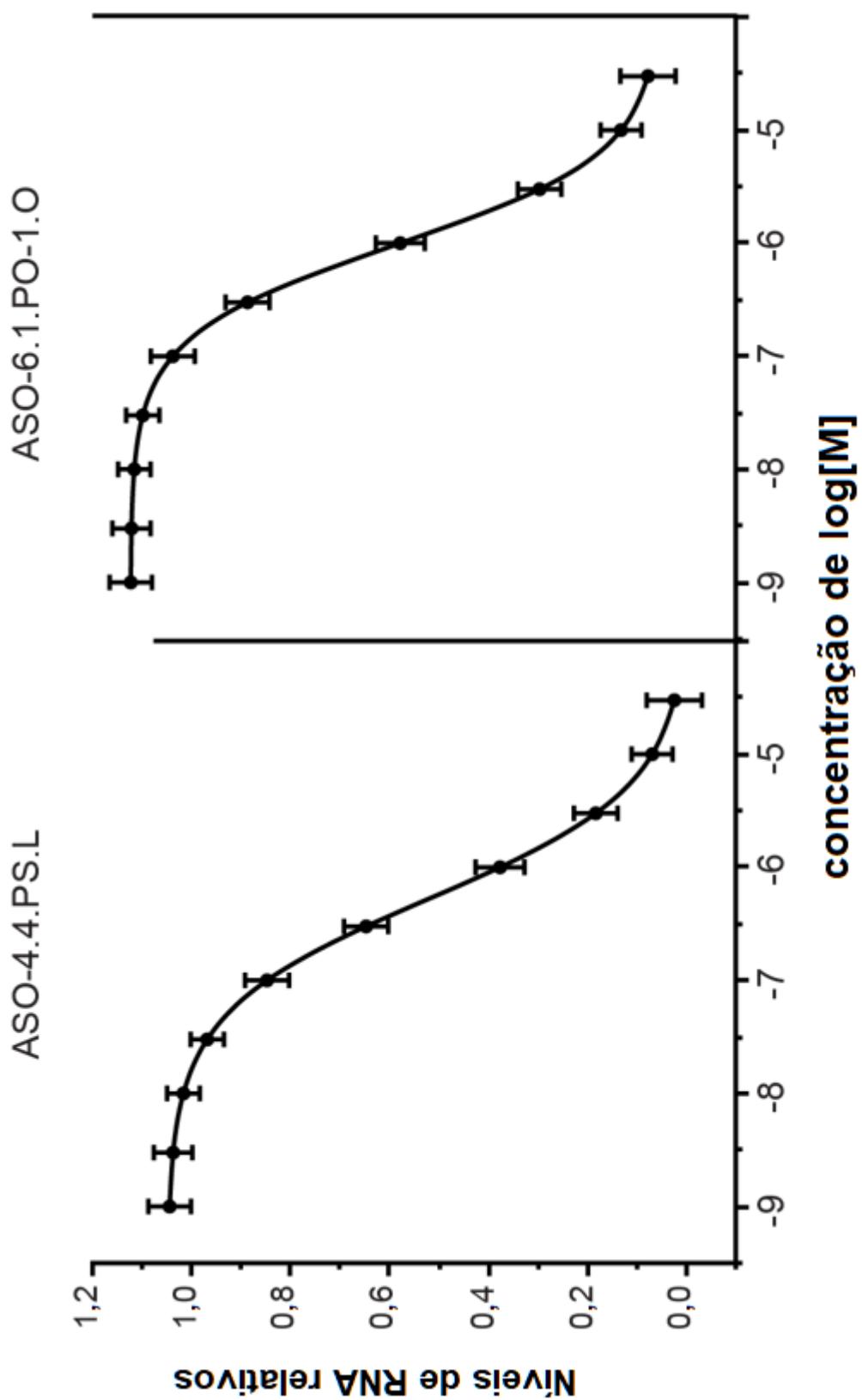


FIG. 9

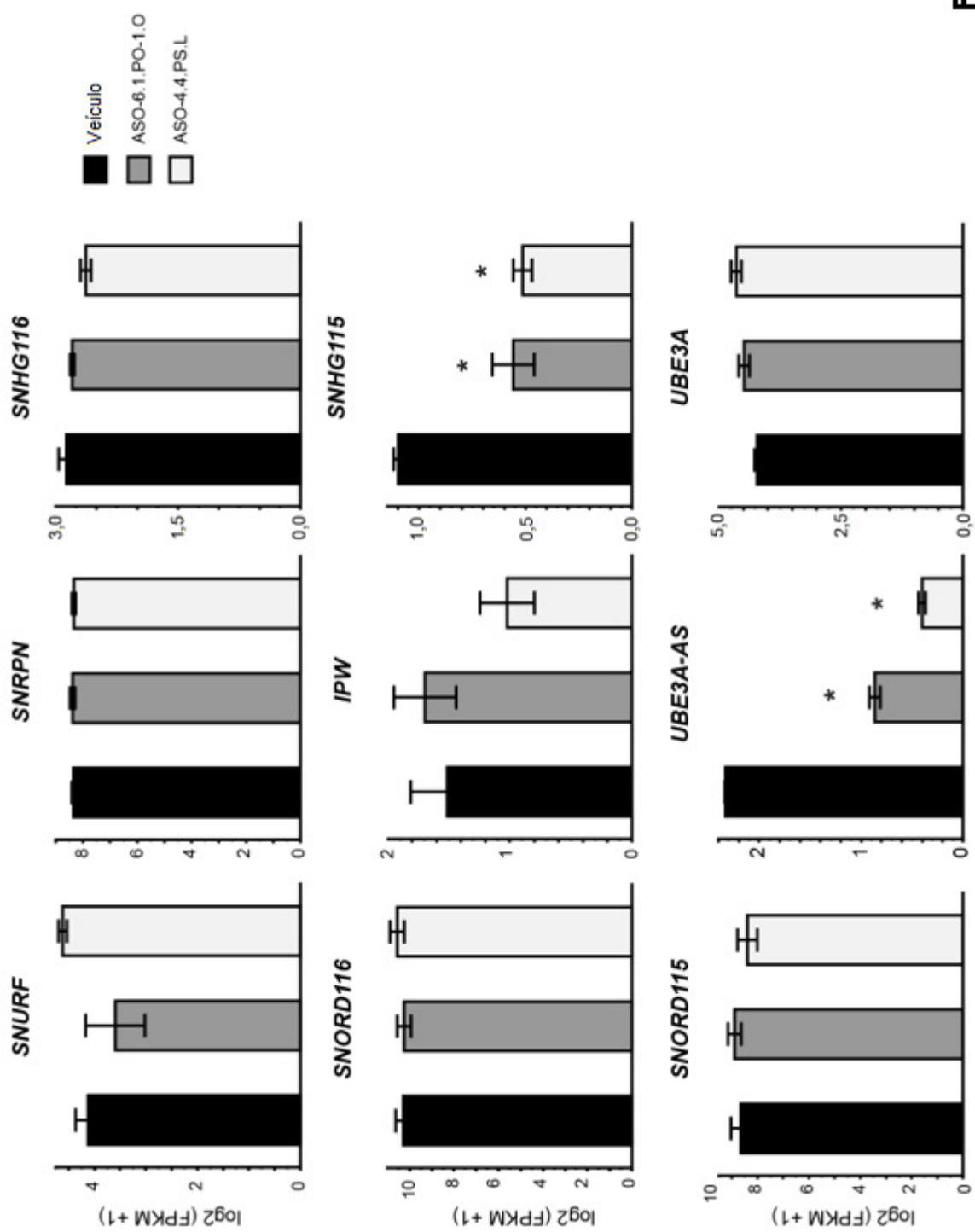


FIG. 10

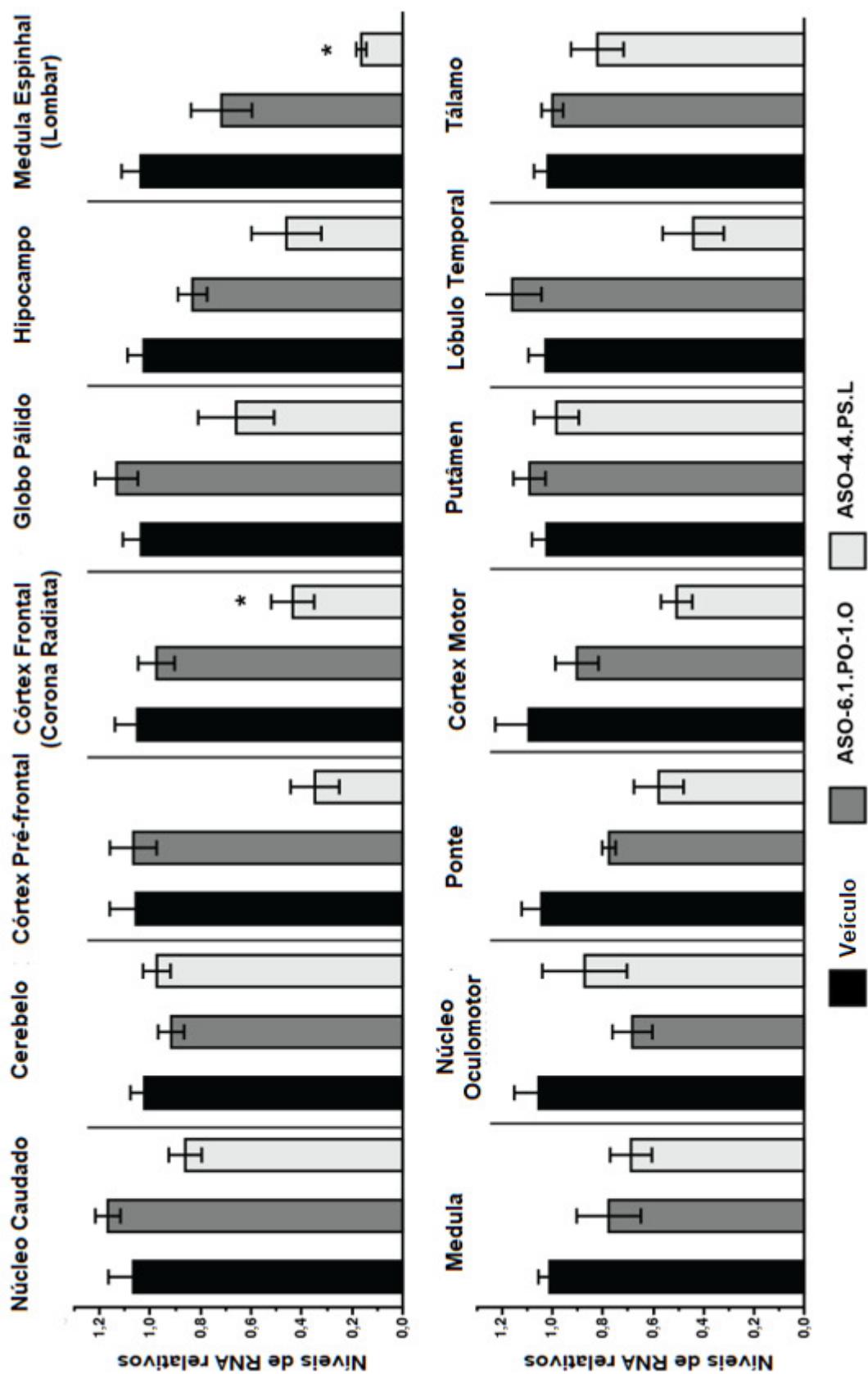


FIG. 11

RESUMO

TRATAMENTO ANTISENSE DA SÍNDROME DE ANGELMAN

São divulgados oligonucleotídeos *antisense* que são capazes de induzir a expressão da ubiquitina-proteína ligase E3A (*UBE3A*) a partir do alelo paterno em neurônios animais ou humanos. Os oligonucleotídeos têm como alvo o supressor do alelo paterno *UBE3A* por hibridação com o RNA não codificador longo do *SNHG14* na *terminação 5'* de *UBE3A-AS*, que está a jusante do *SNORD115-45 snoRNA*. Também são divulgadas composições farmacêuticas e métodos para tratamento da síndrome de Angelman.