



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

**(11) BR 112014026285-3 B1**



**(22) Data do Depósito: 23/04/2013**

**(45) Data de Concessão: 31/08/2021**

**(54) Título:** OLIGONUCLEOTÍDEOS MODULADORES DE RNA COM CARACTERÍSTICAS MELHORADAS PARA O TRATAMENTO DE DISTÚRBIOS NEUROMUSCULARES

**(51) Int.Cl.:** C12N 15/113; A61K 31/7115; A61K 31/712; A61K 31/7125; A61P 25/00.

**(30) Prioridade Unionista:** 23/04/2012 US 61/636,914; 23/04/2012 EP 12165139.2.

**(73) Titular(es):** BIOMARIN TECHNOLOGIES B.V..

**(72) Inventor(es):** PETER CHRISTIAN DE VISSER; SUSAN ALLEGONDA MARIA MULDERS.

**(86) Pedido PCT:** PCT NL2013050306 de 23/04/2013

**(87) Publicação PCT:** WO 2013/162363 de 31/10/2013

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 21/10/2014

**(57) Resumo:** OLIGONUCLEOTÍDEOS MODULADORES DE RNA COM CARACTERÍSTICAS MELHORADAS PARA O TRATAMENTO DE DISTÚRBIOS NEUROMUSCULARES. A presente invenção fornece um oligonucleotídeo melhorado e o seu uso para tratar, melhorar, prevenir, atrasar e/ou para o tratamento de um distúrbio genético humano neurodegenerativo ou neuromuscular associado à instabilidade de repetição de cis-elemento.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para:

**"OLIGONUCLEOTÍDEOS MODULADORES DE RNA COM CARACTERÍSTICAS MELHORADAS PARA O TRATAMENTO DE DISTÚRBIOS NEUROMUSCULARES".**

**Campo da Invenção**

[001] A invenção refere-se ao campo da genética humana, mais especificamente aos distúrbios neuromusculares. A invenção refere-se em particular à utilização de oligonucleotídeos anti-sentido (AONs) com características melhoradas aumentando a aplicabilidade clínica, conforme aqui definido ainda.

**Antecedentes da invenção**

[002] As doenças neuromusculares são caracterizadas por funcionamento deficiente dos músculos devido a qualquer patologia do músculo ou do nervo (miopatias e neuropatias). As neuropatias são caracterizadas pela neurodegeneração e controle do nervo danificado, levando a problemas relacionados com o movimento, espasticidade ou paralisia. Exemplos incluem a Doença de Huntington (DH), vários tipos de ataxia espinocerebelar (SCA), ataxia de Friedreich (AF), Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) e demência frontotemporal (FTD). Um subconjunto de neuropatias é causado por uma instabilidade da repetição do elemento *cis*. Por exemplo, DH é causada por uma expansão repetida do triplete (CAG)<sub>n</sub> no éxon 1 do gene HTT. A expansão destas repetições resulta na expansão de um estiramento da glutamina

na extremidade N-terminal da proteína huntingtina citoplasmática de 348 kDa. A huntingtina possui uma sequência característica de 6 a 29 resíduos de aminoácido glutamina na forma normal; a huntingtina mutada que causa a doença tem mais do que 38 resíduos. A expressão contínua de moléculas huntingtina mutantes em células neuronais resulta na formação de grandes depósitos de proteínas que, eventualmente, dão origem à morte celular, especialmente nos lobos frontais e nos gânglios basais (principalmente no núcleo caudado). A gravidade da doença é geralmente proporcional ao número de resíduos adicionais. AONs que direcionam especificamente as repetições CAG expandidas (tal como PS57 (CUG)<sub>7</sub> tal como um 2'-O-metil fosforotioato RNA, SEQ ID NO:1 Evers et al) podem ser aplicados para reduzir eficazmente a transcrição de huntingtina mutante e níveis de proteínas (tóxicos) em células derivadas de pacientes DHB. Para o tratamento de neuropatias, os AONs administrados sistematicamente necessitam de atravessar a barreira hemat-encefálica. Assim, há uma necessidade de otimização da oligoquímica permitindo e/ou exibindo uma melhor entrega do cérebro.

[003] As miopatias incluem distrofias musculares genéticas que se caracterizam por uma fraqueza progressiva e degeneração do esqueleto, do coração e/ou do músculo liso. Exemplos de miopatias são a distrofia muscular de Duchenne

(DMD), distrofia miotônica tipo 1 (DM1), e distrofia miotônica tipo 2 (DM2). DM1 e DM2 são ambas também causadas pela instabilidade de repetição do elemento *cis*; DM1 através de um trinucleotídeo (CTG)<sub>n</sub> repete a expansão na região 3' não traduzida do éxon 15 do gene DMPK, e DM2 através de um tetranucleotídeo (CCTG)<sub>n</sub> repete a expansão no gene DM2/ZF9. Aqui também, os AONs que direcionam especificamente as repetições expandidas, tais como PS58, (CAG)<sub>7</sub>, um 2'-O-metil fosforotioato RNA para DM1 (Mulders et al.), têm sido mostrados para induzir eficientemente a degradação específica dos transcritos de repetição expandidos (tóxico). Em contraste com DMD, onde o defeito do gene está associado com um aumento da permeabilidade das membranas de fibra musculares para compostos pequenos como AONs, para a maioria das outras miopatias uma distribuição melhorada de AON para, e captação pelo tecido muscular é essencial para se obter um efeito terapêutico. Assim, também há aqui uma necessidade de otimização da oligoquímica permitindo e/ou exibindo uma entrega muscular melhorada.

[004] As características particulares de uma química escolhida afeta pelo menos em parte a entrega de um AON ao transcrito alvo: via de administração, bioestabilidade, biodistribuição, distribuição intratecido, e captação celular e tráfico. Além disso, a otimização da química do oligonucleotídeo é concebida para

melhorar a afinidade de ligação e estabilidade, melhorar a atividade, aumentar a segurança, e/ou para reduzir o custo dos produtos, reduzindo o comprimento ou aumentando os procedimentos de síntese e/ou de purificação. Várias modificações químicas têm se tornado de forma geral e/ou comercialmente disponíveis para a comunidade de pesquisa (tais como 2'-O-metil RNA e pirimidinas 5-substituídas e 2,6-diaminopurines), enquanto a maioria das outras ainda apresentam esforço de síntese significativo de se obter. Os resultados preliminares encorajadores especificamente foram obtidos utilizando 2'-O-metil fosforotioato RNA contendo modificações nas bases de pirimidina e purina, tal como aqui identificado.

[005] Em conclusão, para melhorar a aplicabilidade terapêutica de AONs para o tratamento de distúrbios genéticos humanos à instabilidade de repetição do elemento ciss, tal como aqui exemplificado, existe uma necessidade de AONs com características adicionais melhoradas.

### **Descrição da invenção**

#### Oligonucleotídeo

[006] Em um primeiro aspecto, a invenção fornece um oligonucleotídeo compreendendo resíduos de nucleotídeos de 2'-O-metil RNA, possuindo uma cadeia principal em que pelo menos uma porção do fosfato é substituída por uma porção de fosforotioato, e compreendendo uma ou mais bases de 5-

metilpirimidina e/ou uma ou mais 2,6-diaminopurina; ou um oligonucleotídeo consistindo de resíduos de nucleotídeos de 2'-O-metil RNA, e possuindo uma cadeia principal em que todas porções de fosfato são substituídas por porções de fosforotioato, e compreendendo uma ou mais bases de 5-metilpirimidina e/ou uma ou mais de 2,6-diaminopurina, para o uso como um medicamento para o tratamento de distúrbios genéticos humanos associados com a instabilidade de repetição do elemento *cis*.

[007] No contexto da invenção, "cadeia principal" é usada para identificar a cadeia de anéis alternados de ribose e ligações internucleosídeos, para as quais as nucleobases são ligadas. O termo "ligação" é utilizado para a ligação entre duas unidades de ribose (ou seja, "ligação internucleosídeos"), que é geralmente uma porção de fosfato. Assim, um oligonucleotídeo com 10 nucleotídeos pode conter 9 ligações, que liga as 10 unidades de ribose em conjunto. Além disso, pode haver uma ou mais última ligação(s) presentes em um ou ambos os lados do oligonucleotídeo, que só está ligado a um nucleotídeo. Os termos "ligação" e "ligação internucleosídeos" também servem para indicar tal ligação pendente. Pelo menos uma das ligações na cadeia principal do oligonucleotídeo de acordo com a invenção consiste de uma porção de fosforotioato, que liga duas unidades de ribose. Assim, pelo menos uma das porções de

fosfodiéster 3' para 5' que ocorrem naturalmente presentes no RNA, é substituída por uma porção de fosforotioato.

[008] Dentro do contexto da invenção, "uma" em cada uma das seguintes expressões significa "pelo menos uma": um resíduo de nucleotídeo de 2'-O-metil RNA, um resíduo de 2'-O-metil RNA fosforotioato, um resíduo de 2'-O-metil RNA fosforotioato, uma base de 5-metilpirimidina, uma base de 5-metilcitosina, uma base de 5-metiluracila, uma base de timina, uma base de 2,6-diaminopurina.

[009] De preferência, o oligonucleotídeo de acordo com a invenção é um oligonucleotídeo com menos de 37 nucleotídeos. O referido oligonucleotídeo pode ter 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, ou 36 nucleotídeos. Tais oligonucleotídeos podem também ser identificados como um oligonucleotídeo tendo de 12 a 36 nucleotídeos.

[010] Assim, um oligonucleotídeo da invenção, compreendendo um resíduo de nucleotídeo de RNA 2'-O-metil possuindo uma cadeia principal em que pelo menos uma porção do fosfato é substituída por uma porção de fosforotioato, compreende menos do que 37 nucleotídeos (isto é, ele compreende 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos) e uma base de 5-metilpirimidina e/ou uma 2,6-diaminopurina.

[011] De acordo, um oligonucleotídeo da invenção que consiste em resíduos de nucleotídeos de 2'-O-metil RNA e possuindo uma cadeia principal, em que todas as porções de fosfato são substituídas por fosforotioato, e compreendem menos do que 34 nucleotídeos (isto é, ele compreende 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos) e uma base de 5-metilpirimidina e/ou uma de 2,6-diaminopurina.

[012] Em uma modalidade preferida, o oligonucleotídeo da presente invenção compreende um resíduo de nucleotídeo de 2'-O-metil fosforotioato RNA, ou consiste de resíduos de nucleotídeo de 2'-O-metil fosforotioato RNA. Tal oligonucleotídeo compreende um resíduo de 2'-O-metil RNA, o qual está ligado através de uma ligação de fosforotioato ao próximo nucleotídeos na sequência. Este próximo nucleotídeo pode ser, mas não necessariamente, outro resíduo de nucleotídeo de 2'-O-metil fosforotioato RNA. Alternativamente, tal oligonucleotídeo é composto de resíduos de nucleotídeo de 2'-O-metil fosforotioato RNA, em que todos os nucleotídeos compreendem uma porção de 2'-O-metil e uma porção fosforotioato. De preferência, tal oligonucleotídeo é composto por resíduos de nucleotídeos de 2'-O-metil fosforotioato. Esta química é conhecida pelo técnico especialista no assunto. Ao longo do pedido, um oligonucleotídeo compreendendo um resíduo de 2'-O-metil RNA

e uma ligação fosforotioato pode ser substituído por um oligonucleotídeo compreendendo um resíduo de nucleotídeo de metil fosforotioato RNA, ou um oligonucleotídeo que compreende um resíduo de 2'-O-metil fosforotioato RNA. Ao longo do pedido, um oligonucleotídeo que consiste em resíduos de 2'-O-metil RNA ligados por ou conectados através de ligações de fosforotioato ou um oligonucleotídeo constituído por resíduos de nucleotídeo de 2'-O-metil fosforotioato RNA pode ser substituído por um oligonucleotídeo consistindo em 2'-O-metil fosforotioato RNA.

[013] Além disso, um oligonucleotídeo da invenção compreende pelo menos uma alteração de base que aumenta a afinidade de ligação às cadeias alvo, aumenta a temperatura de fusão do duplex resultante do referido oligonucleotídeo com o seu alvo, e/ou reduz os efeitos imunoestimulantes, e/ou aumenta a bioestabilidade, e/ou melhora a biodistribuição e/ou a distribuição intra-tecido, e/ou a captação celular e tráfico. Em uma modalidade, um oligonucleotídeo da invenção compreende uma base de 5-metilpirimidina e/ou uma de 2,6-diaminopurina. Uma base de 5-metilpirimidina é selecionada a partir de uma 5-metilcitosina e/ou uma 5-metiluracila e/ou uma timina, em que a timina é idêntica à 5-metiluracila. Sempre que um oligonucleotídeo da invenção tem duas ou mais tais modificações de bases, tais modificações de bases podem ser

idênticas, por exemplo, todas estas bases modificadas no oligonucleotídeo são 5-metilcitosina, ou as referidas modificações de base podem ser combinações de diferentes modificações de bases, por exemplo, o oligonucleotídeo pode ter uma ou mais 5-metilcitosinas e uma ou mais 5-metiluracilas.

[014] Em uma modalidade preferencial, um oligonucleotídeo da invenção (ou seja, um oligonucleotídeo que compreende resíduos de nucleotídeos de 2'-O-metil RNA, possuindo uma cadeia principal em que pelo menos uma porção do fosfato é substituída por uma porção de fosforotioato, e compreendendo uma ou mais bases de 5-metilpirimidina e/ou uma ou mais de 2,6-diaminopurina, ou um oligonucleotídeo que consiste de resíduos de nucleotídeos de 2'-O-metil RNA e possuindo uma cadeia principal, em que todas as porções de fosfato são substituídas por porções de fosforotioato, e compreendendo uma ou mais 5-metilpirimidina e/ou uma ou mais bases de 2,6-diaminopurina) é tal que não compreendem um 2'-desóxi-2'flúor nucleotídeo (isto é, 2'-desóxi 2'-flúor-adenosina, -guanosina, -uridina e/ou - citidina). Tal oligonucleotídeo compreendendo um nucleotídeo 2'-flúor(2'-F) tem sido mostrado em ser capaz de recrutar o fator potenciador de ligação de interleucina 2 e 3 (ILF20/3) e é, assim, capaz de induzir o salto do éxon no pré-mRNA alvo (Rigo F, et al, WO2011/097614). Na presente invenção, o

oligonucleotídeo utilizado preferencialmente não recruta tais fatores, e/ou o oligonucleotídeo da invenção não formar heteroduplexes com o RNA que são especificamente reconhecidos pela ILF2/3. O mecanismo de ação do oligonucleotídeo da invenção atual é assumido ser distinto de um oligonucleotídeo com um nucleotídeo 2'-F: o oligonucleotídeo da invenção é esperado em induzir principalmente a degradação específica dos transcritos expandidos repetidos (tóxico).

[015] A "timina" e a "5-metiluracila" podem ser trocadas entre si ao longo do documento. Em analogia, a 2,6-diaminopurina é idêntica a 2-aminoadenina, e estes termos podem ser trocados entre si ao longo do documento.

[016] O termo "alteração de base" ou "base modificada", tal como aqui identificados, referem-se à modificação de uma base que ocorre naturalmente no RNA (por exemplo, base de pirimidina ou purina), ou a síntese de novo de uma base. Esta base de novo sintetizada poderia ser qualificada como "modificada" em comparação com uma base existente.

[017] Um oligonucleotídeo da presente invenção que compreende uma base de 5-metilcitosina e/ou uma 5-metiluracila e/ou uma 2,6-diaminopurina significa que pelo menos uma das nucleobases de citosina do referido oligonucleotídeo foi modificada por substituição do próton

na posição 5 do anel de pirimidina com um grupo metil (ou seja, uma 5-metilcitosina), e/ou que pelo menos uma das nucleobases de uracila do referido oligonucleotídeo foi modificada por substituição do próton na posição 5 do anel de pirimidina com um grupo metil (ou seja, uma 5-metiluracila), e/ou que pelo menos uma das nucleobases adenina do referido oligonucleotídeo foi modificada por substituição do próton na posição 2 com um grupo amino (isto é, uma 2,6-diaminopurina), respectivamente. Dentro do contexto da presente invenção, a expressão "a substituição de um próton com um grupo metil na posição 5 do anel de pirimidina" pode ser substituído pelo termo "substituição de uma pirimidina com uma 5-metilpirimidina," com a pirimidina referindo-se apenas à uracila, apenas à citosina ou a ambas. Do mesmo modo, dentro do contexto da invenção, a expressão "a substituição de um próton com um grupo amino na posição 2 da adenina" pode ser substituída pelo termo "substituição de uma adenina com uma 2,6-diaminopurina". Se o referido oligonucleotídeo tem 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou mais citosinas, uracilas, e/ou adeninas, pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou mais citosinas, uracilas e/ou adeninas respectivamente foram modificados dessa forma. De preferência, todas as citosinas, uracilas e/ou adeninas foram modificadas desta maneira, ou substituídas por 5-metilcitosina, 5-metiluracila e/ou 2,6-diaminopurina,

respectivamente. Não é preciso dizer que a invenção só poderia ser aplicada aos oligonucleotídeos que compreendem pelo menos uma citosina, uracila, ou adenina, respectivamente, na sua sequência.

[018] Foi descoberto que a presença de uma 5-metilcitosina, 5-metiluracila e/ou uma 2,6-diaminopurina em um oligonucleotídeo da invenção tem um efeito positivo em pelo menos um dos parâmetros, ou uma melhoria de pelo menos um dos parâmetros dos referidos oligonucleotídeos. Neste contexto, os parâmetros podem incluir: afinidade de ligação e/ou cinética, atividade de silenciamento, bioestabilidade, distribuição (intra-tecido), captação celular e/ou tráfico, e/ou imunogenicidade do referido oligonucleotídeo, tal como explicado abaixo.

[019] A afinidade de ligação e cinética depende das propriedades termodinâmicas do AON. Estes são pelo menos em parte, determinados pela temperatura de fusão do referido oligonucleotídeo (Tm; calculado com, por exemplo, a calculadora de propriedades de oligonucleotídeos (<http://www.unc.edu/~caill/biotool/oligo/index.html> ou <http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>) para o RNA de cadeia simples, usando a Tm de base e o modelo de vizinho mais próximo) e/ou a energia livre do complexo de éxon do oligonucleotídeo-alvo (utilizando a estrutura do RNA versão 4.5 ou RNA mfold versão 3.5). Se uma Tm é aumentada,

a atividade de salto do éxon tipicamente aumenta, mas quando uma Tm é muito elevada, o AON deverá tornar-se menos sequência-específico. Uma Tm aceitável e energia livre dependem da sequência do oligonucleotídeo. Portanto, é difícil para gerar intervalos preferidos para cada um destes parâmetros.

[020] Uma atividade de um oligonucleotídeo da invenção é de inibir a formação de uma proteína mutante e/ou silenciar ou reduzir ou diminuir a quantidade de um transcrito associado à doença ou causador de doenças ou mutante contendo um número extendido ou instável de repetições em uma célula de um paciente, em um tecido de um paciente e/ou em um paciente, tal como explicado mais adiante. Um oligonucleotídeo da presente invenção compreendendo ou consistindo de um 2'-O-metil fosforotioato RNA e uma base 5-metilcitosina e/ou uma 5-metiluracila e/ou uma 2,6-diaminopurina, é previsto para ser capaz de silenciar ou reduzir ou diminuir a quantidade do referido transcrito de forma mais eficiente do que o de um oligonucleotídeo compreendendo ou consistindo de um 2'-O-metil fosforotioato RNA, mas sem qualquer base de 5-metilcitosina, sem qualquer 5-metiluracila e sem qualquer 2,6-diaminopurina irá fazer. Esta diferença em termos de eficiência pode ser de pelo menos 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%. A redução ou

a diminuição pode ser avaliada por Northern Blot ou RT-PCR (semi-) quantitativa para níveis de transcrição (de preferência, realizada na parte experimental), ou por Western blotting para os níveis de proteína. Um oligonucleotídeo da invenção pode ser testado primeiro no sistema celular como fibroblastos derivados dos pacientes, conforme descrito no Exemplo 1.

[021] Biodistribuição e bioestabilidade são, de preferência, pelo menos em parte determinadas por um ensaio de ligação de hibridização validado adaptado de Yu et al., 2002. Em uma modalidade, as amostras de tecidos homogeneizados ou de plama são incubadas com uma sonda de captura de oligonucleotídeo específica. Após a separação, um oligonucleotídeo marcado com DIG é ligado ao complexo e a detecção seguida usando uma peroxidase ligada ao anticorpo anti-DIG. A análise farmacocinética não compartimental é realizada usando o pacote de software WINNONLIN (modelo 200, versão 5.2, Pharsight, Mountainview, CA). Os níveis de AON ( $\mu$ g) por mL de plasma ou mg de tecido são monitorizados ao longo do tempo para avaliar a área sob a curva (AUC), a concentração de pico ( $C_{\max}$ ), tempo para atingir a concentração ( $T_{\max}$ ), a meia-vida terminal, e a desfasagem da absorção ( $t_{lag}$ ). Tal ensaio preferido foi descrito na parte experimental.

[022] AONs podem estimular uma resposta imune inata

por ativação dos receptores do tipo Toll (TLR), incluindo TLR9 e TLR7 (Krieg et al., 1995). A ativação de TLR9 normalmente ocorre devido à presença de sequências de CG não metiladas presentes nos oligodesoxinucleotídeos (ODNs), imitando o DNA bacteriano que ativa o sistema imune inato através da liberação de citocina mediada por TLR9. A modificação 2'-O-metil é, no entanto, sugerida para reduzir significativamente tal efeito possível. TLR7 foi descrito para reconhecer repetições uracila em RNA (Diebold et al., 2006).

[023] A ativação de TLR9 e TLR7 resulta de um conjunto de respostas imunes coordenadas que incluem a imunidade inata (macrófagos, células dendríticas (DC), e as células NK) (Krieg et al, 1995; Krieg, 2000). Várias quimio- e citocinas, tais como IP-10, TNF- $\alpha$ , IL-6, MCP-1 e IFN $\alpha$  (Wagner, 1999; Popovic et al., 2006) têm sido implicadas neste processo. As citocinas inflamatórias atraem células defensivas adicionais do sangue, tais como as células T e B. Os níveis destas citocinas podem ser investigados por testes *in vitro*. Em suma, o sangue humano total é incubado com concentrações crescentes de AONs após o que os níveis das citocinas são determinados por kits padrão de ELISA disponíveis comercialmente. Uma diminuição na imunogenicidade preferencialmente corresponde a uma diminuição detectável da concentração de pelo menos uma das

citocinas mencionadas acima por comparação com a concentração de citocina correspondente, em um ensaio em uma célula tratada com um oligonucleotídeo compreendendo, pelo menos, uma 5-metilcitosina e/ou 5-metiluracila, e/ou 2,6-diaminopurina em comparação com uma célula tratada com um oligonucleotídeo correspondente que não possui 5-metilcitosinas, 5-metiluracilas, ou 2,6-diaminopurinas.

[024] Assim, um oligonucleotídeo preferido da invenção tem um parâmetro melhorado, tal como uma imunogenicidade aceitável ou diminuída e/ou uma melhor biodistribuição e/ou aceitável ou cinéticas de ligação de RNA melhoradas e/ou propriedades termodinâmicas por comparação com um oligonucleotídeo correspondente que consiste de um 2'-O-metil fosforotioato RNA, sem uma 5-metilcitosina, sem uma 5-metiluracila, e sem uma 2,6-diaminopurina. Cada um destes parâmetros poderia ser avaliado usando ensaios conhecidos do técnico especialista ou, de preferência, tal como aqui descrito.

[025] Abaixo são definidas outras químicas e modificações do oligonucleotídeo da invenção. Estas químicas e modificações adicionais podem estar presentes em combinação com a química já definida para o referido oligonucleotídeo, ou seja, a presença de uma 5-metilcitosina, uma 5-metiluracila e/ou uma 2,6-diaminopurina, e o oligonucleotídeo que compreende ou que

consiste em 2'-O-metil fosforotioato RNA.

[026] Um oligonucleotídeo preferido da invenção compreende ou consiste de uma molécula de RNA ou uma molécula de RNA modificada. Em uma modalidade preferida, um oligonucleotídeo é de cadeia simples. O técnico especialista no assunto entenderá que é, no entanto possível que um único oligonucleotídeo de cadeia simples pode formar uma estrutura de cadeia dupla interna. No entanto, este oligonucleotídeo é ainda denominado de um oligonucleotídeo de cadeia simples no contexto da presente invenção. Um oligonucleotídeo de cadeia simples tem várias vantagens em comparação com um siRNA de cadeia dupla oligonucleotídica: (i) a sua síntese está prevista para ser mais fácil do que duas cadeias de siRNA complementares; (ii) existe uma ampla gama de modificações químicas possíveis para aumentar a absorção nas células, uma melhor estabilidade (fisiológica), e para diminuir os potenciais efeitos adversos genéricos; (iii) siRNAs têm um maior potencial de efeitos não-específicos (incluindo genes fora do alvo), e farmacologia exagerada (por exemplo, menor possibilidade de controle da eficácia e seletividade pelo esquema de tratamento ou dose) (iv) siRNAs são menos propensos a agir no núcleo, e não podem ser dirigidos contra ítrons.

[027] Além das modificações acima descritas, o oligonucleotídeo da invenção pode compreender modificações

adicionais, tais como tipos diferentes de resíduos de nucleotídeos do ácido nucleico ou nucleotídeos, tal como descrito abaixo. Diferentes tipos de resíduos de nucleotídeos de ácido nucleico podem ser utilizados para gerar um oligonucleotídeo da invenção. O referido oligonucleotídeo pode possuir pelo menos uma modificação da cadeia principal (ligação internucleosídeos e/ou modificação de açúcar) e/ou pelo menos uma modificação de base em comparação com um oligonucleotídeo baseado em RNA.

[028] Uma modificação de base inclui uma versão modificada das bases purina e pirimidina naturais (por exemplo, adenina, uracila, guanina, citosina, e timina), tais como hipoxantina (por exemplo, inosina), ácido orótico, agmatidina, lisidina, pseudouracila, 2-tiopirimidina (por exemplo, 2-tiouracila, 2-tiotimina), G-clamp e seus derivados, pirimidina 5-substituída (por exemplo, 5-halouracila, 5-propiniluracila, 5-propinilcitosina, 5-aminometiluracila, 5-hidroximetiluracila, 5-aminometilcitosina, 5-hidroximetilcitosina, Super T), 7-deazaguanina, 7-deazaadenina, 7-aza-2,6-diaminopurina, 8-aza-7-deazaguanina, 8-aza-7-deazaadenina, 8-aza-7-deaza-2,6-diaminopurina, Super G, Super A, e N4-etilcitosina, ou derivados dos mesmos; *N*<sup>2</sup>-ciclopentilguanina (cPent-G), *N*<sup>2</sup>-ciclopentil-2-aminopurina (cPent-AP), e *N*<sup>2</sup>-propil-2-aminopurina (Pr-AP), ou derivados das mesmas; e bases

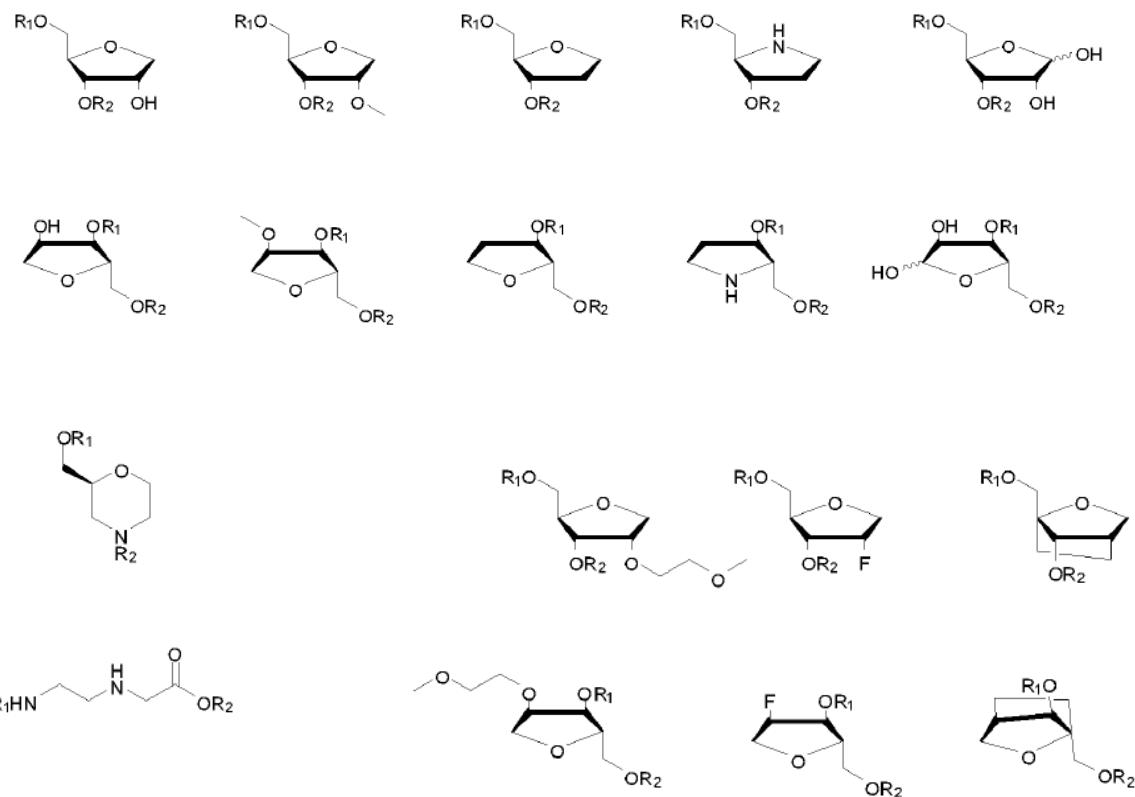
degeneradas ou universais, como 2,6-difluorotolueno ou bases ausentes, tais como sítios abásicos (por exemplo, 1-desoxirribose, 1,2-didesoxirribose, 1-desoxi-2-O-metilribose, ou derivados da pirrolidina, em que o oxigênio do anel foi substituído com nitrogênio (azaribose)). Exemplos de derivados de Super A, Super G e Super T podem ser encontrados na patente norte-americana 6,683,173 (Epoch Biosciences), que é aqui incorporada integralmente por referência. cPent-G, cPent-AP e Pr-AP foram mostrados para reduzir os efeitos imunoestimulantes quando incorporados no siRNA (Peacock H. *et al.*).

[029] Em uma modalidade, um oligonucleotídeo da invenção compreende um sítio abásico ou um monômero abásico. Dentro do contexto da invenção, tal monômero pode ser chamado de um sítio abásico ou um monômero abásico. Um sítio abásico ou um monômero abásico é um resíduo de nucleotídeo ou um bloco de construção que carece de uma nucleobase, em comparação com um resíduo de nucleotídeo correspondente compreendendo uma nucleobase. Dentro do contexto da invenção, um monômero abásico é, portanto, uma parte de um bloco de construção de um oligonucleotídeo, mas que carece de uma nucleobase. Tal monômero abásico pode estar presente, ou acoplado, ou ligado, ou conjugado com um terminal livre de um oligonucleotídeo.

[030] Em uma modalidade mais preferida, um

oligonucleotídeo da invenção compreende de 1 a 10 ou mais monômeros abásicos. Portanto, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, ou mais monômeros abásicos podem estar presentes em um oligonucleotídeo da invenção.

[031] Um monômero abásico pode ser de qualquer tipo conhecido e concebível por um técnico especialista no assunto, exemplos não limitativos dos quais são descritos abaixo:



[032] Aqui,  $R_1$  e  $R_2$  são independentemente H, um oligonucleotídeo ou outro sítio(s) abásico, desde que não ambos  $R_1$  e  $R_2$  sejam H, e  $R_1$  e  $R_2$  não sejam ambos um oligonucleotídeo. Um monômero(s) abásico pode estar ligado em qualquer um ou ambos os terminais do oligonucleotídeo,

conforme especificado anteriormente. Deve ser notado que um oligonucleotídeo ligado a um ou dois sítio(s) abásicos ou monômero(s) abásicos, pode compreender menos do que 12 nucleotídeos. A este respeito, o oligonucleotídeo de acordo com a invenção pode compreender pelo menos 12 nucleotídeos, opcionalmente incluir um ou mais sítios abásicos ou monômeros abásicos em um ou ambos os terminais.

[033] Na listagem de sequências, um oligonucleotídeo da invenção que compreende um monômero abásico pode ser representado pela sua sequência de nucleotídeos ou de base; o monômero abásico não sendo representado, uma vez que pode ser considerado como ligado ou anexado ou conjugado a um terminal livre de um oligonucleotídeo. Este é o caso para sequências de bases de SEQ ID NO: 107 e 108. Na tabela 2, a sequência completa de oligonucleotídeos preferidos compreendendo SEQ ID NO: 107 ou 108 é fornecida: tal oligonucleotídeo compreende a SEQ ID NO: 107 ou 108, e 4 monômeros abásicos no terminal 3' da correspondente SEQ ID NO: 107 ou 108. SEQ ID NO: 220 e 221 correspondem à SEQ ID NO: 107 e 108, que compreende ainda quatro monômeros abásicos adicionais no terminal 3' do oligonucleotídeo.

[034] Quando um monômero abásico está presente dentro de uma sequência de bases de um oligonucleotídeo, o referido monômero abásico é identificado na listagem de

sequências como parte da sequência do referido oligonucleotídeo como na SEQ ID NO: 210 e 213.

[035] Nas tabelas 1 e 2, um monômero abásico é identificado utilizando a letra Q.

[036] Dependendo do seu comprimento, um oligonucleotídeo da invenção pode compreender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, ou 36 modificações de bases. Também está englobado pela invenção introduzir mais do que uma modificação de base distinta no referido oligonucleotídeo.

[001] Uma "modificação de açúcar" indica a presença de uma versão modificada do grupo ribosil conforme ocorrendo naturalmente no RNA (isto é, o grupo furanosil), tais como açúcares bicíclicos, tetrahidropiranos, morfolinos, açúcares 2'-modificados, açúcares 4'-modificados, açúcares 5'-modificados, e açúcares 4'-substituídos. Exemplos de modificações de açúcar adequadas incluem, mas não estão limitadas a, resíduos de nucleotídeos de RNA 2'-O-modificado, tais como tais como 2'-O-alquil ou 2'-O-(substituído)alquil, por exemplo, 2'-O-metil, 2'-O-(2-cianoetil), 2'-O-(2-metóxi)etil(2'-MOE), 2'-O-(2-tiometil)etil, 2'-O-butiril, 2'-O-propargil, 2'-O-alil, 2'-O-(3-amino)propil, 2'-O-(2-(dimetilamino) propil), 2'-O-(2-amino)etil, 2'-O-(2(dimetilamino)etil); 2'-desóxi (DNA); 2'-

*O*-(haloalcóxi)metil (Arai K. *et al.*) por exemplo, 2'-*O*-(2-cloroetoxi)metil (MCEM), 2'-*O*-alquil(2,2-dicloroetóxi)metil (DCEM); 2'-*O*-alcoxicarbonil, por exemplo, 2'-*O*-[2-(*N*-metilcarbamoil)etil] (MOCE), 2'-*O*-[2-(*N,N*-dimetilcarbamoil)etil] (MCE); 2'-halo, por exemplo, 2'-F, FANA (ácido nucleico 2'-F arabinosil); modificações carb-açúcar e aza-açúcar; 3'-*O*-alquil, por exemplo, 3'-*O*-metil, 3'-*O*-butiril, 3'-*O*-propargil; 5'-alquil, por exemplo, 5'-metil (Hari *et al.*); e derivados dos mesmos.

[002] Outra modificação de açúcar inclui ácido nucleico "em ponte" ou "bicíclico" (BNA), por exemplo, ácido nucleico bloqueado (LNA), xilo-LNA,  $\alpha$ -L-LNA,  $\beta$ -D-LNA, cEt (2'-*O*,4'-C etil restrito) LNA, cMOEt (2'-*O*,4'-C metóxi-etyl restrito) LNA, ácido nucleico em ponte de etileno (ENA), BNA<sup>NC</sup>[N-Me] (tal como descrito em Chem. Commun. 2007, 3765, que é incorporado aqui em sua totalidade por referência); DNA tricíclico (tcDNA); ácido nucleico não bloqueado (UNA); BNAs 5'-metil susbstituído (tal como descrito no pedido de patente norte-americano 13/530,218, que é incorporado aqui por referência em sua totalidade); ácido nucleico ciclohexenil (CeNA), ácido nucleico altriol (ANA), ácido nucleico hexitol (HNA), HNA fluorinatado (F-HNA), pirasonil-  
RNA (p-RNA), 3'-desoxipiranosil-DNA (p-DNA); morfolino (como por exemplo, em PMO, PPMO, PMOPlus, PMO-X); e derivados dos

mesmos, preferencialmente ácido nucleico bloqueado (LNA), xilo-LNA,  $\alpha$ -L-LNA,  $\beta$ -D-LNA, cEt (2'-O,4'-C etil restrito) LNA, cMOEt (2'-O,4'-C metóxi-etil restrito) LNA, ácido nucleico em ponte de etileno (ENA), DNA tricíclico (tcDNA), ácido nucleico ciclohexenil (CeNA), ácido nucleico altriol (ANA), ácido nucleico hexitol (HNA), HNA fluorinatado (F-HNA), pirasonil-RNA (p-RNA), 3'-desoxipiranosil-DNA (p-DNA), morfolino (como por exemplo, em PMO, PPMO, PMOPlus, PMO-X) e derivados dos mesmos. Um tcDNA preferido é tc-PS-DNA (DNA tricíclico compreendendo ligação internucleosídica de fosforotioato). Dependendo do seu comprimento, um oligonucleotídeo da invenção pode compreender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 modificações de açúcar. Também está englobado pela invenção a introdução de mais do que uma modificação de açúcar distinta no referido oligonucleotídeo. Em uma modalidade, um oligonucleotídeo conforme definido aqui, compreende ou consiste de um LNA ou derivado do mesmo. Derivados de BNA são, por exemplo, descritos em WO 2011/097641, que é aqui incorporado em sua totalidade por referência. Em uma modalidade mais preferida, um oligonucleotídeo da invenção é inteiramente 2'-O-metil modificado. Exemplos de PMO-X são descritos em WO2011150408, que é aqui incorporado em sua totalidade por referência.

[037] Em uma modalidade preferida, o oligonucleotídeo de acordo com a invenção compreende, além da modificação de açúcar 2'-O-metil obrigatória, pelo menos uma outra modificação de açúcar seleccionada de 2'-O-metil, 2'-O-(2-metóxi)etil, morfolino, um nucleotídeo de ponte ou BNA, ou o oligonucleotídeo compreende tanto nucleotídeos em ponte e 2'-desóxi nucleotídeos modificados (mixmers BNA/DNA). Mais de preferência, o oligonucleotídeo de acordo com a invenção é modificado ao longo do seu comprimento completo com uma modificação de açúcar seleccionada a partir de 2'-O-metil, 2'-O-(2-metóxi)etil, morfolino, ácido nucleico em ponte (BNA) ou mixmer BNA/DNA.

[038] Em uma modalidade mais preferida, o oligonucleotídeo de acordo com a invenção compreende 2'-O-metil totalmente modificado, de preferência 2'-O-metil fosforotioato totalmente modificado.

[039] A "modificação da cadeia principal" indica a presença de uma versão modificada do grupo ribosil ("modificação de açúcar"), tal como indicado acima, e/ou a presença de uma versão modificada do fosfodiéster conforme ocorre naturalmente no RNA ("modificação de ligação internucleosídica"). Exemplos de modificações de ligação internucleosídica que são compatíveis com a presente invenção são fosforotioato (PS), fosforotioato quiramente puro, fosforoditioato (PS2), fosfonoacetato (PACE),

fosfonoacetamida (PACA), tiofosfonoacetato, tiofosfonoacetamida, pró-fármaco fosforotioato, H-fosfonato, metil fostonato, metil fosfonotioato, metil fosfato, metil fosforotioato, etil fosfato, etil fosforotioato, boranofosfato, boranofosforotioato, metil boranofosfato, metil boranofosforotioato, metil boranofosfonato, metil boranofosfonotioato, e derivados dos mesmos. Outra modificação inclui fosforamidita, fosforamidato, fosforamidato N3' → P5', fosfordiamidato, fosforotiodiamidato, sulfamato, dimetilenosulfóxido, sulfonato, triazol, oxalil, carbamato, metileneimino (MMI), e ácido nucleico tioacetamido (TANA); e derivados dos mesmos. Dependendo do seu comprimento, um oligonucleotídeo da invenção pode compreender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, ou 35 modificações da cadeia principal. Também está englobado pela invenção introduzir mais do que uma modificação distinta na cadeia principal do referido oligonucleotídeo.

[040] Um oligonucleotídeo da presente invenção compreende pelo menos uma modificação de fosforotioato. Em uma modalidade mais preferida, um oligonucleotídeo da invenção é fosforotioato totalmente modificado.

[041] Outras modificações químicas de um oligonucleotídeo da invenção incluem o ácido nucleico de

base peptídica (PNA), PNA modificado no grupamento boro, ácido nucleico óxi-peptídeo baseado em pirrolidina (POPNA), ácido nucleico baseado em glicol ou glicerol (GNA), ácido nucleico baseado em treose (TNA), ácido nucleico baseado em treoninol acíclico (aTNA), ácido nucleico baseado em morfolino (PMO, PPMO, PMO-X), oligômeros baseado em morfolino catiônico (PMOPlus), oligonucleotídeos com bases integradas e cadeias principais (ONIBs), oligonucleotídeos pirrolidina-amida (POMs); e derivados dos mesmos.

[042] Em outra modalidade, um oligonucleotídeo compreende um ácido nucleico de peptídeo e/ou um fosforodiamidato morfolino ou um derivado do mesmo.

[043] Deste modo, o oligonucleotídeo preferido, de acordo com um aspecto da invenção, compreende:

(a) pelo menos uma modificação de base selecionada a partir de 5-metilpirimidina e 2,6-diaminopurina; e/ou

(b) pelo menos uma modificação de açúcar, a qual é 2'-O-metil, e/ou

(c) pelo menos uma modificação de cadeia principal, que é de fosforotioato.

[044] Assim, um oligonucleotídeo preferido de acordo com este aspecto da invenção compreende uma modificação da base (a), e nenhuma modificação de açúcar (b), e nenhuma modificação da cadeia principal (c). Outro oligonucleotídeo preferido de acordo com este aspecto da

invenção compreende uma modificação do açúcar (b), e nenhuma modificação de base (a), e nenhuma modificação da cadeia principal (c). Outro oligonucleotídeo preferido de acordo com este aspecto da invenção compreende uma modificação da cadeia principal (c), e nenhuma modificação de base (a), e nenhuma modificação de açúcar (b). Além disso, os oligonucleotídeos possuindo nenhuma das modificações mencionadas acima são entendidos para serem englobados pela presente invenção, bem como os oligonucleotídeos compreendendo duas, ou seja, (a) e (b), (a) e (c), e/ou (b) e (c), ou todas as três das modificações (a), (b) e (c), como definido acima. Em outra modalidade preferida, qualquer um dos oligonucleotídeos, tais como descrito no parágrafo anterior, pode compreender:

(a) pelo menos uma modificação (adicional) de base selecionada a partir de 2-tiouracila, 2-tiotimina, 5-metilcitosina, 5-metiluracila, timina, 2,6-diaminopurina;

(b) e/ou pelo menos uma modificação de açúcar (adicional) selecionada a partir de 2'-O-metil, 2'-O-(2-metóxi)etil, 2'-desóxi (DNA), morfolino, um nucleotídeo em ponte ou BNA, ou o oligonucleotídeo compreende ambos nucleotídeos em ponte e nucleotídeos 2'-desóxi modificados (mixmers BNA/DNA); e/ou

(c) pelo menos uma modificação da cadeia principal (adicional), selecionada a partir de (outro) fosforotioato

ou fosfordiamidato.

[045] Em outra modalidade preferida, o oligonucleotídeo de acordo com a invenção é modificado ao longo de todo o seu comprimento, com um ou mais da mesma modificação, selecionada a partir de (a) uma das modificações de base; e/ou (b) uma das modificações de açúcar; e/ou (c) uma das modificações da cadeia principal.

[046] Com o advento da tecnologia de mimetização de ácido nucleico, tornou-se possível gerar moléculas que têm semelhantes, de preferência as mesmas características de hibridização em espécie não necessariamente em quantidade, como o próprio ácido nucleico. Esses equivalentes funcionais são, naturalmente, também adequados para utilização na invenção.

[047] O técnico especialista no assunto vai entender que nem todos de açúcar, base, e/ou cadeia principal podem ser modificados do mesmo modo. Vários diferentes açúcares, bases e/ou cadeias principais modificados podem ser combinados em um único oligonucleotídeo da invenção.

[048] Um técnico especialista no assunto também reconhecerá que há muitos derivados sintéticos de oligonucleotídeos.

[049] De preferência, o referido oligonucleotídeo comprehende RNA, conforme cadeias duplas de RNA/RNA são muito estáveis. Prefere-se que um oligonucleotídeo de RNA

compreenda uma modificação proporcionando o RNA com uma propriedade adicional, por exemplo, resistência a endonucleases, exonucleases e RNAaseH, força de hibridização adicional, estabilidade aumentada (por exemplo, em um fluido corporal), flexibilidade aumentada ou diminuída, atividade aumentada, toxicidade reduzida, transporte intracelular aumentado, especificidade para tecido, etc. Além disso, o mRNA complexado com o oligonucleotídeo da invenção não é, de preferência, suscetível à clivagem de RNaseH. Modificações preferidas foram identificadas acima. Os oligonucleotídeos que contêm, pelo menos em parte, nucleotídeos de DNA que ocorrem naturalmente são úteis para induzir a degradação das moléculas híbridas de RNA-DNA na célula por atividade de RNase H (EC.3.1.26.4).

[050] Ribonucleotídeos de RNA que ocorrem naturalmente ou ribonucleotídeos sintéticos RNA-semelhantes compreendendo oligonucleotídeos são aqui englobados para formar híbridos de cadeia dupla de RNA-RNA, que atuam como anti-sentido dependente da enzima através da interferência de RNA ou vias de silenciamento (RNAi/siRNA), envolvendo reconhecimento de RNA alvo através do emparelhamento de filamento sentido-antisentido, seguido da degradação do RNA alvo pelo complexo de silenciamento RNA induzido (RISC).

[051] Alternativamente ou em adição, um oligonucleotídeo pode interferir com o processamento ou a

expressão de RNA precursor ou RNA mensageiro (bloqueio estérico, processos independentes de RNaseH) em particular, mas não se limitando ao splicing de RNA e o salto de éxon, através da ligação a uma sequência alvo de RNA transcrito, e ficando na forma de processos tais como a tradução ou o bloqueio dos locais doadores de splice ou aceitadores de splice. Além disso, o oligonucleotídeo pode inibir a ligação de proteínas, fatores nucleares e outros por impedimento estérico e/ou interferir com a dobragem espacial autêntica do RNA alvo, e/ou ligam-se a proteínas que se ligam originalmente ao RNA alvo e/ou têm outros efeitos sobre o RNA alvo, contribuindo assim para a desestabilização do RNA alvo, de preferência, pré-mRNA, e/ou para a diminuição da quantidade de transcrito doente ou tóxico e/ou proteína em doenças como DH, identificadas posteriormente neste documento.

[052] Tal como aqui definido, um oligonucleotídeo pode compreender nucleotídeos com substituições químicas (RNaseH resistente) em pelo menos uma das suas extremidades 5' ou 3', para fornecer estabilidade intracelular, e compreende menos do que 9, mais preferencialmente menos do que 6 nucleotídeos de desoxirribose consecutivos (RNAaseH-sensível) no resto da sua sequência. O restante da sequência está de preferência no centro da sequência. Tal oligonucleotídeo é chamado um gapmer. Gapmers foram

amplamente descritos em WO 2007/089611. Gapmers são projetados para permitir o recrutamento e/ou ativação da RNaseH. Sem pretender ser limitado pela teoria, acredita-se que a RNaseH é recrutada e/ou ativada por meio da ligação para a região central do gapmer feito de desoxirriboses. Um oligonucleotídeo da invenção que é de preferência substancialmente independente de, ou independente de RNaseH é concebido de modo a ter uma zona central, que é substancialmente não capaz ou não é capaz de recrutar e/ou ativar a RNaseH. Em uma modalidade preferida, o resto da sequência do referido oligonucleotídeo, mais preferencialmente a sua parte central, compreende menos de 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, ou nenhuma desoxirribose. Consequentemente, este oligonucleotídeo da invenção é de preferência parcialmente para totalmente substituído, tal como aqui anteriormente definido. "Parcialmente substituído" significa que o oligonucleotídeo compreende pelo menos alguns dos nucleotídeos que foram substituídos, de preferência, pelo menos 50% dos seus nucleotídeos foram substituídos, ou pelo menos, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% ou 95% foram substituídos. 100% de substituição de nucleotídeos correspondem a "totalmente substituído".

[053] Por conseguinte, a invenção fornece um oligonucleotídeo que compreende um resíduo de 2'-O-metil fosforotioato RNA, ou consiste de 2'-O-metil fosforotioato

RNA, e compreende uma base de 5-metilpirimidina e/ou uma de 2,6-diaminopurina. Mais preferencialmente, este oligonucleotídeo é constituído por resíduos de 2'-O-metil RNA ligados através de uma cadeia principal de fosforotioato, e todas as suas citocinas e/ou todas as suas uracilas e/ou todas as suas adeninas, independentemente, foram substituídas por 5-metilcitosina, 5-metiluracila e/ou 2,6-diaminopurina, respectivamente. Assim, um oligonucleotídeo da invenção pode ter:

[054] Pelo menos uma e de preferência todas as citosinas substituídas com 5-metilcitosinas,

[055] Pelo menos uma e de preferência todas as citosinas substituídas com 5-metilcitosinas, e pelo menos uma e de preferência todas as uracilas substituídas com 5-metiluracilas,

[056] Pelo menos uma e de preferência todas as citosinas substituídas com 5-metilcitosinas, e pelo menos uma e de preferência todas as adeninas substituídas com 2,6-diaminopurinas,

[057] Pelo menos uma e de preferência todas as citosinas substituídas com 5-metilcitosinas, e pelo menos uma e de preferência todas as uracilas substituídas com 5-metiluracilas, e pelo menos uma e de preferência todas as adeninas substituídas com 2,6-diaminopurinas,

[058] Pelo menos uma e de preferência todas as

uracilas substituídas com 5-metiluracilas,

[059] Pelo menos uma e de preferência todas as uracilas substituídas com 5-metiluracilas, e pelo menos uma e de preferência todas as adeninas substituídas com 2,6-diaminopurinas, ou

[060] Pelo menos uma e de preferência todas as adeninas substituídas com 2,6-diaminopurinas.

[061] Um oligonucleotídeo da invenção é para uso como um medicamento para a prevenção, retardo e/ou tratamento de um distúrbio genético humano associado à instabilidade de repetição do elemento *cis*, de preferência tal como aqui exemplificado. Um distúrbio genético humano associado à instabilidade de repetição do elemento *cis* tal como aqui identificado é de preferência um distúrbio neuromuscular. De preferência o referido oligonucleotídeo é para uso na modulação terapêutica de RNA. Por isso, o oligonucleotídeo de acordo com a invenção pode ser descrito como um oligonucleotídeo anti-sentido (AON). Um oligonucleotídeo anti-sentido é um oligonucleotídeo que se liga (ou é capaz de se ligar), direciona, hibridiza com (ou é capaz de hibridizar com), e/ou é complementar inverso para uma sequência específica de um transcrito de um gene que é conhecido por estar associada com, ou envolvido em um distúrbio genético humano associado à instabilidade de repetição do elemento *cis*.

[062] De acordo com a invenção, um oligonucleotídeo anti-sentido compreende ou consiste de resíduos de nucleotídeos 2'-O-metil RNA, possuindo uma cadeia principal em que pelo menos uma porção de fosfato é substituída por uma porção de fosforotioato, e que compreende ainda pelo menos um de uma 5-metilcitosina e/ou um 5-metiluracila e/ou uma 2,6-diaminopurina, é representado por uma sequência de nucleotídeos que compreende ou consiste de uma sequência que se liga (ou é capaz de se ligar), hibridiza (ou é capaz de hibridizar), direciona e/ou é complementar inverso a um elemento repetitivo em um transcrito de RNA que tem como unidade nucleotídica repetitiva uma unidade repetitiva de nucleotídeo, a qual é seleccionada a partir de (CAG)<sub>n</sub>, (GCG)<sub>n</sub>, (CGG)<sub>n</sub>, (GAA)<sub>n</sub>, (GCC)<sub>n</sub>, (CCG)<sub>n</sub>, (AUUCU)<sub>n</sub>, (GGGGCC)<sub>n</sub> ou (CCUG)<sub>n</sub>. O referido oligonucleotídeo é preferencialmente um oligonucleotídeo de cadeia única.

[063] Embora deva ser entendido que um oligonucleotídeo da invenção se liga (ou é capaz de se ligar), hibridiza (ou é capaz de hibridizar), direciona e/ou é complementar inverso a um elemento repetitivo presente em um transcrito de RNA tal como identificado acima, não se pode excluir que tal oligonucleotídeo pode também interferir com ou se ligar (ou é capaz de se ligar) ou hibridizar com (ou é capaz de hibridizar) um DNA correspondente, este transcrito de RNA é derivado.

[064] Um elemento de repetição ou repetitivo ou sequência repetitiva ou estiramento repetitivo é aqui definido como uma repetição de pelo menos 3, 4, 5, 10, 100, 1000 ou mais, de uma unidade repetitiva ou unidade de nucleotídeos repetitiva, ou unidade de repetição de nucleotídeos (como (CAG)<sub>n</sub>, (GCG)<sub>n</sub>, (CGG)<sub>n</sub>, (GAA)<sub>n</sub>, (GCC)<sub>n</sub>, (CCG)<sub>n</sub>, (AUUCU)<sub>n</sub>, (GGGGCC)<sub>n</sub> ou (CCUG)<sub>n</sub>), compreendendo uma unidade repetitiva de trinucleotídeos, ou, alternativamente, uma unidade repetitiva de nucleotídeos 4, 5 ou 6, em uma sequência do gene transrito no genoma de um indivíduo, incluindo um indivíduo humano. Por conseguinte, n é um número inteiro e pode ser pelo menos 3, 4, 5, 10, 100, 1000 ou mais. A invenção não está limitada às unidades de nucleotídeos repetitivas exemplificadas. Outra unidade de nucleotídeo repetitiva pode ser encontrada no seguinte sítio eletrônico <http://neuromuscular.wustl.edu/mother/dnarep.htm>. Na maioria dos pacientes, a repetição "pura" ou elemento repetitivo ou sequência repetitiva ou estiramento repetitivo, tal como identificado acima, (como (CAG)<sub>n</sub>, (GCG)<sub>n</sub>, (CGG)<sub>n</sub>, (GAA)<sub>n</sub>, (GCC)<sub>n</sub>, (CCG)<sub>n</sub>, (AUUCU)<sub>n</sub>, (GGGGCC)<sub>n</sub> ou (CCUG)<sub>n</sub>) está presente em uma sequência transcrita do gene no genoma do referido paciente. No entanto, também é embogado pela invenção, que em alguns pacientes, o referido elemento de repetição ou repetitivo, ou sequência repetitiva ou estiramento repetitivo, tal como identificado acima, não

é qualificado como "puro" ou é qualificado como uma "variante" quando, por exemplo, , o referido elemento de repetição ou repetitivo ou sequência repetitiva ou estiramento repetitivo, tal como identificado acima, é intercalado com pelo menos 1, 2 ou 3 nucleotídeos(s) que não se encaixam no nucleotídeo(s) do referido elemento de repetição ou repetitivo, ou seqüência repetitiva ou estiramento repetitivo (Braida C , et al,).

[065] Um oligonucleotídeo de acordo com a invenção, portanto, pode não necessitar de ser 100% complementar inverso para uma repetição alvo. Normalmente, um oligonucleotídeo da invenção pode ser pelo menos 90%, 95%, 97%, 99% ou 100% complementar inverso a uma repetição alvo.

[066] Em uma modalidade, um oligonucleotídeo anti-sentido comprehende ou consiste de 2'-O-metil fosforotioato RNA, comprehende uma 5-metilcitosina e/ou uma 5-metiluracila e/ou uma 2,6-diaminopurina, é representado por uma sequência de nucleotídeos que inclui ou que consiste de uma sequência que se liga (ou é capaz de se ligar), hibridiza (ou é capaz de hibridizar), direciona e/ou é complementar inverso a um trato  $(CAG)_n$  em um transcrito, e é particularmente útil para o tratamento, retardo, melhoria e/ou prevenção das doenças genéticas humanas, doença de Huntington (DH), ataxia espinocerebelar (SCA) do tipo 1, 2, 3, 6, 7, 12 ou 17, esclerose lateral amiotrófica (ELA), demência frontotemporal

(FTD), atrofia espinhal ligada ao X e muscular bulbar (SBMA), e/ou atrofia dentatorubro-palidoluisiana (DRPLA) causada por expansões de repetições CAG nos transcritos de genes HTT (SEQ ID NO:80), ATXN1 (SEQ ID NO:81), ATXN2 (SEQ ID NO:82) ATXN3 (SEQ ID NO:83), CACNA1A (SEQ ID NO:84), ATXN7 (SEQ ID NO:85), PPP2R2B (SEQ ID NO:86), TBP (SEQ ID NO:87), AR (SEQ ID NO 88) ou ATN1 (SEQ ID NO:89). De preferência, estes genes são de origem humana. Nesta modalidade, um oligonucleotídeo comprehende ou consiste de 2'-O-metil fosforotioato RNA, comprehende uma 5-metilcitosina, e/ou uma 5-metiluracila e/ou, uma 2,6-diaminopurina, é representado por uma sequência de nucleotídeos que comprehende ou consiste de uma seqüência que se liga (ou é capaz de se ligar), hibridiza (ou é capaz de hibridizar), direciona e/ou é complementar inverso a uma repetição (CAG)<sub>n</sub> tal como acima identificada, e tem unidade de nucleotídeos repetitiva (CUG)<sub>m</sub>. O m em (CUG)<sub>m</sub> é de preferência um número inteiro que é 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12. Em uma modalidade preferida, m é 5 ou 6 ou 7 ou 8 ou 9 ou 10 ou 11 ou 12.

[067] Deve ser notado que para o ALS e FTD, sabe-se que pelo menos duas repetições distintas em pelo menos dois transcritos diferentes podem ser envolvidas ou podem ser responsáveis ou relacionadas com a doença. Uma foi identificada no parágrafo anterior (isto é, (CAG)<sub>n</sub> em um transrito ATXN2). A outra está sendo identificada mais tarde

como uma repetição (GGGGCC)<sub>n</sub> ou trato em um transcrito C90RF72. Isso significa que, para cada uma dessas duas doenças, pode-se considerar a hipótese de utilizar tanto um destes dois oligonucleotídeos distintos da invenção para induzir especificamente a degradação específica dos transcritos de repetição expandidos correspondentes (tóxicos).

[068] Ao longo do pedido, um oligonucleotídeo definido como sendo complementar inverso para, ligando (sendo capaz de se ligar), hibridizando (sendo capaz de hibridizar), ou se direcionando para uma repetição tal como acima identificada, e tem ou compreende uma unidade repetitiva de nucleotídeo pode ter qualquer comprimento compreendido entre 12 a 36 nucleotídeos. Se tomarmos o exemplo de CUG como unidade repetitiva de nucleotídeos compreendida dentro do referido oligonucleotídeo, qualquer oligonucleotídeo que compreende UGC ou GCU como unidade repetitiva de nucleotídeos também é englobado pela presente invenção. Dependendo do comprimento do referido oligonucleotídeo (por exemplo, de 12 a 36 nucleotídeos), a referida unidade repetitiva de nucleotídeos pode não ser completa no lado 5' e/ou 3' do referido oligonucleotídeo. Cada um dos referidos oligonucleotídeos está englobado no escopo da referida invenção.

[069] Alternativamente, se ainda tomarmos como

exemplo o oligonucleotídeo tendo CUG como unidade repetitiva de nucleotídeos, ele pode ser representado por  $H-(P)_p-(CUG)_m-(Q)_q-H$ , em que  $m$  é um número inteiro, tal como definido anteriormente. Cada ocorrência de  $P$  e  $Q$  é, individualmente, um monômero abásico, tal como definido acima ou um nucleotídeo, tal como A, C, G, U ou um análogo ou equivalente do mesmo, e  $p$  e  $q$  são cada um individualmente um número inteiro, de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ou superior até 100 Assim,  $p$  e  $q$  são cada um individualmente um número inteiro de 0 a 100, de preferência um número inteiro de 0 a 20, mais preferencialmente um número inteiro de 0 a 10, mais preferencialmente de 0 a 6, ainda mais preferivelmente de 0 a 3. Assim, quando  $p$  é 0,  $P$  está ausente, e quando  $q$  é 0,  $Q$  está ausente. O técnico especialista no assunto apreciará que um oligonucleotídeo irá sempre iniciar com, e terminar com um átomo de hidrogenio (H), independentemente da quantidade e da natureza dos nucleotídeos presentes no oligonucleotídeo.

[070] Será apreciado que aqui  $(CUG)_m$  pode ser substituído por qualquer unidade de repetição de nucleotídeos dentro do contexto da invenção. Assim, um oligonucleotídeo preferido de acordo com a invenção pode ser representado por  $H-(P)_p-(R)_r-(Q)_q-H$ , em que  $(R)_r$  é uma unidade de repetição de nucleotídeos dentro do contexto da invenção

e  $P$ ,  $Q$ ,  $p$  e  $q$  são como definidos acima.

[071] No contexto da presente invenção, um "análogo" ou um "equivalente" de um nucleotídeo é para ser entendido como um nucleotídeo, que compreende pelo menos uma modificação no que diz respeito aos nucleotídeos de ocorrência natural no RNA, tais como A, C, G e U. Tal modificação pode ser uma modificação de ligação internucleosídica, e/ou uma modificação de açúcar, e/ou uma modificação de base, tal como explicado e exemplificado acima. Novamente tomando o oligonucleotídeo tendo CUG como unidade repetitiva de nucleotídeos, é para ser entendido que a sequência de repetição pode começar ou com um C, um U ou um G. Assim, em uma modalidade preferida,  $p$  não é 0, e  $(P)_p$  é representado por  $(P')_{p'}UG$  ou  $(P')_{p''}G$ , em que cada ocorrência de  $P'$  é, individualmente, um sitio abásico ou um nucleotídeo, tal como A, C, G, U ou um análogo ou um equivalente do mesmo, e  $p'$  é  $p - 2$  e  $p''$  é  $p - 1$ . Tais oligonucleotídeos podem ser representados como:

$H - (P')_{p'}UG - (CUG)_m - (Q)_q - H$  or

$H - (P')_{p''}G - (CUG)_m - (Q)_q - H$ .

[072] Em uma modalidade igualmente preferida,  $q$  não é 0, e  $(Q)_q$  é representado por  $CU(Q')_{q'} ou C(Q')_{q''}$ , e cada ocorrência de  $Q'$  é, individualmente, um sitio abásico ou um nucleotídeo, tais como A, C, G, U ou um análogo ou um equivalente do mesmo, e  $q'$  é  $q - 2$  e  $q''$  é  $q - 1$ . Tais

oligonucleotídeos podem ser representados como:

$H - (P) p - (CUG) m - CU (Q') q' - H$  or

$H - (P) p - (CUG) m - C (Q') q'' - H$ .

[073] Em outra modalidade preferida, ambos  $p$  e  $q$  não são 0, e ambos  $(P)_p$  e  $(Q)_q$  são representados por  $(P')_{p'}UG$  ou  $(P')_{p''}G$  e  $CU(Q')_{q'}$  ou  $C(Q')_{q''}$ , respectivamente, em que  $P'$ ,  $Q'$ ,  $p'$ ,  $p''$ ,  $q'$  e  $q''$  são tal como definido acima. Tais oligonucleotídeos podem ser representados como:

$H - (P')_{p'}UG - (CUG)_{m} - CU (Q')_{q'} - H$ ,

$H - (P')_{p''}G - (CUG)_{m} - CU (Q')_{q'} - H$ ,

$H - (P')_{p'}UG - (CUG)_{m} - C (Q')_{q''} - H$ , or

$H - (P')_{p''}G - (CUG)_{m} - C (Q')_{q''} - H$ .

[074] É para ser entendido que  $p'$ ,  $p''$ ,  $q'$  e  $q''$  podem não ser números inteiros negativos. Assim, quando  $(P)_p$  é representado por  $(P')_{p'}UG$  ou  $(P')_{p''}G$ ,  $p$  é pelo menos 1 ou pelo menos 2, respectivamente, e quando  $(Q)_q$  é representado por  $CU(Q')_{q'}$  ou  $C(Q')_{q''}$ ,  $q$  é pelo menos 1 ou pelo menos 2, respectivamente.

[075] É para ser entendido que todos os aqui referidos em relação à unidade de repetição CUG podem ser estendidos a qualquer unidade de repetição dentro do contexto da invenção.

[076] Em uma modalidade preferida, um oligonucleotídeo definido como sendo complementar inverso para, ligando (ou sendo capaz de se ligar), hibridizando (ou

sendo capaz de hibridizar), ou se direcionando para uma repetição (CAG)<sub>n</sub> compreende ou é constituído por uma unidade repetitiva de nucleotídeos (XYG)<sub>m</sub>, e tem um comprimento compreendido entre 12 e 36 nucleotídeos e em que cada X é C ou 5-metilcitosina, e cada Y é U ou 5-metiluracila, de tal modo que pelo menos um X é 5-metilcitosina e/ou pelo menos um Y é 5-metiluracila. m é um número inteiro. No contexto desta modalidade, m pode ser 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12. Um valor preferido para m é 7.

[077] Por conseguinte, um oligonucleotídeo mais preferido compreende ou é constituído por uma unidade repetitiva de nucleotídeos (XYG)<sub>m</sub>, em que cada X é C ou 5-metilcitosina, e cada Y é U ou 5-metiluracila, de tal modo que pelo menos um X é 5-metilcitosina, e/ou pelo menos um Y é 5-metiluracila, e m é um número inteiro de 4 a 12 (SEQ ID NO:2 a 12).

[078] Um oligonucleotídeo ainda mais preferido compreende ou é constituído por uma unidade repetitiva de nucleotídeos (XYG)<sub>m</sub>, em que cada X é 5-metilcitosina, e/ou cada Y é 5-metiluracila, e m é um número inteiro de 4 a 12 (SEQ ID NO: 2 a 12).

[079] Por conseguinte, um oligonucleotídeo ainda mais preferido compreende ou é constituído por uma unidade repetitiva de nucleotídeos (XYG)<sub>5</sub>, (XYG)<sub>6</sub> ou (XYG)<sub>7</sub>, (XYG)<sub>8</sub>, ou (XYG)<sub>9</sub>, em que cada X é C ou 5-metilcitosina, e cada Y é

U ou 5-metiluracila, de tal modo que pelo menos um X é 5-metilcitosina e/ou pelo menos um Y é 5-metiluracila. Mais preferido é um oligonucleotídeo que compreende ou que consiste em  $(XYG)_7$ , em que cada X é C ou 5-metilcitosina, e cada Y é U ou 5-metiluracila, de tal modo que pelo menos um X é 5-metilcitosina, e/ou pelo menos um Y é 5-metiluracila (SEQ ID NO:7).

[080] Um oligonucleotídeo ainda mais preferido compreende ou é constituído por uma unidade repetitiva de nucleotídeos  $(XYG)_7$ , em que cada X é 5-metilcitosina e cada Y representa um uracila (SEQ ID NO: 2), ou cada um X é uma citosina e cada Y é 5-metiluracila (SEQ ID NO:3). Um oligonucleotídeo ainda mais preferido compreende a SEQ ID NO: 2 ou 3, e tem um comprimento de 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 nucleotídeos.

[081] As sequências de oligonucleotídeos mais preferidas compreendem ou consistem de uma unidade repetitiva de nucleotídeos  $(XYG)_m$  foram identificadas na tabela 2 como SEQ ID NO: 90 a 118.

[082] Um oligonucleotídeo preferido compreende ou consiste em 2'-O-metil fosforotioato RNA compreende uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 90 a 106, e tem um comprimento de 21 a 36 nucleotídeos, mais preferencialmente 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. Um oligonucleotídeo ainda mais preferida

consiste em 2'-O-metil fosforotioato RNA, e compreende uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 90 a 106, e tem um comprimento de 21 a 36 nucleotídeos, mais preferencialmente 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. O oligonucleotídeo mais preferido consiste de 2'-O-metil fosforotioato RNA, tem uma sequência de bases que consiste em uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 90 a 106 e tem um comprimento de 21 nucleotídeos.

[083] Um oligonucleotídeo preferido compreendendo ou consistindo de 2'-O-metil fosforotioato RNA compreende uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 107 ou 108, e tem um comprimento de 21 a 36 nucleotídeos, mais preferencialmente 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. Um oligonucleotídeo ainda mais preferido consiste em 2'-O-metil fosforotioato RNA, e compreende uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 107 ou 108, e tem um comprimento de 21 a 36 nucleotídeos, mais preferencialmente 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. O oligonucleotídeo ainda mais preferido consiste de 2'-O-metil fosforotioato RNA, tem uma sequência de bases que consiste em uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 107 ou 108, e tem um comprimento de 21 nucleotídeos.

[084] O oligonucleotídeo mais preferido consiste de 2'-O-metil fosforotioato RNA, tem uma sequência de bases que

consiste em uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 107 ou 108, tem um comprimento de 21 nucleotídeos e, adicionalmente, comprehende quatro monômeros abásicos em um dos seus terminais, de preferência, no terminal 3'. O referido oligonucleotídeo mais preferido é representado por uma sequência de bases que consiste em SEQ ID NO: 220 ou 221.

[085] Um oligonucleotídeo preferido compreendendo ou consistindo em 2'-O-metil fosforotioato RNA comprehende uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 109 ou 110, e tem um comprimento de 24 a 36 nucleotídeos, mais preferencialmente 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. Um oligonucleotídeo ainda mais preferida consiste em 2'-O-metil fosforotioato RNA, e comprehende uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 109 ou 110, e tem um comprimento de 24 a 36 nucleotídeos, mais preferencialmente 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. O oligonucleotídeo mais preferido consiste de 2'-O-metil fosforotioato RNA, tem uma sequência de bases que consiste em uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 109 ou 110, e tem um comprimento de 24 nucleotídeos.

[086] Um oligonucleotídeo preferido compreende ou consiste em 2'-O-metil fosforotioato RNA, comprehende uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 111 ou 112, e tem um comprimento de 27 a 36 nucleotídeos, mais preferencialmente 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. Um

oligonucleotídeo ainda mais preferido consiste em 2'-O-metil fosforotioato RNA, e compreende uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 111 ou 112, e tem um comprimento de 27 a 36 nucleotídeos, mais preferencialmente 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. O oligonucleotídeo mais preferido consiste de 2'-O-metil fosforotioato RNA, tem uma sequência de bases que consiste em uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 111 ou 112, e tem um comprimento de 27 nucleotídeos.

[087] Um oligonucleotídeo preferido compreendendo ou consistindo de 2'-O-metil fosforotioato RNA compreende uma das sequências de bases SEQ ID NO: 113 ou 114, e tem um comprimento de 30 a 36 nucleotídeos, mais de preferência 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. Um oligonucleotídeo ainda mais preferido consiste em 2'-O-metil fosforotioato RNA, e compreende uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 113 ou 114, e tem um comprimento de 30 a 36 nucleotídeos, mais preferencialmente 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. O oligonucleotídeo mais preferido consiste de 2'-O-metil fosforotioato RNA, tem uma sequência de bases que consiste em uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 113 ou 114, e tem um comprimento de 30 nucleotídeos.

[088] Um oligonucleotídeo preferido compreendendo ou consistindo de 2'-O-metil fosforotioato RNA compreende uma das sequências de bases SEQ ID NO: 115 ou 116, e tem um

comprimento de 33 a 36 nucleotídeos, mais de preferência 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. Um oligonucleotídeo ainda mais preferido consiste em 2'-O-metil fosforotioato RNA, e compreende uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 115 ou 116, e tem um comprimento de 30 a 36 nucleotídeos, mais preferencialmente 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. O oligonucleotídeo mais preferido consiste de 2'-O-metil fosforotioato RNA, tem uma sequência de bases que consiste em uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 115 ou 116, e tem um comprimento de 33 nucleotídeos.

[089] Um oligonucleotídeo preferido compreendendo ou consistindo de 2'-O-metil fosforotioato RNA compreende uma das sequências de bases SEQ ID NO: 117 ou 118, e tem um comprimento de 36 nucleotídeos. O oligonucleotídeo mais preferido consiste de 2'-O-metil fosforotioato RNA, tem a sua sequência de bases que consiste em uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 117 ou 118, e tem um comprimento de 36 nucleotídeos.

[090] Em outra modalidade, um oligonucleotídeo anti-sentido compreendendo ou consistindo de 2'-O-metil fosforotioato RNA, e que compreende uma 5-metilcitosina é representado por uma sequência de nucleotídeos compreendendo ou consistindo de uma sequência que se liga a (ou é capaz de se ligar a), hibridiza (ou é capaz de hibridizar), se direciona para, e/ou é complementar inverso a uma repetição

(GCG)<sub>n</sub> em um transcrito, e é particularmente útil para o tratamento, retardo, melhora e/ou prevenção das doenças genéticas humanas: síndrome do espasmo infantil, displasia deidocranial, blefarofimose, síndrome mão-pé genital, sinpolidactilia, distrofia muscular oculofaríngea, e/ou holoprosencefalia, que são causadas por expansões de repetição nos genes ARX, CBFA1, FOXL2, HOXA13, HOXD13, OPDM/PABP2, TCFBR1 ou ZIC2. De preferência, estes genes são de origem humana.

[091] Em uma modalidade preferida, um oligonucleotídeo definido como sendo complementar inverso para, se ligando (ou ser capaz de se ligar), hibridizando (ou sendo capaz de hibridizar), ou um se direcionando para uma repetição (GCG)<sub>n</sub> compreende ou é constituído por uma unidade repetitiva de nucleotídeos (XGX)<sub>m</sub>, e tem um comprimento compreendido entre 12 e 36 nucleotídeos, e em que cada X é C ou 5-metilcitosina, de tal modo que pelo menos um X é 5-metilcitosina. m é um número inteiro. No contexto desta modalidade, m pode ser 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12. Um valor preferido para m é 7.

[092] Por conseguinte, um oligonucleotídeo mais preferido compreende ou é constituído por uma unidade repetitiva de nucleotídeos (XGX)<sub>m</sub>, em que pelo menos um X é 5-metilcitosina, e m é um número inteiro de 4 a 12 (SEQ ID NO: 13 a 21). Um oligonucleotídeo ainda mais preferido

compreende ou é constituído por uma unidade repetitiva de nucleotídeos (XGX)<sub>m</sub>, em que cada X é 5-metilcitosina, e m é um número inteiro de 4 a 12 (SEQ ID NO: 13 a 21).

[093] Por conseguinte, um oligonucleotídeo ainda mais preferido comprehende ou é constituído por uma unidade repetitiva de nucleotídeos (XGX)<sub>7</sub>(SEQ ID NO:16), em que pelo menos um X é 5-metilcitosina. Um oligonucleotídeo ainda mais preferido comprehende ou é constituído por uma unidade repetitiva de nucleotídeos (XGX)<sub>7</sub>(SEQ ID NO:16), em que cada X é 5-metilcitosina.

[094] As sequências de oligonucleotídeos mais preferidas comprehendem ou consistem de uma unidade repetitiva de nucleotídeos (XGX)<sub>m</sub> foram identificadas na tabela 2 como SEQ ID NO: 119 a 132.

[095] Um oligonucleotídeo preferido comprehendendo ou consistindo em 2'-O-metil fosforotioato RNA comprehende uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 119 ou 120, e tem um comprimento de 12 a 36 nucleotídeos, mais preferencialmente 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. Um oligonucleotídeo ainda mais preferido consiste em 2'-O-metil fosforotioato RNA, e comprehende uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 119 ou 120, e tem um comprimento de 16 a 36 nucleotídeos, mais preferencialmente 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26,

27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. O oligonucleotídeo mais preferido consiste de 2'-O-metil fosforotioato RNA, tem uma sequência de bases que consiste em uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 119 ou 120, e tem um comprimento de 12 nucleotídeos.

[096] Um oligonucleotídeo preferido compreendendo ou consistindo em 2'-O-metil fosforotioato RNA compreende uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 121 ou 122, e tem um comprimento de 15 a 36 nucleotídeos, mais preferencialmente 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. Um oligonucleotídeo ainda mais preferido consiste em 2'-O-metil fosforotioato RNA, e compreende uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 121 ou 122, e tem um comprimento de 15 a 36 nucleotídeos, mais preferencialmente 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. O oligonucleotídeo mais preferido consiste de 2'-O-metil fosforotioato RNA, tem uma sequência de bases que consiste em uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 121 ou 122, e tem um comprimento de 15 nucleotídeos.

[097] Um oligonucleotídeo preferido compreendendo ou consistindo em 2'-O-metil fosforotioato RNA compreende uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 123 ou 124, e tem um comprimento de 18 a 36 nucleotídeos, mais preferencialmente 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27,

28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. Um oligonucleotídeo ainda mais preferido consiste em 2'-O-metil fosforotioato RNA, e compreende uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 123 ou 124, e tem um comprimento de 18 a 36 nucleotídeos, mais preferencialmente 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. O oligonucleotídeo mais preferido consiste de 2'-O-metil fosforotioato RNA, tem uma sequência de bases que consiste em uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 123 ou 124, e tem um comprimento de 18 nucleotídeos.

[098] Um oligonucleotídeo preferido compreendendo ou consistindo em 2'-O-metil fosforotioato RNA compreende uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 125 ou 126, e tem um comprimento de 21 a 36 nucleotídeos, mais preferencialmente 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. Um oligonucleotídeo ainda mais preferido consiste em 2'-O-metil fosforotioato RNA, e compreende uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 125 ou 126, e tem um comprimento de 21 a 36 nucleotídeos, mais preferencialmente 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. O oligonucleotídeo mais preferido consiste de 2'-O-metil fosforotioato RNA, tem uma sequência de bases que consiste em uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 125 ou 126, e tem um comprimento de 21 nucleotídeos.

[099] Um oligonucleotídeo preferido compreendendo ou consistindo em 2'-O-metil fosforotioato RNA compreende uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 127 ou 128, e tem um comprimento de 24 a 36 nucleotídeos, mais preferencialmente 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. Um oligonucleotídeo ainda mais preferido consiste em 2'-O-metil fosforotioato RNA, e compreende uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 127 ou 128, e tem um comprimento de 24 a 36 nucleotídeos, mais preferencialmente 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. O oligonucleotídeo mais preferido consiste de 2'-O-metil fosforotioato RNA, tem uma sequência de bases que consiste em uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 127 ou 128, e tem um comprimento de 24 nucleotídeos.

[100] Um oligonucleotídeo preferido compreendendo ou consistindo em 2'-O-metil fosforotioato RNA compreende uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 129 ou 130, e tem um comprimento de 27 a 36 nucleotídeos, mais preferencialmente 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. Um oligonucleotídeo ainda mais preferido consiste em 2'-O-metil fosforotioato RNA, e compreende uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 129 ou 130, e tem um comprimento de 27 a 36 nucleotídeos, mais preferencialmente 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. O oligonucleotídeo mais preferido consiste de 2'-O-metil

fosforotioato RNA, tem uma sequência de bases que consiste em uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 129 ou 130, e tem um comprimento de 27 nucleotídeos.

[101] Um oligonucleotídeo preferido compreendendo ou consistindo em 2'-O-metil fosforotioato RNA compreende uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 131 ou 132, e tem um comprimento de 30 a 36 nucleotídeos, mais preferencialmente 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. Um oligonucleotídeo ainda mais preferido consiste em 2'-O-metil fosforotioato RNA, e compreende uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 131 ou 132, e tem um comprimento de 30 a 36 nucleotídeos, mais preferencialmente 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. O oligonucleotídeo mais preferido consiste de 2'-O-metil fosforotioato RNA, tem uma sequência de bases que consiste em uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 131 ou 132, e tem um comprimento de 30 nucleotídeos.

[102] Em outra modalidade, um oligonucleotídeo compreendendo ou consistindo em 2'-O-metil fosforotioato RNA e compreendendo uma 5-metilcitosina, é representado por uma sequência de nucleotídeos compreendendo ou consistindo de uma sequência que se liga (ou é capaz de se ligar), se direciona para, hibridiza (ou é capaz de hibridizar), e/ou é complementar inverso a uma repetição  $(CGG)_n$  em um transcrito e é particularmente útil para o tratamento, retardo, melhora e/ou prevenção de síndromas X frágeis

humanas, causadas pela expansão de repetição no gene FMR1.

De preferência, estes genes são de origem humana.

[103] Em uma modalidade preferida, um oligonucleotídeo definido como sendo complementar inverso para, se ligando a (ou é capaz de se ligar), hibridizando (ou é capaz de hibridizar), ou se direcionando para a repetição (CGG)<sub>n</sub> compreende ou é constituído por uma unidade repetitiva de nucleotídeos (XXG)<sub>m</sub> e tem um comprimento compreendido entre 12 e 36 nucleotídeos e em que cada X é C ou 5-metilcitosina, de tal modo que pelo menos um X é 5-metilcitosina. m é um número inteiro. No contexto desta modalidade, m pode ser 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 Um valor preferido para m é 7.

[104] Por conseguinte, um oligonucleotídeo mais preferido compreende ou é constituído por uma unidade repetitiva de nucleotídeos (XXG)<sub>m</sub>, em que cada X é C ou 5-metilcitosina, de tal modo que pelo menos um X é 5-metilcitosina, e m é um número inteiro de 4 a 12 (SEQ ID NO: 22 a 30). Um oligonucleotídeo ainda mais preferido compreende ou é constituído por uma unidade repetitiva de nucleotídeos (XXG)<sub>m</sub>, em que cada X é 5-metilcitosina, e m é um número inteiro de 4 a 12 (SEQ ID NO: 22 a 30).

[105] Por conseguinte, um oligonucleotídeo ainda mais preferido compreende ou é constituído por uma unidade repetitiva de nucleotídeos (XXG)<sub>7</sub> (SEQ ID NO: 25), em que

cada X é C ou 5-metilcitosina, de tal modo que pelo menos um X é 5-metilcitosina.

[106] Um oligonucleotídeo ainda mais preferido compreende ou é constituído por uma unidade repetitiva de nucleotídeos (XXG)<sub>7</sub> (SEQ ID NO: 25), em que cada X é 5-metilcitosina.

[107] As sequências de oligonucleotídeos mais preferidas compreendem ou consistem de uma unidade repetitiva de nucleotídeos (XXG)<sub>m</sub> foram identificadas na tabela 2 como SEQ ID NO: 133 a 146.

[108] Um oligonucleotídeo preferido compreendendo ou consistindo de 2'-O-metil fosforotioato RNA compreende uma das sequências de bases SEQ ID NO: 133 ou 134 e tem um comprimento de 12 a 36 nucleotídeos, mais de preferência 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. Um oligonucleotídeo ainda mais preferido consiste em 2'-O-metil fosforotioato RNA e compreende uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 133 ou 134, e tem um comprimento de 12 a 36 nucleotídeos, mais preferencialmente 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. O oligonucleotídeo mais preferido consiste de 2'-O-metil fosforotioato RNA, tem uma sequência de bases que consiste de uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 133 ou 134, e tem um comprimento de 12

nucleotídeos.

[109] Um oligonucleotídeo preferido compreendendo ou consistindo de 2'-O-metil fosforotioato RNA compreende uma das sequências de bases SEQ ID NO: 135 ou 136 e tem um comprimento de 15 a 36 nucleotídeos, mais de preferência 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. Um oligonucleotídeo ainda mais preferido consiste em 2'-O-metil fosforotioato RNA e compreende uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 135 ou 136, e tem um comprimento de 15 a 36 nucleotídeos, mais preferencialmente 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. O oligonucleotídeo mais preferido consiste de 2'-O-metil fosforotioato RNA, tem uma sequência de bases que consiste de uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 135 ou 136, e tem um comprimento de 15 nucleotídeos.

[110] Um oligonucleotídeo preferido compreendendo ou consistindo de 2'-O-metil fosforotioato RNA compreende uma das sequências de bases SEQ ID NO: 137 ou 138 e tem um comprimento de 18 a 36 nucleotídeos, mais de preferência 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. Um oligonucleotídeo ainda mais preferido consiste em 2'-O-metil fosforotioato RNA e compreende uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 137 ou 138, e tem um comprimento de 18 a 36 nucleotídeos, mais

preferencialmente 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. O oligonucleotídeo mais preferido consiste de 2'-O-metil fosforotioato RNA, tem uma sequência de bases que consiste de uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 137 ou 138, e tem um comprimento de 18 nucleotídeos.

[111] Um oligonucleotídeo preferido compreendendo ou consistindo de 2'-O-metil fosforotioato RNA compreende uma das sequências de bases SEQ ID NO: 139 ou 140 e tem um comprimento de 21 a 36 nucleotídeos, mais de preferência 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. Um oligonucleotídeo ainda mais preferido consiste em 2'-O-metil fosforotioato RNA e compreende uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 139 ou 140, e tem um comprimento de 21 a 36 nucleotídeos, mais preferencialmente 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. O oligonucleotídeo mais preferido consiste de 2'-O-metil fosforotioato RNA, tem uma sequência de bases que consiste de uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 139 ou 140, e tem um comprimento de 21 nucleotídeos.

[112] Um oligonucleotídeo preferido compreendendo ou consistindo de 2'-O-metil fosforotioato RNA compreende uma das sequências de bases SEQ ID NO: 141 ou 142 e tem um comprimento de 24 a 36 nucleotídeos, mais de preferência 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos.

Um oligonucleotídeo ainda mais preferido consiste em 2'-O-metil fosforotioato RNA e compreende uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 141 ou 142, e tem um comprimento de 24 a 36 nucleotídeos, mais preferencialmente de 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. O oligonucleotídeo mais preferido consiste de 2'-O-metil fosforotioato RNA, tem uma sequência de bases que consiste de uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 141 ou 142, e tem um comprimento de 24 nucleotídeos.

[113] Um oligonucleotídeo preferido compreendendo ou consistindo de 2'-O-metil fosforotioato RNA compreende uma das sequências de bases SEQ ID NO: 143 ou 144 e tem um comprimento de 27 a 36 nucleotídeos, mais de preferência 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. Um oligonucleotídeo ainda mais preferido consiste em 2'-O-metil fosforotioato RNA e compreende uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 143 ou 144, e tem um comprimento de 27 a 36 nucleotídeos, mais preferencialmente 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. O oligonucleotídeo mais preferido consiste de 2'-O-metil fosforotioato RNA, tem uma sequência de bases que consiste de uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 143 ou 144, e tem um comprimento de 27 nucleotídeos.

[114] Um oligonucleotídeo preferido compreendendo ou consistindo de 2'-O-metil fosforotioato RNA compreende

uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 145 ou 146 e tem um comprimento de 30 a 36 nucleotídeos, mais de preferência 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. Um oligonucleotídeo ainda mais preferido consiste em 2'-O-metil fosforotioato RNA e compreende uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 145 ou 146, e tem um comprimento de 30 a 36 nucleotídeos, mais preferencialmente 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. O oligonucleotídeo mais preferido consiste de 2'-O-metil fosforotioato RNA, tem uma sequência de bases que consiste de uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 145 ou 146, e tem um comprimento de 30 nucleotídeos.

[115] Em outra modalidade, um oligonucleotídeo que compreende ou que consiste em 2'-O-metil fosforotioato RNA, e compreendendo uma 5-metilcitosina e/ou a 5-metiluracila, é representado por uma sequência de nucleotídeos que inclui ou consiste de uma sequência que se liga (ou é capaz de se ligar), se direciona para, hibridiza (ou é capaz de hibridizar), e/ou é complementar inverso para uma repetição (GAA)<sub>n</sub> em um transcrito, e é particularmente útil para o tratamento, retardo e/ou prevenção do distúrbio genético humano de ataxia de Friedreich.

[116] Em uma modalidade preferida, um oligonucleotídeo definido como sendo complementar inverso para, se ligando (ou sendo capaz de se ligar), hibridizando (ou sendo capaz de hibridizar), ou se direcionando para uma

repetição  $(GAA)_n$  compreende ou é constituído por uma unidade repetitiva de nucleotídeos  $(YYX)_m$ , e tem um comprimento compreendido entre 12 e 36 nucleotídeos, e em que cada X é C ou 5-metilcitosina, e cada Y é U ou 5-metiluracila, de tal modo que pelo menos um X é 5-metilcitosina e/ou pelo menos um Y é 5-metiluracila. m é um número inteiro. No contexto desta modalidade, m pode ser 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12. Um valor preferido para m é 7.

[117] Por conseguinte, um oligonucleotídeo mais preferido compreende ou é constituído por uma unidade repetitiva de nucleotídeos  $(YYX)_m$ , em que cada X é C ou 5-metilcitosina, e cada Y é U ou 5-metiluracila, de tal modo que pelo menos um X é 5-metilcitosina e/ou pelo menos um Y é 5-metiluracila, e m é um número inteiro de 4 a 12 (SEQ ID NO: 31 a 39).

[118] Um oligonucleotídeo ainda mais preferido compreende ou é constituído por uma unidade repetitiva de nucleotídeos  $(YYX)_m$ , em que cada X é 5-metilcitosina, e/ou cada Y é 5-metiluracila, e m é um número inteiro de 4 a 12 (SEQ ID NO: 31 a 39).

[119] Por conseguinte, um oligonucleotídeo ainda mais preferido compreende ou é constituído por uma unidade repetitiva de nucleotídeos  $(YYX)_7$  (SEQ ID NO: 34), em que cada X é C ou 5-metilcitosina, e cada Y é U ou 5-metiluracila, tal que pelo menos um X é 5-metilcitosina e/ou pelo menos um

Y é 5-metiluracila.

[120] Um oligonucleotídeo ainda mais preferido compreende ou consiste de uma unidade repetitiva de nucleotídeos  $(YYX)_7$  (SEQ ID NO: 34), em que cada X é 5-metilcitosina, e/ou cada Y é 5-metiluracila.

[121] As sequências de oligonucleotídeos mais preferidas compreendendo ou consistindo de uma unidade repetitiva de nucleotídeos  $(XYG)_m$  foram identificadas na tabela 2 como SEQ ID NO: 147 a 167.

[122] Um oligonucleotídeo preferido compreendendo ou consistindo de 2'-O-metil fosforotioato RNA compreende uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 147 ou 148, e tem um comprimento de 12 a 36 nucleotídeos, mais preferencialmente 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. Um oligonucleotídeo ainda mais preferido consiste em 2'-O-metil fosforotioato RNA, e compreende uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 147 ou 148, e tem um comprimento de 12 a 36 nucleotídeos, mais preferencialmente 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. Um oligonucleotídeo ainda mais preferido consiste de 2'-O-metil fosforotioato RNA, tem uma sequência de bases que consiste em uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 147 ou 148, e tem um comprimento de 12 nucleotídeos.

[123] Um oligonucleotídeo preferido compreendendo ou consistindo de 2'-O-metil fosforotioato RNA compreende uma das sequências de bases SEQ ID NO: 149 ou 150 e tem um comprimento de 15 a 36 nucleotídeos, mais de preferência 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. Um oligonucleotídeo ainda mais preferido consiste em 2'-O-metil fosforotioato RNA e compreende uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 149 ou 150, e tem um comprimento de 15 a 36 nucleotídeos, mais preferencialmente 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. O oligonucleotídeo mais preferido consiste de 2'-O-metil fosforotioato RNA, tem uma sequência de bases que consiste de uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 149 ou 150, e tem um comprimento de 15 nucleotídeos.

[124] Um oligonucleotídeo preferido compreendendo ou consistindo de 2'-O-metil fosforotioato RNA compreende uma das sequências de bases SEQ ID NO: 151 ou 152 e tem um comprimento de 18 a 36 nucleotídeos, mais de preferência 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. Um oligonucleotídeo ainda mais preferido consiste em 2'-O-metil fosforotioato RNA e compreende uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 151 ou 152, e tem um comprimento de 18 a 36 nucleotídeos, mais preferencialmente 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27,

28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. O oligonucleotídeo mais preferido consiste de 2'-O-metil fosforotioato RNA, tem uma sequência de bases que consiste de uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 151 ou 152, e tem um comprimento de 18 nucleotídeos.

[125] Um oligonucleotídeo preferido compreendendo ou consistindo de 2'-O-metil fosforotioato RNA compreende uma das sequências de bases SEQ ID NO: 153 a 157 e tem um comprimento de 21 a 36 nucleotídeos, mais de preferência 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. Um oligonucleotídeo ainda mais preferido consiste em 2'-O-metil fosforotioato RNA e compreende uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 153 a 157, e tem um comprimento de 21 a 36 nucleotídeos, mais preferencialmente 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. O oligonucleotídeo mais preferido consiste de 2'-O-metil fosforotioato RNA, tem uma sequência de bases que consiste de uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 153 a 157, e tem um comprimento de 21 nucleotídeos.

[126] Um oligonucleotídeo preferido compreendendo ou consistindo de 2'-O-metil fosforotioato RNA compreende uma das sequências de bases SEQ ID NO: 158 ou 159 e tem um comprimento de 24 a 36 nucleotídeos, mais de preferência 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. Um oligonucleotídeo ainda mais preferido consiste em 2'-O-

metil fosforotioato RNA e compreende uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 158 ou 159, e tem um comprimento de 24 a 36 nucleotídeos, mais preferencialmente de 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. O oligonucleotídeo mais preferido consiste de 2'-O-metil fosforotioato RNA, tem uma sequência de bases que consiste de uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 158 ou 159, e tem um comprimento de 24 nucleotídeos.

[127] Um oligonucleotídeo preferido compreendendo ou consistindo de 2'-O-metil fosforotioato RNA compreende uma das sequências de bases SEQ ID NO: 160 ou 161 e tem um comprimento de 27 a 36 nucleotídeos, mais de preferência 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. Um oligonucleotídeo ainda mais preferido consiste em 2'-O-metil fosforotioato RNA e compreende uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 160 ou 161, e tem um comprimento de 27 a 36 nucleotídeos, mais preferencialmente 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. O oligonucleotídeo mais preferido consiste de 2'-O-metil fosforotioato RNA, tem uma sequência de bases que consiste de uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 160 ou 161, e tem um comprimento de 27 nucleotídeos.

[128] Um oligonucleotídeo preferido compreendendo ou consistindo de 2'-O-metil fosforotioato RNA compreende uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 162 ou 163 e tem

um comprimento de 30 a 36 nucleotídeos, mais de preferência 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. Um oligonucleotídeo ainda mais preferido consiste em 2'-O-metil fosforotioato RNA e compreende uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 162 ou 163, e tem um comprimento de 30 a 36 nucleotídeos, mais preferencialmente 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. O oligonucleotídeo mais preferido consiste de 2'-O-metil fosforotioato RNA, tem uma sequência de bases que consiste de uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 162 ou 163, e tem um comprimento de 30 nucleotídeos.

[129] Um oligonucleotídeo preferido compreendendo ou consistindo de 2'-O-metil fosforotioato RNA compreende uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 164 ou 165 e tem um comprimento de 33 a 36 nucleotídeos, mais de preferência 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. Um oligonucleotídeo ainda mais preferido consiste em 2'-O-metil fosforotioato RNA e compreende uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 164 ou 165, e tem um comprimento de 33 a 36 nucleotídeos, mais preferencialmente 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. O oligonucleotídeo mais preferido consiste de 2'-O-metil fosforotioato RNA, tem uma sequência de bases que consiste de uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 164 ou 165, e tem um comprimento de 33 nucleotídeos.

[130] Um oligonucleotídeo preferido compreendendo ou consistindo de 2'-O-metil fosforotioato RNA compreende

uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 166 ou 167 e tem um comprimento de 36 nucleotídeos. Um oligonucleotídeo ainda mais preferido consiste de 2'-O-metil fosforotioato RNA, tem uma sequência de bases que consiste de uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 166 ou 167, e tem um comprimento de 36 nucleotídeos.

[131] Em outra modalidade, um oligonucleotídeo anti-sentido compreendendo ou consistindo de 2'-O-metil fosforotioato RNA e compreendendo uma 5-metilcitosina, é representado por uma sequência de nucleotídeos que inclui ou consiste de uma sequência que se liga a (ou é capaz de se ligar), hibridiza (ou é capaz de hibridizar), se direciona para, e/ou é complementar inverso a uma repetição  $(CCG)_n$  or  $(GCC)_n$  em um transcrito, e é particularmente útil para o tratamento, retardo, melhora e/ou prevenção do distúrbio genético humano frágil de retardo mental XE, causado pela expansão da repetição no gene FMR2. De preferência, estes genes são de origem humana.

[132] Em uma modalidade preferida, um oligonucleotídeo definido como complementar inverso a, se ligando (ou sendo capaz de se ligar), se hibridizando (ou ser capaz de se hibridizar), ou se direcionando para uma repetição  $(CCG)_n$  compreende ou é constituído por uma unidade repetitiva de nucleotídeos  $(XGG)_m$  ou  $(GGX)_m$ , e tem um comprimento compreendido entre 12 e 36 nucleotídeos, e em

que cada X é C ou 5-metilcitosina. m é um número inteiro. No contexto desta modalidade, m pode ser 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12. Um valor preferido para m é 7.

[133] Por conseguinte, um oligonucleotídeo mais preferido compreende ou é constituído por uma unidade repetitiva de nucleotídeos  $(XGG)_m$  ou  $(GGX)_m$ , em que cada X é C ou 5-metilcitosina, e m é um número inteiro de 4 a 12 (SEQ ID NO: 49 a 57) ou (SEQ ID NO: 40 a 48).

[134] Um oligonucleotídeo ainda mais preferido compreende ou é constituído por uma unidade repetitiva de nucleotídeos  $(XGG)_m$  ou  $(GGX)_m$ , em que cada X é 5-metilcitosina, e m é um número inteiro de 4 a 12 (SEQ ID NO: 49 a 57) ou (SEQ ID NO: 40 a 48).

[135] Por conseguinte, um oligonucleotídeo ainda mais preferido compreende ou é constituído por uma unidade repetitiva de nucleotídeos  $(XGG)_7$  (SEQ ID NO: 52) ou  $(GGX)_7$  (SEQ ID NO: 43), em que cada X é C ou 5-metilcitosina.

[136] Um oligonucleotídeo ainda mais preferido compreende ou é constituído por uma unidade repetitiva de nucleotídeos  $(XGG)_7$  (SEQ ID NO: 52) ou  $(GGX)_7$  (SEQ ID NO: 43), em que cada X é 5-metilcitosina.

[137] As sequências de oligonucleotídeos mais preferidas compreendendo ou consistindo de uma unidade repetitiva de nucleotídeos  $(GGX)_m$  foram identificadas na tabela 2 como SEQ ID NO: 168 a 177.

[138] Um oligonucleotídeo preferido compreendendo ou consistindo de 2'-O-metil fosforotioato RNA compreende a sequência de bases de SEQ ID NO: 168, e tem um comprimento de 12 a 36 nucleotídeos, mais preferencialmente 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. Um oligonucleotídeo ainda mais preferido consiste em 2'-O-metil fosforotioato RNA, e compreende a sequência de bases de SEQ ID NO: 168, e tem um comprimento de 12 a 36 nucleotídeos, mais preferencialmente 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. Um oligonucleotídeo ainda mais preferido consiste de 2'-O-metil fosforotioato RNA, tem uma sequência de bases que consiste na sequência de bases de SEQ ID NO: 168, e tem um comprimento de 12 nucleotídeos.

[139] Um oligonucleotídeo preferido compreendendo ou consistindo de 2'-O-metil fosforotioato RNA compreende sequência de bases SEQ ID NO: 169 e tem um comprimento de 15 a 36 nucleotídeos, mais de preferência 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. Um oligonucleotídeo ainda mais preferido consiste em 2'-O-metil fosforotioato RNA e compreende a sequência de bases SEQ ID NO: 169, e tem um comprimento de 15 a 36 nucleotídeos, mais preferencialmente 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29,

30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. O oligonucleotídeo mais preferido consiste de 2'-O-metil fosforotioato RNA, tem uma sequência de bases que consiste na sequência de bases SEQ ID NO: 169, e tem um comprimento de 15 nucleotídeos.

[140] Um oligonucleotídeo preferido compreendendo ou consistindo de 2'-O-metil fosforotioato RNA compreende a sequência de bases SEQ ID NO: 170 e tem um comprimento de 18 a 36 nucleotídeos, mais de preferência 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. Um oligonucleotídeo ainda mais preferido consiste em 2'-O-metil fosforotioato RNA e compreende uma a sequência de bases SEQ ID NO: 170, e tem um comprimento de 18 a 36 nucleotídeos, mais preferencialmente 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. O oligonucleotídeo mais preferido consiste de 2'-O-metil fosforotioato RNA, tem uma sequência de bases que consiste da sequência de bases SEQ ID NO: 170, e tem um comprimento de 18 nucleotídeos.

[141] Um oligonucleotídeo preferido compreendendo ou consistindo de 2'-O-metil fosforotioato RNA compreende uma das sequências de bases SEQ ID NO: 171 a 174 e tem um comprimento de 12 a 36 nucleotídeos, mais de preferência 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. Um oligonucleotídeo ainda mais preferido consiste em 2'-O-metil

fosforotioato RNA e comprehende uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 171 a 174, e tem um comprimento de 21 a 36 nucleotídeos, mais preferencialmente 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. O oligonucleotídeo mais preferido consiste de 2'-O-metil fosforotioato RNA, tem uma sequência de bases que consiste de uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 171 a 174, e tem um comprimento de 21 nucleotídeos.

[142] Um oligonucleotídeo preferido comprehendendo ou consistindo de 2'-O-metil fosforotioato RNA comprehende uma das sequências de bases SEQ ID NO: 175 e tem um comprimento de 24 a 36 nucleotídeos, mais de preferência 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. Um oligonucleotídeo ainda mais preferido consiste em 2'-O-metil fosforotioato RNA e comprehende uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 175, e tem um comprimento de 24 a 36 nucleotídeos, mais preferencialmente de 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. O oligonucleotídeo mais preferido consiste de 2'-O-metil fosforotioato RNA, tem uma sequência de bases que consiste de uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 175, e tem um comprimento de 24 nucleotídeos.

[143] Um oligonucleotídeo preferido comprehendendo ou consistindo de 2'-O-metil fosforotioato RNA comprehende uma das sequências de bases SEQ ID NO: 176 e tem um

comprimento de 27 a 36 nucleotídeos, mais de preferência 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. Um oligonucleotídeo ainda mais preferido consiste em 2'-O-metil fosforotioato RNA e compreende uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 176, e tem um comprimento de 27 a 36 nucleotídeos, mais preferencialmente 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. O oligonucleotídeo mais preferido consiste de 2'-O-metil fosforotioato RNA, tem uma sequência de bases que consiste de uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 176, e tem um comprimento de 27 nucleotídeos.

[144] Um oligonucleotídeo preferido compreendendo ou consistindo de 2'-O-metil fosforotioato RNA compreende uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 177 e tem um comprimento de 30 a 36 nucleotídeos, mais de preferência 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. Um oligonucleotídeo ainda mais preferido consiste em 2'-O-metil fosforotioato RNA e compreende uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 177, e tem um comprimento de 30 a 36 nucleotídeos, mais preferencialmente 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. O oligonucleotídeo mais preferido consiste de 2'-O-metil fosforotioato RNA, tem uma sequência de bases que consiste de uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 177, e tem um comprimento de 30 nucleotídeos.

[145] As sequências de oligonucleotídeos mais

preferidas compreendendo ou consistindo de uma unidade repetitiva de nucleotídeos (XGG)<sub>n</sub> foram identificadas na tabela 2 como SEQ ID NO: 178 a 184.

[146] Um oligonucleotídeo preferido compreendendo ou consistindo de 2'-O-metil fosforotioato RNA compreende uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 178, e tem um comprimento de 12 a 36 nucleotídeos, mais preferencialmente 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. Um oligonucleotídeo ainda mais preferido consiste em 2'-O-metil fosforotioato RNA, e compreende uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 168, e tem um comprimento de 12 a 36 nucleotídeos, mais preferencialmente 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. Um oligonucleotídeo ainda mais preferido consiste de 2'-O-metil fosforotioato RNA, tem uma sequência de bases que consiste em uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 178, e tem um comprimento de 12 nucleotídeos.

[147] Um oligonucleotídeo preferido compreendendo ou consistindo de 2'-O-metil fosforotioato RNA compreende a sequência de base de SEQ ID NO: 179 e tem um comprimento de 15 a 36 nucleotídeos, mais preferencialmente 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. Um oligonucleotídeo ainda mais

preferido consiste em 2'-O-metil fosforotioato RNA e compreende a sequência de base de SEQ ID NO: 179, e tem um comprimento de 15 a 36 nucleotídeos, mais preferencialmente 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. O oligonucleotídeo mais preferido consiste de 2'-O-metil fosforotioato RNA, tem sua sequência de base que consiste da sequência de base de SEQ ID NO: 179, e tem um comprimento de 15 nucleotídeos.

[148] Um oligonucleotídeo preferido compreendendo ou consistindo de 2'-O-metil fosforotioato RNA compreende a sequência de base de SEQ ID NO: 180 e tem um comprimento de 18 a 36 nucleotídeos, mais preferencialmente 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. Um oligonucleotídeo ainda mais preferido consiste de 2'-O-metil fosforotioato RNA e compreende a sequência de base de SEQ ID NO: 180, e tem um comprimento de 18 a 36 nucleotídeos, mais preferencialmente 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. O oligonucleotídeo mais preferido consiste de 2'-O-metil fosforotioato RNA, tem sua sequência de base que consiste da sequência de base de SEQ ID NO: 180, e tem um comprimento de 18 nucleotídeos.

[149] Um oligonucleotídeo preferido compreendendo ou consistindo de 2'-O-metil fosforotioato RNA compreende a sequência de base de SEQ ID NO: 181 e tem um comprimento de

21 a 36 nucleotídeos, mais preferencialmente 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos.

Um oligonucleotídeo ainda mais preferido consiste de 2'-O-metil fosforotioato RNA e compreende a sequência de base de SEQ ID NO: 181, e tem um comprimento de 21 a 36 nucleotídeos, mais preferencialmente 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. O oligonucleotídeo mais preferido consiste de 2'-O-metil fosforotioato RNA, tem sua sequência de base que consiste da sequência de base de SEQ ID NO: 181, e tem um comprimento de 21 nucleotídeos.

[150] Um oligonucleotídeo preferido compreendendo ou consistindo de 2'-O-metil fosforotioato RNA compreende a sequência de base de SEQ ID NO: 182 e tem um comprimento de 24 a 36 nucleotídeos, mais preferencialmente 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. Um oligonucleotídeo ainda mais preferido consiste de 2'-O-metil fosforotioato RNA e compreende a sequência de base de SEQ ID NO: 182, e tem um comprimento de 24 a 36 nucleotídeos, mais preferencialmente 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. O oligonucleotídeo mais preferido consiste de 2'-O-metil fosforotioato RNA, tem sua sequência de base que consiste da sequência de base de SEQ ID NO: 182, e tem um comprimento de 24 nucleotídeos.

[151] Um oligonucleotídeo preferido compreendendo ou consistindo de 2'-O-metil fosforotioato RNA compreende a

sequência de base de SEQ ID NO: 183 e tem um comprimento de 27 a 36 nucleotídeos, mais preferencialmente 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. Um oligonucleotídeo ainda mais preferido consiste de 2'-O-metil fosforotioato RNA e compreende a sequência de base de SEQ ID NO: 183, e tem um comprimento de 27 a 36 nucleotídeos, mais preferencialmente 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. O oligonucleotídeo mais preferido consiste de 2'-O-metil fosforotioato RNA, tem sua sequência de base que consiste da sequência de base de SEQ ID NO: 183, e tem um comprimento de 27 nucleotídeos.

[152] Um oligonucleotídeo preferido compreendendo ou consistindo de 2'-O-metil fosforotioato RNA compreende a sequência de base de SEQ ID NO: 184 e tem um comprimento de 27 a 36 nucleotídeos, mais preferencialmente 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. Um oligonucleotídeo ainda mais preferido consiste de 2'-O-metil fosforotioato RNA e compreende a sequência de base de SEQ ID NO: 184, e tem um comprimento de 30 a 36 nucleotídeos, mais preferencialmente 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. O oligonucleotídeo mais preferido consiste de 2'-O-metil fosforotioato RNA, tem sua sequência de base que consiste da sequência de base de SEQ ID NO: 184, e tem um comprimento de 30 nucleotídeos.

[153] Em outra modalidade, um oligonucleotídeo compreendendo ou consistindo de 2'-O-metil fosforotioato RNA

metil e compreendendo uma 5-metilcitosina e/ou uma 2,6-diaminopurina, é representado por uma sequência de nucleotídeos compreendendo ou consistindo de uma sequência que se liga (ou é capaz de se ligar), hibridiza (ou é capaz de hibridizar), se direciona para, e/ou é complementar inverso para uma repetição  $(CCUG)_n$  em um transcrito, e é particularmente útil para o tratamento, retardo e/ou prevenção do distúrbio genético humano de distrofia miotônica tipo 2 (DM2), causado por expansões da repetição do gene DM2/ZNF9. De preferência, estes genes são de origem humana.

[154] Em uma modalidade preferida, um oligonucleotídeo definido como sendo complementar inverso a, se ligando a (ou sendo capaz de se ligar), hibridizando (ou sendo capaz de hibridizar) ou se direcionando para uma repetição  $(CCUG)_n$  compreende ou é constituído por uma unidade repetitiva de nucleotídeos  $(XZGG)_m$ , e tem um comprimento compreendido entre 12 e 36 nucleotídeos, e em que cada X é C ou 5-metilcitosina, e cada Z é A ou 2,6-diaminopurina, de tal modo que pelo menos um X é 5-metilcitosina, e/ou pelo menos um Z é 2,6-diaminopurina. m é um número inteiro. No contexto desta modalidade, m pode ser 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9. Um valor preferido para m é 5.

[155] Por conseguinte, um oligonucleotídeo mais preferido compreende ou é constituído por uma unidade

repetitiva de nucleotídeos  $(XZGG)_m$ , em que cada X é C ou 5-metilcitosina, e cada Z é A ou 2,6-diaminopurina, de tal modo que pelo menos um X é 5-metilcitosina e/ou pelo menos um A é 2,6-diaminopurina, e m é um número inteiro de 3 a 9 (SEQ ID NO: 63 a 69).

[156] Um oligonucleotídeo ainda mais preferido compreende ou é constituído por uma unidade repetitiva de nucleotídeos  $(XZGG)_m$ , em que cada X é 5-metilcitosina, e/ou cada Z é 2,6-diaminopurina, e m é um número inteiro de 3 a 9 (SEQ ID NO: 63 a 69).

[157] Por conseguinte, um oligonucleotídeo ainda mais preferido compreende ou é constituído por uma unidade repetitiva de nucleotídeos  $(XZGG)_5$  (SEQ ID NO: 65), em que cada X é C ou 5-metilcitosina, e cada Z é A ou 2,6-diaminopurina, tal que pelo pelo menos um X é 5-metilcitosina e/ou pelo menos um Z representa um grupo 2,6-diaminopurina.

[158] Um oligonucleotídeo ainda mais preferido compreende ou é constituído por uma unidade repetitiva de nucleotídeos  $(XZGG)_5$  (SEQ ID NO: 65), em que cada X é 5-metilcitosina, e/ou cada Z é 2,6-diaminopurina.

[159] As sequências de oligonucleotídeos mais preferidas compreendendo ou consistindo de uma unidade repetitiva de nucleotídeos  $(XZGG)_m$  foram identificadas na tabela 2 como SEQ ID NO: 193 a 208.

[160] Um oligonucleotídeo preferido compreendendo

ou consistindo de 2'-O-metil fosforotioato RNA compreende uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 193 ou 194, e tem um comprimento de 12 a 36 nucleotídeos, mais preferencialmente 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. Um oligonucleotídeo ainda mais preferido consiste em 2'-O-metil fosforotioato RNA, e compreende uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 193 ou 194, e tem um comprimento de 12 a 36 nucleotídeos, mais preferencialmente 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. Um oligonucleotídeo ainda mais preferido consiste de 2'-O-metil fosforotioato RNA, tem a sua sequência de bases que consiste em uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 193 ou 194, e tem um comprimento de 12 nucleotídeos.

[161] Um oligonucleotídeo preferido compreendendo ou consistindo de 2'-O-metil fosforotioato RNA compreende uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 195 ou 196, e tem um comprimento de 16 a 36 nucleotídeos, mais preferencialmente 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. Um oligonucleotídeo ainda mais preferido consiste em 2'-O-metil fosforotioato RNA, e compreende uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 195 ou 196, e tem um comprimento de 16 a 36 nucleotídeos, mais preferencialmente 16, 17, 18, 19,

20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. Um oligonucleotídeo ainda mais preferido consiste de 2'-O-metil fosforotioato RNA, tem a sua sequência de bases que consiste em uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 195 ou 196, e tem um comprimento de 16 nucleotídeos.

[162] Um oligonucleotídeo preferido compreendendo ou consistindo de 2'-O-metil fosforotioato RNA compreende uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 197 a 200, e tem um comprimento de 20 a 36 nucleotídeos, mais preferencialmente 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. Um oligonucleotídeo ainda mais preferido consiste em 2'-O-metil fosforotioato RNA, e compreende uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 197 a 200, e tem um comprimento de 20 a 36 nucleotídeos, mais preferencialmente 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. Um oligonucleotídeo ainda mais preferido consiste de 2'-O-metil fosforotioato RNA, tem a sua sequência de bases que consiste em uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 197 a 200, e tem um comprimento de 20 nucleotídeos.

[163] Um oligonucleotídeo preferido compreendendo ou consistindo de 2'-O-metil fosforotioato RNA compreende uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 201 ou 202, e tem um comprimento de 24 a 36 nucleotídeos, mais

preferencialmente 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. Um oligonucleotídeo ainda mais preferido consiste em 2'-O-metil fosforotioato RNA, e compreende uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 201 ou 202, e tem um comprimento de 24 a 36 nucleotídeos, mais preferencialmente 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. Um oligonucleotídeo ainda mais preferido consiste de 2'-O-metil fosforotioato RNA, tem a sua sequência de bases que consiste em uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 201 ou 202, e tem um comprimento de 24 nucleotídeos.

[164] Um oligonucleotídeo preferido compreendendo ou consistindo de 2'-O-metil fosforotioato RNA compreende uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 203 ou 204, e tem um comprimento de 28 a 36 nucleotídeos, mais preferencialmente 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. Um oligonucleotídeo ainda mais preferido consiste em 2'-O-metil fosforotioato RNA, e compreende uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 203 ou 204, e tem um comprimento de 28 a 36 nucleotídeos, mais preferencialmente 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. Um oligonucleotídeo ainda mais preferido consiste de 2'-O-metil fosforotioato RNA, tem a sua sequência de bases que consiste em uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 203 ou 204, e tem um comprimento de 28 nucleotídeos.

[165] Um oligonucleotídeo preferido compreendendo ou consistindo de 2'-O-metil fosforotioato RNA compreende uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 205 ou 206, e tem um comprimento de 32 a 36 nucleotídeos, mais preferencialmente 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. Um oligonucleotídeo ainda mais preferido consiste em 2'-O-metil fosforotioato RNA, e compreende uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 205 ou 206, e tem um comprimento de 32 a 36 nucleotídeos, mais preferencialmente 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. Um oligonucleotídeo ainda mais preferido consiste de 2'-O-metil fosforotioato RNA, tem a sua sequência de bases que consiste em uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 205 ou 206, e tem um comprimento de 32 nucleotídeos.

[166] Um oligonucleotídeo preferido compreendendo ou consistindo de 2'-O-metil fosforotioato RNA compreende uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 207 ou 208, e tem um comprimento de 36 nucleotídeos. Um oligonucleotídeo ainda mais preferido consiste em 2'-O-metil fosforotioato RNA, e tem a sua sequência de bases que consiste em uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 207 ou 208, e tem um comprimento de 36 nucleotídeos.

[167] Em outra modalidade, um oligonucleotídeo compreendendo ou consistindo de 2'-O-metil fosforotioato RNA e compreendendo uma 5-metiluracila e/ou uma 2,6-diaminopurina, é representado por uma sequência de

nucleotídeos compreendendo ou consistindo de uma sequência que se liga (ou é capaz de se ligar), hibridiza (ou é capaz de hibridizar), se direciona para, e/ou é complementar inverso a uma repetição  $(AUUCU)_n$  em um ítron, e é particularmente útil para o tratamento, retardo, melhora, e/ou prevenção do distúrbio genético humano de ataxia espinocerebelar tipo 10 (SCA10). De preferência, este gene é de origem humana.

[168] Em uma modalidade preferida, um oligonucleotídeo definido como sendo complementar inverso para, se ligando (ou sendo capaz de se ligar), hibridizando (ou sendo capaz de hibridizar), ou se direcionando para uma repetição  $(AUUCU)_n$  compreende ou é constituído por uma unidade repetitiva de nucleotídeos  $(ZGZZY)_m$ , e tem um comprimento compreendido entre 12 e 36 nucleotídeos, e em que cada Y é U ou 5-metiluracila, e cada Z é A ou 2,6-diaminopurina, de tal modo que pelo menos um Y é 5-metiluracila e/ou pelo menos um de Z é 2,6-diaminopurina. m é um número inteiro. No contexto desta modalidade, m pode ser 3, 4, 5, 6, 7. Um valor preferido para m é 4.

[169] Por conseguinte, um oligonucleotídeo mais preferido compreende ou é constituído por uma unidade repetitiva de nucleotídeos  $(ZGZZY)_m$ , em que cada Y é U ou 5-metiluracila, e cada Z é A ou 2,6-diaminopurina, de tal modo que pelo menos um Y é 5-metiluracila e/ou pelo menos um Z

representa um grupo 2,6-diaminopurina, e m é um inteiro entre 3 e 7 (SEQ ID NO: 58 a 62).

[170] Um oligonucleotídeo ainda mais preferido compreende ou é constituído por uma unidade repetitiva de nucleotídeos  $(ZGZY)_m$ , em que cada Y é 5-metiluracila, e/ou cada Z é 2,6-diaminopurina, e m é um inteiro entre 3 e 7 (SEQ ID NO: 58 a 62).

[171] Por conseguinte, um oligonucleotídeo ainda mais preferido compreende ou é constituído por uma unidade repetitiva de nucleotídeos  $(ZGZY)_4$  (SEQ ID NO: 59), em que cada Y é C ou 5-metiluracila, e cada Z é A ou 2,6-diaminopurina, tal que pelo pelo menos um Y é 5-metiluracila e/ou pelo menos um Z é 2,6-diaminopurina.

[172] Um oligonucleotídeo ainda mais preferido compreende ou é constituído de uma unidade repetitiva de nucleotídeos  $(ZGZY)_4$  (SEQ ID NO: 59), em que cada Y é 5-metiluracila, e/ou cada Z é 2,6-diaminopurina.

[173] As sequências de oligonucleotídeos mais preferidas que compreendem ou consistem de uma unidade repetitiva de nucleotídeos  $(ZGZY)_m$  foram identificadas na tabela 2 como SEQ ID NO: 185 a 192.

[174] Um oligonucleotídeo preferido compreendendo ou consistindo de 2'-O-metil fosforotioato RNA compreende a sequência de base SEQ ID NO: 185, e tem um comprimento de 15 a 36 nucleotídeos, mais preferivelmente de 15, 16, 17, 18,

19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. Um oligonucleotídeo ainda mais preferido consiste em 2'-O-metil fosforotioato RNA, e compreende a sequência base de SEQ ID NO: 185 e tem um comprimento de 15 a 36 nucleotídeos, mais preferivelmente de 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. O oligonucleotídeo mais preferido consiste em 2'-O-metil fosforotioato RNA, tem a sua sequência de bases que consiste da sequência de base de SEQ ID NO: 185, e tem um comprimento de 15 nucleotídeos.

[175] Um oligonucleotídeo preferido compreendendo ou consistindo de 2'-O-metil fosforotioato RNA compreende uma das sequências de base de SEQ ID NO: 186 a 189, e tem um comprimento de 20 a 36 nucleotídeos, mais preferivelmente de 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. Um oligonucleotídeo ainda mais preferido consiste em 2'-O-metil fosforotioato RNA, e compreende uma das sequências de base de SEQ ID NO: 186 a 189 e tem um comprimento de 20 a 36 nucleotídeos, mais preferivelmente de 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. O oligonucleotídeo mais preferido consiste em 2'-O-metil fosforotioato RNA, tem a sua sequência de bases que consiste de uma das sequências de base de SEQ ID NO: 186 a 189, e tem um comprimento de 20 nucleotídeos.

[176] Um oligonucleotídeo preferido compreendendo ou consistindo de 2'-O-metil fosforotioato RNA compreende a sequência de base SEQ ID NO: 190, e tem um comprimento de 25 a 36 nucleotídeos, mais preferivelmente de 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. Um oligonucleotídeo ainda mais preferido consiste em 2'-O-metil fosforotioato RNA, e compreende a sequência base de SEQ ID NO: 190 e tem um comprimento de 25 a 36 nucleotídeos, mais preferivelmente de 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. O oligonucleotídeo mais preferido consiste em 2'-O-metil fosforotioato RNA, tem a sua sequência de bases que consiste da sequência de base de SEQ ID NO: 190, e tem um comprimento de 25 nucleotídeos.

[177] Um oligonucleotídeo preferido compreendendo ou consistindo de 2'-O-metil fosforotioato RNA compreende a sequência de base SEQ ID NO: 191, e tem um comprimento de 30 a 36 nucleotídeos, mais preferivelmente de 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. Um oligonucleotídeo ainda mais preferido consiste em 2'-O-metil fosforotioato RNA, e compreende a sequência base de SEQ ID NO: 191 e tem um comprimento de 30 a 36 nucleotídeos, mais preferivelmente de 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. O oligonucleotídeo mais preferido consiste em 2'-O-metil fosforotioato RNA, tem a sua sequência de bases que consiste da sequência de base de SEQ ID NO: 191, e tem um comprimento de 30 nucleotídeos.

[178] Um oligonucleotídeo preferido compreendendo ou consistindo de 2'-O-metil fosforotioato RNA compreende a sequência de base SEQ ID NO: 192, e tem um comprimento de 35 a 36 nucleotídeos, mais preferivelmente de 35 ou 36 nucleotídeos. Um oligonucleotídeo ainda mais preferido consiste em 2'-O-metil fosforotioato RNA, e compreende a sequência base de SEQ ID NO: 192 e tem um comprimento de 35 a 36 nucleotídeos, mais preferivelmente de 35 ou 36 nucleotídeos. O oligonucleotídeo mais preferido consiste em 2'-O-metil fosforotioato RNA, tem a sua sequência de bases que consiste da sequência de base de SEQ ID NO: 192, e tem um comprimento de 35 nucleotídeos.

[179] Em outra modalidade, um oligonucleotídeo compreendendo ou consistindo de 2'-O-metil fosforotioato RNA e compreendendo uma 5-metilcitosina e/ou um monômero abásico, e/ou uma inosina, é representado por uma sequência de nucleotídeos compreendendo ou consistindo de uma sequência que se liga (ou é capaz de se ligar), hibridiza (ou é capaz de hibridizar), se direciona para, e/ou é complementar inverso a uma repetição  $(GGGGCC)_n$  presente em um transcrito humano C90RF72, e é particularmente útil para o tratamento, retardo, melhora e/ou prevenção do distúrbio genético humano esclerose lateral amilotrófica (ELA) e demência frontotemporal (FTD). De preferência, este gene é de origem humana.

[180] Em uma modalidade preferida, um oligonucleotídeo definido como sendo complementar inverso para, se ligando a (ou sendo capaz de se ligar), hibridizando (ou sendo capaz de hibridizar) ou se direcionando para uma repetição  $(GGGGCC)_n$  compreende ou é constituído por uma unidade repetitiva de nucleotídeos  $(GGXUXX)_m$ ,  $(GGXQXX)_m$ ,  $(GGXIXXX)_m$ , ou  $(GGCCUC)_m$ , e tem um comprimento compreendido de 17 a 36 nucleotídeos, e em que cada X é C ou 5-metilcitosina, de tal modo que pelo menos um X é 5-metilcitosina, em que cada Q é um monômero abásico, em que cada I é uma inosina, e em que m é um número inteiro. No contexto desta modalidade, m pode ser 3, 4, 5, 6, 7. Um valor preferido para m é 3 ou 4. Mais preferencialmente, o referido oligonucleotídeo compreende ou é constituído por uma unidade repetitiva de nucleotídeos de SEQ ID NO: 216 a 219, tal como definido na tabela 1. Oligonucleotídeos ainda mais preferidos compreendendo ou consistindo de uma unidade repetitiva de nucleotídeos  $(GGXUXX)_m$ ,  $(GGXQXX)_m$ ,  $(GGXIXXX)_m$ , ou  $(GGCCUC)_m$ , foram identificados na tabela 2 como SEQ ID NO: 209 a 215.

[181] Um oligonucleotídeo preferido compreendendo ou consistindo de 2'-O-metil fosforotioato RNA compreende a sequência de bases SEQ ID NO: 209 ou 211 e tem um comprimento de 17 a 36 nucleotídeos, mais de preferência 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35

ou 36 nucleotídeos. Um oligonucleotídeo ainda mais preferido consiste em 2'-O-metil fosforotioato RNA e compreende a sequência de bases de SEQ ID NO: 209 ou 211, e tem um comprimento de 17 a 36 nucleotídeos, mais preferencialmente de 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. O oligonucleotídeo mais preferido consiste de 2'-O-metil fosforotioato RNA, tem uma sequência de bases que consiste de uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 209 ou 211, e tem um comprimento de 17 ou 18 nucleotídeos.

[182] Um oligonucleotídeo preferido compreendendo ou consistindo de 2'-O-metil fosforotioato RNA compreende a sequência de bases SEQ ID NO: 210 e tem um comprimento de 18 a 36 nucleotídeos, mais de preferência 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. Um oligonucleotídeo ainda mais preferido consiste em 2'-O-metil fosforotioato RNA e compreende a sequência de bases de SEQ ID NO: 210, e tem um comprimento de 18 a 36 nucleotídeos, mais preferencialmente de 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. O oligonucleotídeo mais preferido consiste de 2'-O-metil fosforotioato RNA, tem uma sequência de bases que consiste da sequência de bases de SEQ ID NO: 210, e tem um comprimento de 18 nucleotídeos.

[183] Um oligonucleotídeo preferido compreendendo

ou consistindo de 2'-O-metil fosforotioato RNA compreende uma das sequências de bases SEQ ID NO: 212 ou 215 e tem um comprimento de 24 a 36 nucleotídeos, mais de preferência 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. Um oligonucleotídeo ainda mais preferido consiste em 2'-O-metil fosforotioato RNA e compreende uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 212 ou 215, e tem um comprimento de 24 a 36 nucleotídeos, mais preferencialmente de 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. O oligonucleotídeo mais preferido consiste de 2'-O-metil fosforotioato RNA, tem uma sequência de bases que consiste de uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 212 ou 215, e tem um comprimento de 24 nucleotídeos.

[184] Um oligonucleotídeo preferido compreendendo ou consistindo de 2'-O-metil fosforotioato RNA compreende a sequência de bases SEQ ID NO: 213 e tem um comprimento de 24 a 36 nucleotídeos, mais de preferência 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. Um oligonucleotídeo ainda mais preferido consiste em 2'-O-metil fosforotioato RNA e compreende a sequência de bases de SEQ ID NO: 213, e tem um comprimento de 24 a 36 nucleotídeos, mais preferencialmente de 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. O oligonucleotídeo mais preferido consiste de 2'-O-metil fosforotioato RNA, tem uma sequência de bases que consiste de uma das sequências de

bases de SEQ ID NO: 213, e tem um comprimento de 24 nucleotídeos.

[185] Um oligonucleotídeo preferido compreendendo ou consistindo de 2'-O-metil fosforotioato RNA compreende a sequência de bases SEQ ID NO: 214 e tem um comprimento de 24 a 36 nucleotídeos, mais de preferência 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. Um oligonucleotídeo ainda mais preferido consiste em 2'-O-metil fosforotioato RNA e compreende a sequência de bases de SEQ ID NO: 214, e tem um comprimento de 24 a 36 nucleotídeos, mais preferencialmente de 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 nucleotídeos. O oligonucleotídeo mais preferido consiste de 2'-O-metil fosforotioato RNA, tem uma sequência de bases que consiste de uma das sequências de bases de SEQ ID NO: 214, e tem um comprimento de 24 nucleotídeos.

[186] Em uma modalidade, um oligonucleotídeo de preferência compreende ou consiste em 2'-O-metil fosforotioato RNA, compreende uma base de 5-metilcitosina e/ou uma 5-metiluracila e/ou uma de 2,6-diaminopurina, é representado por uma sequência de nucleotídeos que inclui ou consiste de pelo menos 12 a 36 nucleotídeos consecutivos, o referido oligonucleotídeo se direcionando para, hibridizando (ou é capaz de se hibridizar), se ligando (ou é capaz de se ligar), e/ou sendo complementar inverso a uma repetição como

anteriormente definido aqui. Mais preferencialmente, a referida sequência de nucleotídeos compreende ou consiste em pelo menos 12 a 36 nucleotídeos, ainda mais preferivelmente de 15 a 24, e mais de preferência 20 ou 21 nucleotídeos. O comprimento do referido oligonucleotídeo pode ser 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, ou 36 nucleotídeos. O referido oligonucleotídeo pode ser complementar inverso para, e/ou capaz de hibridizar com, e/ou capaz de se direcionar, e/ou capaz de se ligar a uma repetição de uma região de codificação de um transcrito, de preferência uma poliglutamina (CAG)<sub>n</sub> codificando o trato. O referido oligonucleotídeo pode também ser complementar inverso para, e/ou capaz de se hibridizar com, e/ou capaz de se direcionar, e/ou capaz de se ligar a uma região não codificadora, por exemplo, as regiões 5' ou 3' não traduzidas, ou sequências intrônicas presentes nas moléculas precursoras de RNA.

[187] No contexto da invenção, a expressão "capaz de" pode ser substituída por "está apto a".

[188] Em um segundo aspecto, a presente invenção refere-se a um oligonucleotídeo, o qual compreende um ou mais sitios abásicos, tal como definido mais adiante, em um ou em ambos os terminais. De preferência, de 1 a 10, mais preferivelmente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10, e mais preferivelmente 4 sitios abásicos são presentes em um único

terminal, ou em ambos os terminais do oligonucleotídeo. Um ou mais sítios abásicos podem estar presentes, e ambos os terminais livre do oligonucleotídeo (5' e 3'), ou a apenas uma. O oligonucleotídeo de acordo com este aspecto da invenção, de preferência, é representado por uma sequência de nucleotídeo ou uma de bases que compreende ou consiste de uma sequência que se liga (ou é capaz de se ligar), hibridiza (ou é capaz de hibridizar), se direciona para, e/ou é complementar inverso a um elemento repetitivo em um transcrito de RNA selecionado a partir de  $(CAG)_n$ ,  $(GCG)_n$ ,  $(CGG)_n$ ,  $(GAA)_n$ ,  $(GCC)_n$ ,  $(CCG)_n$ ,  $(AUUCU)_n$ ,  $(GGGGCC)_n$  ou  $(CCUG)_n$ , tal como indicado acima. O referido oligonucleotídeo é preferencialmente um oligonucleotídeo de cadeia única, e pode ainda compreender, opcionalmente, qualquer uma das modificações tal como aqui discutido, tais como um ou mais modificações de bases, modificações de açúcar e/ou modificações de cadeia principal, tais como 5-metil-C, 5-metil-U, 2,6-diaminopurina, 2'-O-metil, fosforotioato, e combinações das mesmas. É para ser entendido que neste aspecto da invenção, estas modificações não são obrigatórias.

[189] O oligonucleotídeo de acordo com este aspecto da invenção, compreendendo um ou mais sítios abásicos em um ou ambos os terminais, tem um parâmetro melhorado sobre os oligonucleotídeos sem tais sítios abásicos. Neste contexto,

os parâmetros podem incluir: a afinidade de ligação e/ou cinética, a atividade de silenciamento, a seletividade alélica, bioestabilidade, distribuição (intra-tecido), absorção celular e/ou tráfico, e/ou imunogenicidade do referido oligonucleotídeo, tal como explicado anteriormente aqui em ligação com o parâmetro melhorado de um oligonucleotídeo da invenção do primeiro aspecto. Cada um dos ensaios e definições aqui proporcionados em conexão com a melhora de um parâmetro de um oligonucleotídeo do primeiro aspecto também se mantém para um oligonucleotídeo do segundo aspecto.

[190] A seguir, um oligonucleotídeo compreendendo ou consistindo de 2'-O-metil fosforotioato RNA, compreendendo uma base de 5-metilcitosina e/ou uma de 5-metiluracila e sendo representado por uma sequência de nucleotídeos ou uma de bases compreendendo (CUG)<sub>m</sub> e, portanto, se ligando a (ou sendo capaz de se ligar a), hibridizando (ou sendo capaz de hibridizar), se direcionando para, e/ou sendo complementar inverso para (CAG)<sub>n</sub>, é tomado como um exemplo para ilustrar adicionalmente a invenção. Parâmetros semelhantes definidos no contexto de tal oligonucleotídeo poderiam ser definidos por um técnico especialista no assunto para outros oligonucleotídeos que se inserem no escopo da invenção e que se ligam a (ou sendo capaz de se ligar a), hibridizam (ou sendo capaz de

hidridizar), se direcionam para, e/ou são complementares inversos para outras repetições, tal como aqui identificadas. Outros sintomas ou semelhantes podem ser identificados pelo técnico especialista no assunto em relação a outras doenças, tal como aqui identificado.

[191] Em uma modalidade preferida, no contexto da invenção, um oligonucleotídeo, tal como aqui concebido, é capaz de retardar e/ou curar e/ou tratar e/ou prevenir e/ou melhorar uma doença genética humana, tal como a Doença de Huntington (DH), ataxia espinocerebelar (SCA) do tipo 1, 2, 3, 6, 7, 12 ou 17 anos, esclerose lateral amiotrófica (ELA), demência frontotemporal (FTD), atrofia espinhal ligada ao X e atrofia muscular bulbar (SBMA) e/ou atrofia dentatorubropalidoluisiana (DRPLA) causada por expansões da repetição de CAG nos transcritos de um gene HTT (SEQ ID NO: 80), ATXN1 (SEQ ID NO: 81), ATXN2 (SEQ ID NO: 82) ATXN3 (SEQ ID NO: 83), CACNA1A (SEQ ID NO: 84), ATXN7 (SEQ ID NO: 85), PPP2R2B (SEQ ID NO: 86), TBP (SEQ ID NO: 87), AR (SEQ ID NO: 88), ATN1 (SEQ ID NO: 89), quando este oligonucleotídeo é capaz taxa de reduzir ou diminuir a quantidade de transrito (tóxico) do alelo doente de um gene HTT, ATXN1, ATXN2 ATXN3, CACNA1A, ATXN7, PPP2R2B, TBP, AR ou ATN1 na célula de um paciente, no tecido de um paciente e/ou em um paciente. Em uma modalidade, os referidos genes HTT, ATXN1, ATXN2 ATXN3, CACNA1A, ATXN7, PPP2R2B, TBP, AR ou ATN1 são genes humanos.

[192] No caso de HD, uma região de repetição de CAG expandida está presente no éxon 1 do gene HTT no genoma de um paciente. Uma região de repetição de CAG expandida pode ser aqui definida como compreendendo uma repetição consecutiva de 38 a 180 unidades repetitivas que compreendem um trinucleotídeo CAG, em uma sequência transcrita do gene HTT.

[193] No caso de SCA1, uma região de repetição de CAG expandida está presente no éxon 8 do gene ATXN1 no genoma de um paciente. Uma região de repetição de CAG expandida pode ser aqui definida como compreendendo uma repetição consecutiva de 41 a 83 unidades repetitivas que compreendem um trinucleotídeo CAG em uma seqüência transcrita do gene ATXN1.

[194] No caso de SCA2, uma região de repetição de CAG expandida está presente no éxon 1 do gene ATXN2 no genoma de um paciente. Uma região de repetição de CAG expandida pode ser aqui definida como compreendendo uma repetição consecutiva de 32 a 200 unidades repetitivas que compreendem um trinucleotídeo CAG em uma sequência transcrita do gene ATXN2.

[195] No caso de SCA3, uma região de repetição de CAG expandida está presente no éxon 8 do gene ATXN3 no genoma de um paciente. Uma região de repetição de CAG expandida pode ser aqui definida como compreendendo uma repetição

consecutiva de 52 a 86 unidades repetitivas que compreendem um trinucleotídeo CAG em uma seqüência transcrita do gene ATXN3.

[196] No caso de SCA6, uma região de repetição de CAG expandida está presente no éxon 47 do gene CACNA1 no genoma de um paciente. Uma região de repetição de CAG expandida pode ser aqui definida como compreendendo uma repetição consecutiva de 20 a 33 unidades repetitivas que compreendem um trinucleotídeo CAG em uma sequência transcrita do gene CACNA1.

[197] No caso de SCA7, uma região de repetição de CAG expandida está presente no éxon 3 do gene ATXN7 no genoma de um paciente. Uma região de repetição de CAG expandida pode ser aqui definida como compreendendo uma repetição consecutiva de 36 a pelo menos 460 unidades repetidas compreendendo um trinucleotídeo CAG em uma sequência transcrita do gene ATXN7.

[198] No caso de SCA12, uma região de repetição de CAG expandida pode estar presente na região não traduzida 5' (UTR) em um ítron ou dentro de um quadro de leitura aberta do PPP2R2B gene no genoma de um paciente. Uma região de repetição de CAG expandida pode ser aqui definida como compreendendo uma repetição consecutiva de 66 a 78 unidades repetitivas que compreendem um trinucleotídeo CAG em uma sequência transcrita do gene PPP2R2B.

[199] No caso de SCA17, uma região de repetição de CAG expandida está presente no éxon 3 do gene da TBP no genoma de um paciente. Uma região de repetição de CAG expandida pode ser aqui definida como compreendendo uma repetição consecutiva de 45 a 66 unidades repetitivas que compreendem um trinucleotídeo CAG em uma sequência transcrita do gene TBP.

[200] No caso de ELA ou DFT, uma região de repetição de CAG expandida está presente no éxon 1 do gene ATXN2 no genoma de um paciente. Uma região de repetição de CAG expandida pode ser aqui definida como compreendendo uma repetição consecutiva de 27 a 33 unidades repetitivas que compreendem um trinucleotídeo CAG em uma sequência transcrita do gene ATXN2.

[201] No caso de ELA ou FTD, uma região de repetição de GGGGCC expandida está presente no primeiro íntron do gene C9ORF72 no genoma de um paciente. Uma região de repetição de GGGGCC expandida pode ser aqui definida como compreendendo uma repetição consecutiva de >30 unidades repetitivas que compreendem um hexanucleotídeo GGGGCC em uma sequência transcrita do gene C9ORF72.

[202] No caso de SBMA, uma região de repetição CAG expandida está presente no éxon 1 do gene AR no genoma de um paciente. Uma região de repetição CAG expandida pode ser aqui definida como compreendendo uma repetição consecutiva

de 40 unidades repetitivas que compreendem um trinucleotídeo CAG em uma sequência transcrita do gene AR.

[203] No caso de DRPLA, uma região de repetição CAG expandida está presente no éxon 5 do gene ATN1 no genoma de um paciente. Uma região de repetição CAG expandida pode ser aqui definida como compreendendo uma repetição consecutiva de 49 a 88 unidades repetitivas compreendendo um trinucleotídeo CAG em uma sequência transcrita do gene ATN1.

[204] Ao longo da presente invenção, o termo repetição de CAG pode ser substituído por  $(CAG)_n$ , e vice-versa, em que n é um número inteiro que pode ser de 6 a 29, quando a repetição está presente no éxon 1 do transcrito HTT de um indivíduo saudável, 6 a 39 quando a repetição está presente no éxon 8 do gene ATXN1 de um indivíduo saudável, menos do que 31 quando a repetição está presente no éxon 1 do gene ATXN2 de um indivíduo saudável, 12 a 40 quando a repetição está presente no éxon 8 do gene ATXN3 de um indivíduo saudável, menos de 18 anos quando a repetição está presente no éxon 47 do gene CACNA1A de um indivíduo saudável, 4 a 17 quando a repetição está presente no éxon 3 do gene ATXN7 de um indivíduo saudável, 7 a 28 quando a repetição está presente na 5'UTR do gene PPP2R2B de um indivíduo saudável, 25 a 42 quando a repetição está presente no éxon 3 do gene TBP de um indivíduo saudável, 13 a 31 quando a repetição está presente no éxon 1 do gene AR de um indivíduo

saudável, 12 a 40 quando a repetição está presente no éxon 8 do gene ATXN3 de um indivíduo saudável, ou 6 a 35 quando a repetição está presente no éxon 5 do gene ATN1 de um indivíduo saudável.

[205] Isso significa que, de preferência, um oligonucleotídeo da invenção reduz a quantidade detectável de transcritos associados à doença, ou causadores de doenças, ou mutantes contendo um número que se estende, ou instável de repetições CAG em uma célula do referido paciente, em um tecido do referido paciente e/ou em doenças em um paciente. Em alternativa ou em combinação com a sentença anterior, o referido oligonucleotídeo pode reduzir a tradução do referido transrito mutante e, então, a quantidade de proteínas mutantes (tóxicas). A redução ou diminuição da quantidade de transcritos expandidos com repetições de CAG pode ser pelo menos, 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55 %, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100% em comparação com a quantidade de transcritos expandidos com repetições de CAG antes do tratamento. Outro parâmetro pode ser a redução no transrito (CAG)<sub>n</sub> ou da quantidade do referido transrito mutante. Esta pode ser de pelo menos 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100% em comparação com a quantidade do referido transrito detectado no início do tratamento.

[206] A redução ou a diminuição pode ser avaliada por Northern Blot ou Q-RT-PCR, de preferência realizada na parte experimental. Um oligonucleotídeo da invenção pode ser testado primeiro no sistema celular tal como descrito no Exemplo 1 na parte experimental.

[207] Em alternativa ou em combinação com a modalidade preferida anterior, no contexto da invenção, um oligonucleotídeo, tal como aqui concebido, é capaz de retardar e/ou curar e/ou tratar e/ou prevenir e/ou melhorar uma doença genética humana tal como a doença de Huntington (DH), ataxia espinocerebelar (SCA) do tipo 1, 2, 3, 6, 7, 12 ou 17, a esclerose lateral amiotrófica (ELA), demência frontotemporal (FTD), atrofia espinhal ligada ao X e atrofia muscular bulbar (SBMA), e/ou atrofia dentatorubropalidoluisiana (DRPLA) causada por expansões de repetições de CAG nos transcritos dos genes HTT, ATXN1, ATXN2 ATXN3, CACNA1A, ATXN7, PPP2R2B, TBP, AR ou ATN1, quando este oligonucleotídeo é capaz de aliviar um ou mais sintoma (s) e/ou a característica (s), e/ou para melhorar um parâmetro ligado ou associado com a Doença de Huntington (DH), ataxia espinocerebelar (SCA) do tipo 1, 2, 3, 6, 7, 12 ou 17, esclerose lateral amiotrófica (ELA), demência frontotemporal (FTD), atrofia espinhal ligada ao X e atrofia muscular bulbar (SBMA), e/ou atrofia dentatorubropalidoluisiana (DRPLA) em um indivíduo. Um oligonucleotídeo, tal como aqui definido,

é capaz de melhorar um parâmetro ou reduzir um sintoma ou característica se após pelo menos uma semana, um mês, seis meses, um ano ou mais de tratamento utilizando uma dose do referido oligonucleotídeo com a invenção, tal como identificado aqui, o referido parâmetro é dito como tendo sido melhorado, ou o referido sintoma ou característica são ditos como tendo sido reduzidos.

[208] A melhora neste contexto pode significar que o referido parâmetro foi alterado significativamente no sentido de um valor do referido parâmetro para uma pessoa saudável, e/ou no sentido de um valor do referido parâmetro que corresponda ao valor do referido parâmetro no mesmo indivíduo no início do tratamento.

[209] Redução ou alívio, neste contexto, pode significar que a referida característica ou sintoma foram alterados de forma significativa sentido da ausência do referido sintoma ou característica, que é a característica de uma pessoa saudável e/ou no sentido de uma variação do referido sintoma ou característica que corresponde ao estado da mesmo indivíduo no início do tratamento.

[210] Neste contexto, os sintomas da Doença de Huntington são movimentos coreiformes, demência progressiva, e manifestações psiquiátricas (depressão, psicose, etc). Os movimentos coreiformes consistem de ações motoras involuntárias, irregulares, rápidas, bruscas incluindo

espasmo facial ou contorção e contração de extremidades distais, e mais tarde formas mais generalizadas que podem prejudicar o caminhar (Ropper e Brown, 2005). Cada um destes sintomas pode ser avaliado pelo médico utilizando métodos conhecidos e descritos. Um método preferido é o monitoramento da capacidade funcional total (TFC), uma escala ou progressão de sintoma validada em relação às três principais áreas sintomáticas de DH, medidos por escalas de avaliação validadas. Estas áreas são especificamente a progressão de sintomas motores, a progressão de sintomas neuropsiquiátricos, e a progressão do declínio cognitivo. Portanto, outra escala preferida é a Unified HD Rating Scale (UHDRS; Huntington Study Group (Kieburtz K. et al. 1996;11:136-142) .

[211] A doença de Huntington (DH), ataxia espinocerebelar (SCA) do tipo 1, 2, 3, 6, 7, ou 17, atrofia espinhal ligada ao X e muscular bulbar (SBMA) e atrofia dentatorubro-palidoluisiana (DRPLA) são causadas por expansões da repetição de tripletos CAG na região de codificação do gene. Embora as proteínas causadoras de doenças nestas doenças sejam diferentes, em cada caso o alongamento expandido resultante de glutaminas resulta em um ganho tóxico da função da proteína, e isto leva a neurodegeneração. Agregados de proteínas são encontrados no núcleo e citoplasma das células, indicando que o enrolamento

incorreto da proteína é uma característica comum destes distúrbios. Um parâmetro comum preferido é, portanto, os níveis de proteína (mutante) que podem ser determinados por análise de Western blot (Evers et al.), ou a presença de agregados de proteína no núcleo e/ou citoplasma, que pode ser monitorizado por hibridização *in situ*. Uma melhora de um parâmetro de DH pode ser a redução na detecção da quantidade ou do valor do agregado de proteína. Essa diminuição pode ser de pelo menos 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, em comparação com a quantidade ou o valor de agregados de proteína, antes do início do tratamento.

[212] No contexto da DH, várias outras proteínas têm sido encontradas para co-localizar com agregados htt, ou seja, a proteína de ligação à caixa TATA (TBP), proteína de ligação a CREB (CBP), e vários chaperonas moleculares (Huang et al.,; Muchowski et al.,; Roon-Mom et al.,; Steffan et al.,). Além disso, muitos processos celulares afetados foram identificados em DH, tais como de-regulação transcricional, disfunção mitocondrial, e transporte prejudicado de vesícula, o que pode proporcionar parâmetros alternativos para DH (Bauer et al., 2009; Ross et al.,). Uma melhora de cada um destes parâmetros de DH possíveis alternativos (ou seja, proteína de ligação à caixa TATA (TBP), proteína de ligação a CREB (CBP), e várias chaperonas moleculares), podem

ser definidos como para a melhora dos agregados de proteína, tal como definido acima.

#### Composição

[003] Em um segundo aspecto, é fornecida uma composição compreendendo um oligonucleotídeo conforme descrito na seção anterior intitulada "Oligonucleotídeo". Essa composição preferencialmente compreende ou consiste de um oligonucleotídeo conforme definido anteriormente.

[213] Tal como explicado no primeiro aspecto da invenção para o ALS e FTD, sabe-se que pelo menos duas repetições distintas em pelo menos dois transcritos diferentes podem estar envolvidas em, responsáveis por, ou associadas com a doença. Todas as características preferidas correspondentes a cada um destes oligonucleotídeos foram descritos na seção intitulada "oligonucleotídeo".

[004] Em uma modalidade preferida, a referida composição é para o uso como um medicamento. A referida composição é assim, uma composição farmacêutica. Uma composição farmacêutica compreende normalmente um veículo, diluente e/ou excipiente farmaceuticamente aceitável. Em uma modalidade preferida, uma composição da presente invenção compreende um composto tal como aqui definido e, opcionalmente, compreende ainda uma formulação, agente de enchimento, conservante, solubilizante, veículo, diluente, excipiente, sal, adjuvante e/ou solvente farmaceuticamente

aceitáveis. Tais veículo, agente de enchimento, conservante, solubilizante, diluente, sal, adjuvante, solvente e/ou excipiente farmaceuticamente aceitáveis podem, por exemplo, serem encontrados em Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Edition. Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. O composto como descrito na invenção pode possuir pelo menos um grupo ionizável. Um grupo ionizável pode ser uma base ou ácido, e pode ser carregado ou neutro. Um grupo ionizável pode estar presente como par de íon com um contra-íon adequado que transporta a carga oposta(s). Exemplos de contra-íões catiônicos são o sódio, potássio, césio, Tris, lítio, cálcio, magnésio, trialquilamônio, trietilamônio, e tetraalquilamônio. Exemplos de contra-íons aniónicos são o cloreto, brometo, iodeto, lactato, mesilato, acetato, trifluoroacetato, dicloroacetato, e citcamundongo. Exemplos de contra-íons foram descritos [por exemplo, Kumar, de 2008, que é incorporadao aqui em sua totalidade por referência.

[005] Uma composição farmacêutica pode ser formulada ainda para uma ajuda adicional na melhoria da estabilidade, solubilidade, absorção, biodisponibilidade, atividade farmacocinética, farmacodinâmica, e absorção celular do referido composto, em particular, formulações compreendendo excipiente capaz de formar complexos, nanopartículas, micropartículas, nanotubos, nanogéis,

hidrogéis, poloxâmeros ou plurônicos, polimersomas, colóides, microbolhas, vesículas, micelas, lipoplexos, e/ou lipossomas. Exemplos de nanopartículas incluem nanopartículas poliméricas, nanopartículas de ouro, nanopartículas magnéticas, nanopartículas de sílica, nanopartículas lipídicas, nanopartículas de açúcar, nanopartículas de proteína e nanopartículas de peptídeos.

[006] Uma composição preferida compreende pelo menos um excipiente que pode ajudar ainda mais a melhorar o direcionamento e/ou entrega da referida composição e/ou do referido oligonucleotídeo para e/ou em um músculo, e/ou tecido cerebral, e/ou para um tecido neuronal e/ou uma célula. Uma célula preferida pode ser uma célula muscular ou neuronal.

[007] Muitos destes excipientes são conhecidos no estado da técnica (por exemplo, ver Bruno, 2011), e podem ser categorizados como um primeiro tipo de excipiente. Exemplos do primeiro tipo de excipientes incluem polímeros (por exemplo, polietilenoimina (PEI), polipropileneimina (PPI), derivados de dextrano, butilcianoacrilato (PBCA), hexilcianoacrilato (PHCA), poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA), poliaminas (por exemplo, espermina, espermidina, putrescina, cadaverina), quitosana, poli (amido aminas) (PAMAM), poli (amina éster), éter polivinílico, polivinilpirrolidona (PVP), polietileno glicol (PEG)

ciclodextrinas, ácido hialurônico, ácido colomínico, e derivados dos mesmos, dendrímeros (por exemplo, poli (amidoamina)), lípidos (por exemplo, 1,2-dioleoil-3-dimetilamônio propano (DODAP), cloreto de dioleoildimetilamônio (DODAC), derivados de fosfatidilcolina [por exemplo, 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC)], derivados de liso-fosfatidilcolina [por exemplo, 1-estearoil-2-liso-sn-glicero-3-fosfocolina (S-LysoPC)], esfingomielina, 2-{3-[Bis-(3-amino-propil)-amino]-propilamino}-N-ditetradecil-carbamoid metilacetamida (RPR209120), derivados de fosfoglicerol [por exemplo, 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoglicerol, sais de sódio (DPPG-Na), derivados de ácido fosfatídico [ácido 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfatídico, sal de sódio (DSPA), derivados de fosfatidiletanolamina [por exemplo, dioleoil-*L-R*-fosfatidiletanolamina (DOPE), 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DSPE), 2-dftanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DPhyPE), ], *N*-[1-(2,3-dioleoilóxi)propil]-*N,N,N*-trimetilamônio (DOTAP), *N*-[1-(2,3-dioleilóxi)propil]-*N,N,N*-trimetilamônio (DOTMA), 1,3-di-oleoilóxi-2-(6-carbóxi-espermil)-propilamida (DOSPER), (1,2-dimiristiolxipropil-3-dimetilhidroxi etil amônio (DMRIE), (N1-colesteriloxicarbonil-3,7-diazanonana-1,9-diamina (CDAN), brometo de dimetildioctadecilamônio (DDAB), 1-palmotoil-2-oleoil-sn-glicerol-3-fosfocolina (POPC), (ácido

b-L-Arginil-2,3-L-diaminopropiônico      *N*-palmitil-*N*-oleilil-amida triclocamundongo (AtuFECT01), derivados de *N,N*-dimetil-3-aminopropano [por exemplo, 1,2-distearoilóxi-*N,N*-dimetil-3-aminopropano (DSDMA), 1,2-dioleilóxi-*N,N*-dimetil-3-aminopropano (DoDMA), 1,2-Dilinoleilóxi-*N,N*-3-dimetilaminopropano (DLinDMA), 2,2-dilinoleil-4-dimetilaminometil [1,3]-dioxolano (DLin-K-DMA), derivados de fosfatidilserina [1,2-dioleil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina, sais de sódio (DOPS)], colesterol, proteínas (por exemplo, albumina, gelatinas, atelocolágeno), e peptídeos (por exemplo, protamina, PepFects, NickFects, poliarginina, polilisina, CADY, MPG).

[008]      Outra composição preferida pode compreender pelo menos um excipiente categorizado como um segundo tipo de excipiente. Um segundo tipo de excipiente pode compreender ou conter um grupo conjugado conforme aqui descrito, para melhorar o direcionamento e/ou entrega da composição e/ou do oligonucleotídeo da invenção para um tecido, e/ou célula, e/ou em um tecido, e/ou célula como, por exemplo, um tecido e/ou célula muscular ou neuronal. Ambos os tipos de excipientes podem ser combinados em conjunto em uma única composição, tal como aqui identificado.

[009]      Um técnico especialista no assunto pode selecionar, combinar, e/ou adaptar um ou mais dos excipientes acima ou outros alternativos e sistemas de entrega para

formular e entregar o composto para uso na presente invenção.

[010] Tal composição farmacêutica da invenção pode ser administrada em uma concentração eficaz em conjunto de tempos para um animal, preferencialmente um mamífero. O mamífero mais preferido é um ser humano. Um oligonucleotídeo ou uma composição como aqui definidos, para uso de acordo com a invenção, podem ser adequados para a administração direta a uma célula, tecido e/ou um órgão *in vivo* de indivíduos afetados por, ou em risco de desenvolver uma doença ou patologia tal como aqui identificado, e podem ser administrados diretamente *in vivo*, *ex vivo* ou *in vitro*. A administração pode ser por *via tópica*, *sistêmica* e/ou *parenteral*, por exemplo, *intravenosa*, *subcutânea*, *intraventricular*, *intratecal*, *intramuscular*, *intranasal*, *enteral*, *intravítreia*, *intracerebral*, *epidural* ou *via oral*.

[011] De preferência, tal composição farmacêutica da invenção pode ser encapsulada sob a forma de uma emulsão, suspensão, pílula, comprimido, cápsula ou gel mole para administração por *via oral*, ou sob a forma de aerossol ou de pó seco para entrega ao trato respiratório e pulmões.

[214] Em uma modalidade, um oligonucleotídeo da invenção pode ser utilizado em conjunto com outro composto já conhecido em ser utilizado para o tratamento da referida doença. Estes outros compostos podem ser usados para retardar a progressão da doença, para a redução de comportamentos ou

movimentos anormais, para a redução da inflamação do tecido muscular, para a melhoria da fibra muscular e/ou a função neuronal, a integridade e/ou a sobrevivência e/ou melhora, aumento ou restauração da função cardíaca. Exemplos são, mas não limitados a, um esteróide, preferencialmente um (glico)corticosteróide, um inibidor da ECA (preferencialmente perindopril), um bloqueador do receptor tipo 1 de angiotensina II (preferencialmente losartana), um inibidor do fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), um inibidor de TGF $\beta$  (preferencialmente decorina), biglicano recombinante humano, uma fonte de mIGF-1, um inibidor de miostatina, manose-6-fosfato, dantrolene, halofunginona, um antioxidante, um inibidor do canal iônico, um inibidor de protease, um inibidor de fosfodiesterase (preferencialmente um inibidor de PDE5, tais como sildenafil ou tadalafil, e/ou inibidores PDE10A e/ou MP-10), L-arginina, bloqueadores dopaminérgicos, amantadina, tetrabenazina, co-enzima Q10, antidepressivos, anti-psicóticos, anti-epilépticos, estabilizadores de humor em geral, ácidos graxos ômega-3, creatina monohidratada, inibidores de KMO (Cinurenina mono oxigenase), tal como CHDI246 ou inibidores HDAC4, tal como PBT2. Esta utilização combinada pode ser uma utilização sequencial: cada componente é administrado em uma composição distinta. Alternativamente, cada composto pode ser utilizado em conjunto em uma única composição.

Uso

[012] Em um aspecto adicional, é fornecido o uso de uma composição ou um oligonucleotídeo conforme descrito nas seções anteriores para uso como um medicamente ou parte da terapia, ou aplicações em que o referido oligonucleotídeo exerce sua atividade intracelular.

[013] Preferencialmente, um oligonucleotídeo ou composição da invenção é para o uso como medicamento ou parte de uma terapia para prevenir, retardar, curar, aliviar e/ou tratar um distúrbio genético humano associado à instabilidade da repetição do elemento cis. Um distúrbio genético humano associado à instabilidade da repetição do elemento cis é de preferência um distúrbio genético neuromuscular, mais de preferência conforme identificado aqui anteriormente.

Método

[014] Em um outro aspecto, é fornecido um método para prevenir, tratar, curar, aliviar e/ou retardar uma doença ou patologia, tal como definido na seção anterior, em um indivíduo, em uma célula, tecido ou órgão do referido indivíduo. O método compreende a administração de um oligonucleotídeo ou de uma composição da invenção ao referido indivíduo ou um sujeito em necessidade do mesmo.

[015] O método de acordo com a invenção em que um oligonucleotídeo ou uma composição como aqui definido, pode

ser adequado para administração *in vivo* a uma célula, tecido e/ou um órgão de indivíduos afetados por qualquer uma das doenças aqui definidas ou em risco de desenvolver a referida doença, e pode ser administrado *in vivo*, *ex vivo* ou *in vitro*. Um indivíduo ou sujeito em necessidade é, preferencialmente um mamífero, mais preferencialmente um ser humano.

[016] Em um outro aspecto, é fornecido um método para o diagnóstico, em que o oligonucleotídeo da invenção é fornecido com um marcador radioativo ou um marcador fluorescente. Nesse método, um oligonucleotídeo da invenção pode ser usado como uma sonda *in situ* para detectar focos (agregados de RNA/proteína resultantes da expansão da repetição) em uma amostra de um indivíduo. A referida amostra compreende células a partir do referido indivíduo.

[017] Em uma modalidade, em um método da invenção, uma concentração de um oligonucleotídeo ou composição é variada de 0,01 nM a 1  $\mu$ m. Mais preferencialmente, a concentração utilizada é de 0,05 a 500 nM, ou de 0,1 a 500 nM, ou de 0,02 a 500 nM, ou de 0,05 a 500 nM, ainda mais preferencialmente de 1 a 200 nM.

[018] Os intervalos de doses de um oligonucleotídeo ou composição de acordo com a invenção são, preferencialmente concebidos com base em estudos de dose crescente em ensaios clínicos (uso *in vivo*), para os quais existem requisitos protocolares rigorosos. Um oligonucleotídeo, tal como aqui

definido, pode ser utilizado em uma dose que é variada de 0,01 a 200 mg/kg ou 0,05 a 100 mg/kg, ou 0,1 a 50 mg/kg, ou 0,1 a 20 mg/kg, de preferência de 0,5 a 10 mg/kg.

[215] Os intervalos de dose do oligonucleotídeo ou composição, de acordo com a invenção, também podem ser utilizados em uma dose que é

Variada de 100 a 300 µg/semana, de 8 a 12 injeções no total ou

Variada de 150 a 250 µg/semana, de 9 a 11 injeções no total ou

200 µg/semana, 11 injeções no total ou

Variada entre 10 e 350 µg/dia durante duas semanas ou

Variada de 50 a 250 µg/dia durante duas semanas ou

Variada de 100 a 200 µg/dia durante duas semanas ou

Variada de 20 a 80 µg/dia durante duas semanas ou

Variada de 200 a 320 µg/dia durante duas semanas ou

320 µg/dia, durante duas semanas ou

30 µg/dia, durante duas semanas.

[216] Os intervalos de concentração ou de dose do oligonucleotídeo ou composição tal como fornecidos acima, são concentrações ou doses preferidas para o uso *in vitro* ou *ex vivo*. O técnico especialista no assunto vai entender que, dependendo da identidade do oligonucleotídeo utilizado, a célula alvo a ser tratada, o gene-alvo e os seus níveis de expressão, o meio utilizado e as condições de transfecção e

de incubação, a concentração ou a dose do oligonucleotídeo utilizado podem ainda variar, e podem precisar ser otimizados ainda mais.

[217] Neste documento e em suas reivindicações, o verbo “compreender” e suas conjugações são usados em seu sentido não limitativo para significar que os itens seguindo a palavra estão incluídos, mas os itens não especificamente mencionados não são excluídos. O verbo “compreender” é sinônimo do verbo “ter”, a menos que indicado ao contrário. Além disso, o verbo “consistir” pode ser substituído por “consistir essencialmente em” significando que um oligonucleotídeo ou uma composição como aqui definidos, podem compreender componente(s) adicional do que os especificamente identificados, o referido componente(s) adicional não alterando a característica única da invenção. Além disso, a referência a um elemento pelo artigo indefinido “um” ou “uma” não exclui a possibilidade de que mais do que um dos elementos está presente, a menos que o contexto claramente exija que seja um, e apenas um dos elementos. Os artigos indefinidos “um” ou “uma”, portanto, geralmente significam “pelo menos um”.

[218] Cada uma das modalidades tais como aqui identificadas podem ser combinadas entre si, a menos que indicado de outra forma. Todas as referências de patentes e literatura citadas no presente relatório descritivo são aqui

incorporadas por referência na sua totalidade.

Definições

[219] Ao longo do pedido, os termos "se liga", "se dirige", "hibridiza" poderiam ser utilizados alternadamente quando utilizados no contexto de um oligonucleotídeo anti-sentido, que é complementar reverso para uma parte de um pré-RNAm, tal como aqui identificado. No contexto da invenção, "hibridizar" ou "ligar" é usado sob condições fisiológicas em uma célula, de preferência uma célula humana a menos que indicado de outra forma.

[019] Tal como aqui utilizado, "hibridização" refere-se ao emparelhamento de compostos oligoméricos complementares (por exemplo, um composto anti-sentido e o seu ácido nucleico alvo). Embora não limitado a um mecanismo particular, o mecanismo mais comum de emparelhamento envolve ligações de hidrogênio, as quais podem ser de Watson-Crick, de Hoogsteen ou de ligação de hidrogênio de Hoogsteen invertida, entre o nucleosídeo complementar ou bases nucleotídicas (nucleobases). Por exemplo, a adenina base natural é nucleobase complementar às nucleobases naturais timina, 5-metiluracila e uracila, que se emparelham através da formação de ligações de hidrogênio. A guanina base natural é nucleobase complementar às bases naturais citosina e 5-metilcitosina. A hibridização pode ocorrer sob circunstâncias variadas. Em particular, a hibridização de um

oligonucleotídeo da presente invenção com um pré-mRNA alvo pode ocorrer em diferentes circunstâncias. Da mesma forma, a ligação de um oligonucleotídeo da invenção a um pré-mRNA alvo pode ocorrer em diferentes circunstâncias. Preferencialmente, a referida hibridização ou a referida ligação é avaliada sob condições fisiológicas em uma célula, mais preferivelmente em uma célula humana. Um oligonucleotídeo da presente invenção é, de preferência referido em ser possível de se ligar a, ou capaz de se ligar a, ou possível de hibridizar com, ou capaz de hibridizar com, quando a referida ligação ou hibridização ocorre sob condições fisiológicas em uma célula, de preferência uma célula humana.

[020] Tal como aqui utilizado, "nucleotídeo" refere-se a um nucleosídeo compreendendo ainda um grupo de ligação de fosfato modificado ou não modificado, ou uma ligação de internucleosídeos não-fosfato.

[220] Tal como aqui utilizado, "análogo de nucleotídeo" ou "equivalente de nucleotídeo" refere-se a um nucleotídeo, o qual compreende pelo menos uma modificação no que diz respeito aos nucleotídeos de ocorrência natural em RNA, tais como A, C, G e U. Tal modificação pode ser uma modificação de ligação de internucleosídeos e/ou uma modificação de açúcar e/ou uma alteração de base.

[221] Tal como aqui utilizado, "monômero" refere-

se a um precursor para a síntese de um composto oligomérico ou polimérico. Além disso, a unidade monomérica ou um resíduo dentro de tal composto oligomérico ou polimérico é englobadoa no termo "monômero". Assim, "monômero" e "resíduo de nucleotídeos" podem ser utilizados intermutavelmente ao longo da descrição. Dentro do contexto da presente invenção, um monômero é preferencialmente um nucleotídeo. Os monômeros preferidos para serem incorporados nos oligonucleotídeos, de acordo com a invenção, são os nucleotídeos compreendendo um substituinte 2'-O-metil, uma ligação de internucleosídeos de fosforotioato, e uma 5-metilpirimidina e/ou uma nucleobase 2,6-diaminopurina.

[021] Tal como aqui utilizado, "nucleobase" refere-se à porção de base heterocíclica de um nucleosídeo. As nucleobases podem ocorrer naturalmente ou podem ser modificadas e, portanto, incluem, mas não estão limitadas a adenina, citosina, guanina, uracila, timina e os análogos das mesmas, tais como 5-metilcitosina. Em certas modalidades, uma nucleobase pode compreender qualquer átomo ou grupo de átomos capazes de ligação de hidrogênio a uma base de um outro ácido nucleico.

[022] Tal como aqui utilizado, " $T_m$ " significa a temperatura de fusão em que está a temperatura das duas cadeias de uma dupla de ácido nucleico em separado.  $T_m$  é muitas vezes utilizada como uma medida da estabilidade dupla

ou da afinidade de ligação de um composto anti-sentido para uma molécula de RNA complementar.

[023] Tal como aqui utilizado, "2'-modificado" ou "2'-substituído" refere-se a um nucleosídeo contendo um açúcar pentose compreendendo um substituinte em outra posição 2' diferente de H ou OH. Os nucleosídeos 2'-modificados incluem, mas não estão limitados aos nucleosídeos bicíclicos em que a ponte ligando dois átomos de carbono do anel de açúcar liga o carbono 2' e outro carbono do anel de açúcar; e nucleosídeos com substituintes-2' não de ponte, tais como alil, amino, azido, tio, O-alil, O-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alquil, -OCF<sub>3</sub>, O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-CH<sub>3</sub>, 2'-O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>, O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-N(R<sub>m</sub>)(R<sub>n</sub>), ou O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-N(R<sub>m</sub>)(R<sub>n</sub>), em que cada R<sub>m</sub> e R<sub>n</sub> é, independentemente, H ou alquil C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> substituído ou não substituído. Os nucleosídeos 2'-modificados podem ainda incluir outras modificações, por exemplo, em outras posições do açúcar e/ou da nucleobase.

[024] Tal como aqui utilizado, "2'-OMe" ou "2'-OCH<sub>3</sub>" ou "2'-O-metil" referem-se cada um a um nucleosídeo compreendendo um açúcar compreendendo um grupo -OCH<sub>3</sub> na posição 2' do anel de açúcar.

[025] Tal como aqui utilizado, "MOE" ou "2'-MOE" ou "2'-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>" ou "2'-O-metoxietila" referem-se cada um a um nucleosídeo compreendendo um açúcar compreendendo um grupo -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub> na posição 2' do anel de açúcar.

[026] Tal como aqui utilizado, o termo "análogo de adenina" significa uma nucleobase de purina quimicamente modificada que, quando incorporada em um oligômero, é capaz de formar um par de bases com ou uma timina ou racilade uma cadeia complementar de RNA ou de DNA. De preferência, tal par de base é um par de base de Watson-Crick, mas análogos e desvios ligeiros do mesmo também são considerados permissíveis dentro do contexto da presente invenção.

[027] Tal como aqui utilizado, o termo "análogo de uracila" significa uma nucleobase de pirimidina quimicamente modificada que, quando incorporada em um oligômero, é capaz de formar um par de bases ou com uma adenina de uma cadeia complementar de RNA ou de DNA. De preferência, tal par de base é um par de base de Watson-Crick, mas análogos e desvios ligeiros do mesmo também são considerados permissíveis dentro do contexto da presente invenção.

[028] Tal como aqui utilizado, o termo "análogo de timina" significa uma nucleobase de pirimidina quimicamente modificada que, quando incorporada em um oligômero, é capaz de formar um par de bases ou com uma adenina de uma cadeia complementar de RNA ou de DNA. De preferência, tal par de bases é um par de bases de Watson-Crick, mas análogos e desvios ligeiros do mesmo também são considerados permissíveis dentro do contexto da presente invenção.

[029] Tal como aqui utilizado, o termo "análogo de

"citosina" significa uma nucleobase de pirimidina quimicamente modificada que, quando incorporada em um oligômero, é capaz de formar um par de bases ou com uma guanina de uma cadeia complementar de RNA ou de DNA. Por exemplo, o análogo de citosina pode ser uma 5-metilcitosina. De preferência, tal par de bases é um par de bases de Watson-Crick, mas análogos e desvios ligeiros do mesmo também são considerados permissíveis dentro do contexto da presente invenção.

[030] Tal como aqui utilizado, o termo "análogo de timina" significa uma nucleobase de purina quimicamente modificada que, quando incorporada em um oligômero, é capaz de formar um par de bases ou com uma citosina de uma cadeia complementar de RNA ou de DNA. De preferência, tal par de bases é um par de bases de Watson-Crick, mas análogos e desvios ligeiros do mesmo também são considerados permissíveis dentro do contexto da presente invenção.

[222] Tal como aqui utilizado, o termo "guanosina" refere-se a um nucleosídeo ou nucleosídeo açúcar-modificado compreendendo uma guanina ou nucleobase análoga da guanina.

[223] Tal como aqui utilizado, o termo "uridina" refere-se a um nucleosídeo ou nucleosídeo açúcar-modificado compreendendo uma uracila ou nucleobase análoga da uracila.

[224] Tal como aqui utilizado, o termo "timidina" refere-se a um nucleosídeo ou nucleosídeo açúcar-modificado

compreendendo uma timina ou nucleobase análoga da timina.

[225] Tal como aqui utilizado, o termo "citidina" refere-se a um nucleosídeo ou nucleosídeo açúcar-modificado compreendendo uma citosina ou nucleobase análoga da citosina.

[226] Tal como aqui utilizado, o termo "adenosina" refere-se a um nucleosídeo ou nucleosídeo açúcar-modificado compreendendo uma adenina ou nucleobase análoga da adenina.

[031] Tal como aqui utilizado, "oligonucleotídeo" refere-se a um composto compreendendo uma pluralidade de nucleosídeos ligados. Em certas modalidades, a uma ou mais pluralidade de nucleosídeos é modificada. Em certas modalidades, um oligonucleotídeo compreende um ou mais ribonucleosídeos (RNA) e/ou desoxirribonucleosídeos (DNA).

[227] Tal como aqui utilizado, "ligação internucleosídica" refere-se a uma ligação covalente entre nucleosídeos adjacentes. Uma ligação internucleosídica pode ser uma ligação internucleosídica de ocorrência natural, isto é, uma ligação de 3' para 5' fosfodiéster, ou uma ligação internucleosídica modificada.

[228] como aqui utilizado, "ligação internucleosídica modificada" refere-se a qualquer outra ligação internucleosídica diferente de uma ligação internucleosídica de ocorrência natural.

[229] Tal como aqui utilizado, "cadeia principal"

refere-se à cadeia de porções de açúcar alternadas e as ligações internucleosídicas, como se verifica em um oligonucleotídeo. O oligonucleotídeo da invenção compreende pelo menos uma ligação internucleosídica de fosforoditioato, mas há de ser compreendido que mais modificações da cadeia principal, tais como modificações de açúcar e/ou modificações de ligação internucleosídica podem estar presentes na cadeia principal.

[032] Tal como aqui utilizado, "composto oligomérico" refere-se a uma estrutura polimérica compreendendo duas ou mais sub-estruturas. Em certas modalidades, um composto oligomérico é um oligonucleotídeo. Em certas modalidades, um composto oligomérico é um oligonucleotídeo de filamento simples. Em certas modalidades, um composto oligomérico é uma dupla de filamentos duplos compreendendo dois oligonucleotídeos. Em certas modalidades, um composto oligomérico é um oligonucleotídeo de filamento simples ou de filamento duplo compreendendo um ou mais grupos conjugados e/ou grupos terminais.

[230] Tal como aqui utilizado, "conjugado" refere-se a um átomo ou grupo de átomos ligados a um oligonucleotídeo ou composto oligomérico. Em geral, os grupos de conjugado modificam uma ou mais propriedades do composto ao qual eles estão ligados, incluindo, mas não

limitado à farmacodinâmica, farmacocinética, a ligação, a absorção, a distribuição celular, a adesão celular, a carga e depuração. Grupos conjugados são rotineiramente usados na técnica da química e estão ligados diretamente ou através de um porção de ligação opcional ou grupo de ligação ao composto de origem, tal como um composto oligomérico. Em certas modalidades, os grupos conjugados incluem, sem limitação, intercaladores, moléculas repórter, poliaminas, poliamidas, polietileno glicóis, tioéteres, poliéteres, colesterolíis, tiocolesteríis, porções de ácido cólico, folato, lípidos, fosfolípidos, biotina, fenazina, fenantridina, antraquinona, adamantano, acridina, fluoresceinas, rodaminas, cumarinas e corantes. Em certas modalidades, os conjugados são grupos terminais. Em certas modalidades, os conjugados são ligados a um 3' ou 5' do nucleosídeo terminal ou a um nucleosídeo interno de um oligonucleotídeo.

[033] Tal como aqui utilizado, "grupo de ligação conjugado" refere-se a qualquer átomo ou grupo de átomos utilizados para ligar um conjugado a um oligonucleotídeo ou composto oligomérico. Os grupos de ligação ou grupos de ligação bi funcionais, tais como os que são conhecidos na técnica, são propícios para a presente invenção.

[034] Tal como aqui utilizado, "composto antisentido" refere-se a um composto oligomérico, pelo menos uma porção da qual é pelo menos parcialmente complementar a, ou

pelo menos parcialmente direcionada a, um ácido nucleico alvo ao qual se hibridiza, e modula a atividade, processamento ou expressão do referido ácido nucleico alvo.

[035] Tal como aqui utilizado, "expressão" refere-se ao processo pelo qual um gene, finalmente, resulta em uma proteína. A expressão inclui, mas não está limitada a, transcrição, splicing, modificação pós-transcrição e tradução.

[036] Tal como aqui utilizado, "oligonucleotídeo anti-sentido" refere-se a um composto anti-sentido que é um oligonucleotídeo.

[037] Tal como aqui utilizado, "atividade anti-sentido" refere-se a qualquer atividade detectável e/ou mensurável atribuível à hibridização de um composto anti-sentido para o seu ácido nucleico alvo. Em certas modalidades, essa atividade pode ser um aumento ou uma diminuição no valor de um ácido nucleico ou proteína. Em certas modalidades, essa atividade pode ser uma alteração na razão de variantes de splice de um ácido nucleico ou proteína. A detecção e/ou medição da atividade anti-sentido pode ser direta ou indireta. Em certas modalidades, a atividade anti-sentido é avaliada pela observação de uma alteração fenotípica em uma célula ou animal.

[231] Tal como aqui utilizado, "ácido nucleico alvo" refere-se a qualquer molécula de ácido nucleico, a

expressão, quantidade, ou atividade, os quais são capazes de serem modulados por um composto anti-sentido. Em certas modalidades, o ácido nucleico alvo é DNA ou RNA. Em certas modalidades, o RNA alvo é miRNA, mRNA, pré-mRNA, RNA não-codificante, ou transcritos anti-sentido naturais. Por exemplo, o ácido nucleico alvo pode ser um gene celular (ou mRNA transcrita do gene), cuja expressão está associada a uma doença particular ou estado de doença.

[232] Tal como aqui utilizado, "mRNA alvo" refere-se a uma molécula de RNA pré-selecionada que codifica uma proteína.

[233] Tal como aqui utilizado, "dirigir" ou "dirigido a" referem-se à associação de um composto anti-sentido a uma molécula de ácido nucleico alvo específico ou uma região específica de nucleotídeos em uma molécula de ácido nucleico alvo. Um composto anti-sentido tem como alvo um ácido nucleico alvo, se for suficientemente complementar reverso ao ácido nucleico alvo para permitir a hibridização sob condições fisiológicas. Nesse contexto, "suficientemente complementar reverso" pode ser pelo menos 90%, 95%, 97%, 99% ou 100% complementar reverso com a referida molécula de ácido nucleico alvo.

[038] Tal como aqui utilizado, "sítio alvo" refere-se a uma região de um ácido nucleico alvo que está ligada por um composto anti-sentido. Em certas modalidades, um sítio

alvo está pelo menos parcialmente dentro da região não traduzida 3' de uma molécula de RNA. Em certas modalidades, um sítio alvo está pelo menos parcialmente dentro da região não traduzida 5' de uma molécula de RNA. Em certas modalidades, um sítio alvo está pelo menos parcialmente dentro da região de codificação de uma molécula de RNA. Em certas modalidades, um sítio alvo está pelo menos parcialmente dentro de um éxon de uma molécula de RNA. Em certas modalidades, um sítio alvo está pelo menos parcialmente dentro de um ítron de uma molécula de RNA. Em certas modalidades, um sítio alvo está pelo menos parcialmente dentro do sítio alvo de miRNA de uma molécula de RNA. Em certas modalidades, um sítio alvo está pelo menos parcialmente dentro de uma região repetida de uma molécula de RNA.

[039] Tal como aqui utilizado, "proteína alvo" refere-se a uma proteína, a expressão da qual é modulada por um composto anti-sentido. Em certas modalidades, uma proteína-alvo é codificada por um ácido nucleico alvo. Em certas modalidades, a expressão de uma proteína-alvo é influenciada de outra forma por um ácido nucleico alvo.

[040] Tal como aqui utilizado, "complementaridade", em referência às nucleobases, refere-se a uma nucleobase que é capaz de emparelhamento de bases com outra nucleobase. Por exemplo, no DNA a adenina (A) é complementar à timina (T).

Por exemplo, no RNA a adenina (A) é complementar à uracila (U). Em certas modalidades, as nucleobases complementares referem-se a uma nucleobase de um composto anti-sentido que é capaz de emparelhamento de base com uma nucleobase do seu ácido nucleico alvo. Por exemplo, se uma nucleobase em uma determinada posição de um composto anti-sentido é capaz de ligação de hidrogênio com uma nucleobase em uma determinada posição de um ácido nucleico alvo, em seguida, a posição da ligação de hidrogênio entre o oligonucleotídeo e o ácido nucleico alvo é considerada complementar a esse par de nucleobases. As nucleobases compreendendo certas modificações podem manter a capacidade de se emparelhar com uma nucleobase de contraparte e, assim, ainda são capazes da complementaridade de nucleobase.

[041] Tal como aqui utilizado, "não-complementar", em referência às nucleobases refere-se a um par de nucleobases que não forma ligações de hidrogênio com um outro, ou suporta a hibridização de outra forma.

[042] Tal como aqui utilizado, "complementar", em referência a nucleosídeos, oligonucleotídeos ou ácidos nucleicos ligados, refere-se à capacidade de um composto oligomérico para hibridizar com outro composto oligomérico ou ácido nucleico através da complementaridade da nucleobase. Em certas modalidades, um composto anti-sentido e o seu alvo são complementares um ao outro quando um número

suficiente de posições correspondentes em cada molécula é ocupado por nucleobases que podem ligar entre si para permitir a associação estável entre o composto anti-sentido e o alvo. Um técnico especialista no assunto reconhece que a inclusão de desemparelhamentos é possível, sem eliminar a capacidade dos compostos oligoméricos de permanecerem em associação. Portanto, são aqui descritos compostos anti-sentido que podem incluir até cerca de 20% de nucleotídeos que estão desemparalhados (isto é, não são nucleobases complementar aos nucleotídeos correspondentes do alvo). De preferência, os compostos anti-sentido contêm não mais do que cerca de 15%, mais preferencialmente não mais do que cerca de 10%, mais preferencialmente não mais do que 5% ou nenhum desemparelhamento. Os nucleotídeos restantes são nucleobases complementares, ou de outra forma não atrapalham a hibridização (por exemplo, bases universais). Um técnico especialista no assunto reconheceria que os compostos aqui fornecidos são pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% complementares a um ácido nucleico alvo ou complementares reversos a um ácido nucleico alvo.

[043] Tal como aqui utilizado, "modulação" refere-se a uma perturbação da quantidade ou da qualidade de uma função ou atividade quando comparada com a função ou

atividade antes da modulação. Por exemplo, a modulação inclui a alteração, ou um aumento (estimulação ou indução) ou uma diminuição (inibição ou redução) na expressão do gene. Como outro exemplo, a modulação da expressão pode incluir a desorientação da seleção do sítio de splice do processamento de pré-mRNA, resultando em uma alteração na quantidade de uma variante de splice particular presente, em comparação com as condições que não foram perturbadas. Como outro exemplo, a modulação inclui perturbar a tradução de uma proteína.

[044] Tal como aqui utilizado, "motivo" refere-se a um padrão de modificações em um composto oligomérico ou uma região do mesmo. Os motivos podem ser definidos por modificações em certos nucleosídeos e/ou em certos grupos de ligação de um composto oligomérico.

[045] Tal como aqui utilizado, "as modificações iguais" se referem às modificações em relação às moléculas de ocorrência natural que são iguais uma com a outra, incluindo a ausência de modificações. Assim, por exemplo, dois nucleosídeos e DNA não modificados possuem "a mesma modificação", apesar do nucleosídeo de DNA ser não modificado.

[046] Como aqui utilizado, "tipo de modificação", em referência a um nucleosídeo ou um nucleosídeo de um "tipo" refere-se à modificação de um nucleosídeo, e inclui

nucleosídeos modificados e não modificados. Por conseguinte, a menos que indicado de outra forma, um "nucleosídeo tendo uma modificação de um primeiro tipo" pode ser um nucleosídeo não modificado.

[047] Tal como aqui utilizado, "sais farmaceuticamente aceitáveis" referem-se aos sais dos compostos ativos que retêm a atividade biológica desejada do composto ativo, e não conferem os efeitos toxicológicos indesejáveis dos mesmos.

[048] Tal como aqui utilizado, o termo "independente" significa que cada ocorrência de uma variável repetitiva dentro de um oligonucleotídeo reivindicado é selecionada, independentemente de uma outra. Por exemplo, cada uma das variáveis repetitivas pode ser selecionada de modo que (i) cada uma das variáveis repetitivas são as mesmas, (ii) duas ou mais são as mesmas, ou (iii) cada uma das variáveis repetitivas podem ser diferentes.

#### *Definições Químicas Gerais*

[049] Tal como aqui utilizado, "alquil" refere-se a um hidrocarboneto saturado de cadeia linear ou ramificada, ou um substituinte ou radical, contendo tipicamente até vinte e quatro átomos de carbono. Exemplos de grupos alquil incluem, mas não estão limitados a, metil, etil, propil, butil, isopropil, n-hexil, octil, decil, dodecil e

semelhantes. Grupos alquil normalmente incluem a partir de 1 a 24 átomos de carbono, mais tipicamente a partir de 1 a 12 átomos de carbono (alquil C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>) com a partir de 1 a 6 átomos de carbono (alquil C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) sendo mais preferidos. O termo "alquil inferior", tal como aqui utilizado, inclui de 1 a 6 átomos de carbono (alquil C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>). Os grupos alquil tal como aqui utilizados podem incluir, opcionalmente, um ou mais grupos substituintes adicionais.

[050] Tal como aqui utilizado, "alquenil" refere-se a radical ou substituinte de cadeia de hidrocarboneto linear ou ramificada, contendo tipicamente até vinte e quatro átomos de carbono, e tendo pelo menos uma ligação dupla carbono-carbono. Exemplos de grupos alquenil incluem, mas não estão limitados a, etenil, propenil, butenil, 1-metil-2-buten-1-il, dienos tais como 1,3-butadienil, e semelhantes. Os grupos alquenil tipicamente incluem de 2 a 24 átomos de carbono, mais tipicamente de 2 a 12 átomos de carbono, com de 2 a 6 átomos de carbono sendo os mais preferidos. Os grupos alquenil, tal como aqui utilizados, podem incluir, opcionalmente, um ou mais grupos substituintes adicionais.

[051] Tal como aqui utilizado, o termo "alquinil" refere-se a um radical ou substituinte de hidrocarboneto linear ou ramificado, contendo tipicamente até vinte e quatro átomos de carbono, e tendo pelo menos uma ligação tripla

carbono-carbono. Exemplos de grupos alquinil incluem, mas não estão limitados a, etinil, 1-propinil, 1-butinil, e semelhantes. Grupos alquinil tipicamente incluem de 2 a 24 átomos de carbono, mais tipicamente de 2 a 12 átomos de carbono com a partir de 2 a 6 átomos de carbono sendo os mais preferidos. Os grupos alquinil como aqui utilizado podem opcionalmente incluir um ou mais outros grupos substituintes

[052] Tal como aqui utilizado, "aminoalquil" refere-se a um radical ou substituinte amino substituído. O termo é destinado a incluir grupos alquil C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> possuindo um substituinte amino em qualquer posição, e em que o grupo aminoalquil é ligado à molécula de origem através da sua porção alquil. As porções alquil e/ou amino do grupo aminoalquil podem ser ainda substituídas com grupos substituintes.

[053] Tal como aqui utilizado, "alifático" refere-se a um radical ou substituinte de hidrocarboneto linear ou ramificado, contendo tipicamente até vinte e quatro átomos de carbono, em que a saturação entre quaisquer dois átomos de carbono é uma ligação simples, dupla ou tripla. Um grupo alifático contém preferencialmente de 1 a 24 átomos de carbono, mais tipicamente de 1 a 12 átomos de carbono com 1 a 6 átomos de carbono sendo o mais preferido. A cadeia linear ou ramificada de um grupo alifático pode ser interrompida com um ou mais heteroátomos, que incluem nitrogênio,

oxigênio, enxofre e fósforo. Tais grupos alifáticos interrompidos por heteroátomos incluem, sem limitação polialcóxis, tais como polialquíleno-glicóis, poliaminas, e poliiminas. Grupos alifáticos, como aqui utilizados, podem incluir, opcionalmente, outros grupos substituintes.

[054] Tal como aqui utilizado, "alicíclico" ou "aliciclico" refere-se a um substituinte ou radical cíclico, em que o sistema de anel é alifático. O sistema de anel pode compreender um ou mais anéis, em que pelo menos um anel é alifático. Grupos alicíclicos preferidos incluem anéis com 5 a 9 átomos de carbono no anel. Os grupos acíclicos, conforme aqui utilizados, podem opcionalmente incluir ainda grupos substituintes.

[055] Tal como aqui utilizado, "alcóxi" refere-se a um radical ou substituinte compreendendo um grupo alquil e um átomo de oxigênio, em que o grupo alcóxi está ligado a uma molécula de origem através do seu átomo de oxigênio. Exemplos de grupos alcóxi incluem, mas não estão limitados a, metóxi, etóxi, propóxi, isopropóxi, n-butóxi, sec-butóxi, terc-butóxi, n-pentóxi, neopentóxi, n-hexóxi e semelhantes. Os grupos alcóxi, tal como aqui utilizado, podem incluir, opcionalmente, outros grupos substituintes.

[056] Tal como aqui usado, "halo", "haleto" e "halogênio" referem-se a um átomo, radical ou substituinte selecionado a partir de flúor, cloro, bromo e iodo.

[057] Tal como aqui utilizado, "aryl" e "aromático" referem-se a um radical ou substituinte compreendendo um sistema de anel carbocíclico mono- ou policíclico tendo um ou mais anéis aromáticos. Exemplos de grupos aril incluem, mas não estão limitados a, fenil, naftil, tetra-hidronaftil, indanil, idenil e semelhantes. Sistemas de anel aril preferidos possuem de 5 a 20 átomos de carbono em um ou mais anéis. Grupos aril, tal como aqui utilizado, podem incluir, opcionalmente, outros grupos substituintes.

[058] Tal como aqui utilizado, "aralquil" e "arilalquil" referem-se a um radical ou substituinte compreendendo um grupo alquil e um grupo aril, em que o grupo aralquil ou arilalquil está ligado a uma molécula de origem através do seu grupo alquil. Exemplos incluem, mas não estão limitados a, benzil, fenantril, e semelhantes. Os grupos aralquil, tal como aqui utilizado, podem incluir, opcionalmente, outros grupos substituintes ligados ao grupo alquil, aril ou ambos os grupos que formam o radical ou substituinte.

[059] Tal como aqui utilizado, "heterociclico" refere-se a um radical ou substituinte compreendendo um sistema de anel mono ou policíclico que inclui pelo menos um heteroátomo e é insaturado, parcialmente saturado ou totalmente saturado, incluindo assim grupos heteroaril. Heterociclico também se destina a incluir porções do sistema

de anéis fundidos em que um ou mais dos anéis fundidos contêm pelo menos um heteroátomo, e os outros anéis podem conter um ou mais heteroátomos, ou, opcionalmente, não contêm heteroátomos. Um grupo heterocíclico inclui, tipicamente, pelo menos um átomo selecionado a partir de enxofre, nitrogênio ou oxigênio. Exemplos de grupos heterocíclicos incluem [1,3] dioxolano, pirrolidinil, pirazolinil, pirazolidinil, imidazolinil, imidazolidinil, piperidinil, piperazinil, oxazolidinil, isoxazolidinil, morfolinil, tiazolidinil, isotiazolidinil, quinoxalinil, piridazinonil, tetrahidrofuril e semelhantes. Os grupos heterocíclicos, tal como aqui utilizados, podem incluir, opcionalmente, outros grupos substituintes.

[060] Tal como aqui utilizado, "heteroaril" e "heteroaromático" refere-se a um radical ou substituinte compreendendo um anel aromático mono ou policíclico, sistema de anel ou sistema de anel fundido, em que pelo menos um dos anéis é aromático e inclui um ou mais heteroátomos. Heteroaril também se destina a incluir sistemas de anel fundidos, incluindo sistemas em que um ou mais dos anéis fundidos não contêm heteroátomos. Grupos heteroaril incluem, normalmente, um átomo de anel selecionado a partir de enxofre, nitrogênio ou oxigênio. Exemplos de grupos heteroaril incluem, mas não estão limitados a, piridinil, pirazinil, pirimidinil, pirrolil, pirazolil, imidazolil,

tiazolil, oxazolil, isooxazolil, tiadiazolil, oxadiazolil, tiofenil, furanil, quinolinil, isoquinolinil, benzimidazolil, benzoxazolil, quinoxalinil, e semelhantes.

Os radicais ou substituintes heteroaril podem ser ligados a uma molécula de origem diretamente, ou através de um grupo de ligação, tal como um grupo alifático ou um heteroátomo.

Os grupos heteroaril, tal como aqui utilizados, podem incluir, opcionalmente, outros grupos substituintes.

[061] Tal como aqui utilizado, "heteroarilalquil" refere-se a radical ou substituinte compreendendo um grupo heteroaril conforme anteriormente definido e um radical alquil, em que o grupo heteroarilalquil é ligado a uma molécula de origem através do seu grupo alquil. Exemplos incluem, mas não estão limitados a, piridinilmetil, pirimidiniletíl, naftidinilpropil e semelhantes. Os grupos heteroarilalquil, tal como aqui utilizados, podem incluir, opcionalmente, outros grupos substituintes em uma ou ambas as porções heteroaril ou alquil.

[062] Tal como aqui utilizado, "mono ou policíclico" refere-se a quaisquer sistemas de anel, tal como um anel único ou um sistema policíclico tendo anéis que são fundidos ou ligados, e é concebido para ser incluído em sistemas de anéis simples ou misturados selecionados individualmente a partir de alifáticos, alicíclicos, aril, heteroaril, aralquil, arilalquil, heterocíclico, heteroaril,

heteroaromático e heteroarilalquil. Tais estruturas mono e policíclicas podem conter anéis que têm um grau de saturação variável ou uniforme, incluindo os anéis totalmente saturados, parcialmente saturados ou totalmente insaturados. Cada anel pode conter átomos de anel selecionados a partir de C, N, O e S para dar origem aos anéis heterocíclicos, bem como anéis compreendendo apenas átomos do anel de C. Heterocíclicos e todos os anéis de carbono podem estar presentes em um motivo misto, tal como, por exemplo, benzimidazol, em que um anel do sistema de anel fundido tem apenas átomos de carbono no anel e o outro anel tem dois átomos de nitrogênio. As estruturas mono ou policíclicas podem ainda ser substituída com grupos substituintes, tais como, por exemplo, ftalimida, que tem dois grupos oxo (=O) ligados a um dos anéis. Em outro aspecto, as estruturas mono ou policíclicas podem ser ligadas a uma molécula de origem diretamente através de um átomo de anel, através de um grupo substituinte, ou um grupo de ligação bifuncional.

[063] Tal como aqui utilizado, "acil" refere-se a um radical ou substituinte compreendendo um grupo carbonila ( $\text{C}=\text{O}$  ou  $-\text{C}(\text{O})-$ ) e outro substituinte X, em que o grupo acil está ligado a uma molécula de origem através do seu grupo carbonila. Como tal, um grupo acil é formalmente obtido por remoção de um grupo hidroxila de um ácido orgânico, e tem a fórmula geral  $-\text{C}(\text{O})-\text{X}$ , em que X é tipicamente alifático,

alicíclico ou aromático. O termo "acil" também se destina a incluir radicais ou substituintes heteroacil de fórmula geral  $-Y(O)_n-X$ , em que X é como definido acima, e  $Y(O)_n$  é tipicamente sulfonila, sulfinila ou fosfato. Exemplos de grupos acil incluem carbonilas alifáticas, carbonilas aromáticas, sulfonilas alifáticas, sulfinilas aromáticas, sulfinilas alifáticas, fosfatos aromáticos, fosfatos alifáticos, e semelhantes. Grupos acil, tal como aqui utilizados, podem incluir, opcionalmente, outros grupos substituintes.

[064] Tal como aqui utilizado, "substituinte" e "grupo substituinte" incluem grupos que são tipicamente adicionados a outros substituintes ou compostos de origem para melhorar as propriedades desejadas, ou gerar os efeitos desejados. Os grupos substituintes podem ser protegidos ou desprotegidos, e podem ser ligados a um sítio disponível ou a vários sítios disponíveis em um composto de origem. Os grupos substituintes também podem ser adicionalmente substituídos com outros grupos substituintes, e podem ser ligados diretamente ou através de um grupo de ligação tal como um grupo alquil, ou um grupo hidrocarbil de um composto de origem. Aqui, "hidrocarbil" refere-se a qualquer grupo compreendendo: C, S e H. Estão incluídos os grupos lineares, ramificados e cílicos com qualquer grau de saturação. Tais grupos hidrocarbil podem incluir um ou mais heteroátomos

selecionados a partir de N, O e S, e podem ser ainda substituídos com um ou mais grupos substituintes.

[065] A menos que indicado de outra forma, o termo "substituído" ou "opcionalmente substituído" refere-se à presença (opcional) de qualquer um dos seguintes substituintes: halogênio, hidroxila, alquil, alquenil, alquinil, acil ( $-C(O)R_{aa}$ ), carboxil ( $-C(O)O-R_{aa}$ ), grupos alifáticos, alcóxi, oxo substituído ( $-O-R_{aa}$ ), aril, aralquil, heterocíclico, heteroaril, heteroarilalquil, amino ( $-NR_{bb}R_{cc}$ ), imino ( $=NR_{bb}$ ), amido ( $-C(O)NR_{bb}R_{cc}$  ou  $-N(R_{bb})C(O)R_{aa}$ ), azido ( $-N_3$ ), nitro ( $-NO_2$ ), ciano ( $-CN$ ), carbamido ( $-OC(O)NR_{bb}R_{cc}$  ou  $-N(R_{bb})C(O)OR_{aa}$ ), ureído ( $-N(R_{bb})C(O)NR_{bb}R_{cc}$ ), tioureído ( $-N(R_{bb})C(S)NR_{bb}R_{cc}$ ), guanidinil ( $-N(R_{bb})C(=NR_{bb})NR_{bb}R_{cc}$ ), aminidil ( $-C(=NR_{bb})NR_{bb}R_{cc}$  ou  $-N(R_{bb})C(NR_{bb})R_{aa}$ ), tiol ( $-SR_{bb}$ ), sulfinil ( $-S(O)R_{bb}$ ), sulfonil ( $-S(O)_2R_{bb}$ ), sulfonamidil ( $-S(O)_2NR_{bb}R_{cc}$  ou  $-N(R_{bb})S(O)_2R_{bb}$ ), e grupos conjugados. Aqui, cada um de  $R_{aa}$ ,  $R_{bb}$  e  $R_{cc}$  é independentemente, H, um grupo funcional químico opcionalmente ligado ou um grupo substituinte adicional, preferencialmente mas sem limitação, escolhido a partir do grupo que consiste em H, alquil, alquenil, alquinil, alifático, alcóxi, acil, aril, aralquil, heteroaril, alicíclico, heterocíclico e heteroarilalquil. Os substituintes selecionados dentro dos compostos aqui descritos estão presentes em um grau recursivo.

[066] Neste contexto, "substituinte recursivo" significa que um substituinte pode recitar outro exemplo de si mesmo. Devido à natureza recursiva de tais substituintes, teoricamente, um grande número pode estar presente em qualquer reivindicação dada. Um técnico especialista no assunto da química medicinal e da química orgânica comprehende que o número total de tais substituintes é razoavelmente limitado pelas propriedades desejadas do composto pretendido. Essas propriedades incluem, a título de exemplo e não de limitação, as propriedades físicas tais como peso molecular, solubilidade ou log P, propriedades de aplicação tal como atividade contra o alvo pretendido, e as propriedades práticas, tal como a facilidade de síntese.

[067] Os substituintes recursivos são um aspecto pretendido da invenção. Um técnico especialista no assunto da química medicinal e da química orgânica comprehende a versatilidade de tais substituintes. Na medida em que os substituintes recursivos estão presentes em uma reivindicação da presente invenção, o número total será determinado como descrito acima.

[068] Tal como aqui utilizado, um zero (0), em um intervalo indicando um número de uma determinada unidade, significa que a unidade pode estar ausente. Por exemplo, um composto oligomérico compreendendo de 0 a 2 regiões de um motivo específico, significa que o composto oligomérico pode

compreender uma ou duas dessas regiões que têm o motivo em particular, ou o composto oligomérico pode não ter quaisquer regiões que possuam o motivo em particular. Nos casos em que uma porção interna de uma molécula está ausente, as porções que flanqueiam a porção ausente estão ligadas diretamente uma s outra. Da mesma forma, o termo "nenhum", tal como aqui usado, indica que uma determinada característica não está presente.

[069] Tal como aqui utilizado, "análogo" ou "derivado" significa ou um composto ou grupo semelhante em estrutura, mas diferente em relação à composição elementar a partir do composto de origem independentemente da forma como o composto é feito. Por exemplo, um análogo ou derivado do composto não necessitam de serem feitos a partir do composto de origem como um material de partida químico.

[070] Os exemplos seguintes são oferecidos apenas para fins ilustrativos, e não se destinam a limitar o escopo da presente invenção de forma alguma.

#### **Legendas para as figuras**

[234] **Figura 1. Ensaio da atividade *in vitro* para (XYG)<sub>7</sub>, em que X = 5-metilcitosina e Y=U (PS659 SEQ ID NO:90; derivada a partir da SEQ ID NO:2) e (XYG)<sub>7</sub>, na qual X=C e Y é 5-metiluracila (PS661 SEQ ID NO:97; derivada a partir da SEQ ID NO:3).** PS659 (**1a**) e PS661 (**1b**) foram transfectados em fibroblastos DH (GM04022) em concentrações aumentando (0,5

a 200 nM). A eficácia e a seletividade foram determinadas com RT-PCR e análise lab-on-a-chip. O silenciamento das transcrições HTT expandidas ((CAG)<sub>44</sub>) e saudáveis ((CAG)<sub>18</sub>) foram comparados com os níveis relativos de transcritos HTT em amostras simuladas. Para todos os AONs n=2, com exceção para a simulada (n=3).

[235] **Figura 2. A eficácia *in vivo* de PS659 ((XYG)<sub>7</sub> em que X = 5-metilcitosina e Y=U; SEQ ID NO:2) em um modelo de rato transgênico DH.** Os ratos transgênicos DH (repetição (CAG)<sub>51</sub>) receberam 15 vezes uma injeção intraventricular com PS659 (SEQ ID NO:90 derivada da SEQ ID NO:2), durante 18 semanas a uma dose final de 200 µg por injeção, os ratos de controle e DH receberam apenas veículo. Os ratos foram sacrificados uma semana após a injeção final. De todos os ratos, o tecido foi isolado e os níveis de HTT foram determinadas com a análise Q-RT-PCR. Os níveis reduzidos do transrito HTT foram encontrados em **(A)** córtex, **(B)** hipocampo, **(C)** bulbo olfatório e **(D)** tálamo após o tratamento PS659 comparado com o controle.

[236] TABELA 1. Estruturas gerais de AONs. X=C ou 5-metilcitosina Y=U ou 5-metiluracila, Z = A ou 2,6-diaminopurina, I = inosina, e Q = monômero abásico.

[237] Nota: Todos os AONs com SEQ ID NO:4 a 69, 216 a 219 compreendem pelo menos uma modificação de base selecionada a partir de 5-metilcitosina, 5-metiluracila, e

2,6-diaminopurina.

Repetição Alvo	Sequência AON (5' → 3')	SEQ ID NO
(CAG) n	(XYG) 7 (PS57)  X=C, Y=U	1
	(XYG) 7 (PS659)  X=5-metilcitosina, Y=U	2
	(XYG) 7 (PS661)  X=C, Y=5-metiluracila	3
	(XYG) 4	4
	(XYG) 5	5
	(XYG) 6	6
	(XYG) 7	7
	(XYG) 8	8
	(XYG) 9	9
	(XYG) 10	10
	(XYG) 11	11
	(XYG) 12	12
(GCG) n	(XGX) 4	13
	(XGX) 5	14
	(XGX) 6	15
	(XGX) 7	16
	(XGX) 8	17
	(XGX) 9	18

	(XGX) 10	19
	(XGX) 11	20
	(XGX) 12	21
(CGG) n	(XXG) 4	22
	(XXG) 5	23
	(XXG) 6	24
	(XXG) 7	25
	(XXG) 8	26
	(XXG) 9	27
	(XXG) 10	28
	(XXG) 11	29
	(XXG) 12	30
	(YYX) 4	31
	(YYX) 5	32
	(YYX) 6	33
(GAA) n	(YYX) 7	34
	(YYX) 8	35
	(YYX) 9	36
	(YYX) 10	37
	(YYX) 11	38
	(YYX) 12	39
	(GGX) 4	40
	(GGX) 5	41
(GCC) n	(GGX) 6	42

(GGX) n	(GGX) 7	43
	(GGX) 8	44
	(GGX) 9	45
	(GGX) 10	46
	(GGX) 11	47
	(GGX) 12	48
	(XGG) 4	49
	(XGG) 5	50
	(XGG) 6	51
	(XGG) 7	52
	(XGG) 8	53
	(XGG) 9	54
(CCG) n	(XGG) 10	55
	(XGG) 11	56
	(XGG) 12	57
	(ZGZZY) 3	58
	(ZGZZY) 4	59
(AUUCU) n	(ZGZZY) 5	60
	(ZGZZY) 6	61
	(ZGZZY) 7	62
	(XZGG) 3	63
	(XZGG) 4	64
(CCUG) n	(XZGG) 5	65
	(XZGG) 6	66

	(XZGG) 7	67
	(XZGG) 8	68
	(XZGG) 9	69
(GGGGCC) n	(GGXUXXX) 3	216
	(GGXUXXX) 4	217
	(GGXIXXX) 4	218
	(GGXQXXX) 4	219

[238] TABELA 2. Estruturas gerais de AONs. Todos os AONs são AONs 2'-O-metil fosforotioato, em que C é 5-metilcitosina, U é 5-metiluracila, A é 2,6-diaminopurina, I é inosina e Q é um monômero abásico.

Repetição Alvo	ID do AON	Sequência de AON (5' → 3')	SEQ ID NO
(CAG) n	PS659	<u>CUG</u> <u>CUG</u> <u>CUG</u> <u>CUG</u> <u>CUG</u> <u>CUG</u> <u>CUG</u>	90
		<u>CUG</u> CUG CUG CUG CUG CUG CUG	91
		CUG <u>CUG</u> CUG <u>CUG</u> CUG <u>CUG</u> CUG	92
		<u>CUG</u> CUG <u>CUG</u> CUG <u>CUG</u> CUG <u>CUG</u>	93
		CUG CUG <u>CUG</u> <u>CUG</u> <u>CUG</u> CUG CUG	94
		CUG CUG CUG <u>CUG</u> CUG CUG CUG	95
		<u>CUG</u> CUG CUG CUG CUG CUG <u>CUG</u>	96
	PS661	<u>CUG</u> <u>CUG</u> <u>CUG</u> <u>CUG</u> <u>CUG</u> <u>CUG</u> <u>CUG</u>	97

	CUG CUG CUG CUG CUG CUG CUG	98
	CUG <u>CUG</u> CUG <u>CUG</u> CUG <u>CUG</u> CUG	99
	<u>CUG</u> CUG <u>CUG</u> CUG <u>CUG</u> CUG <u>CUG</u>	100
	CUG CUG <u>CUG</u> <u>CUG</u> CUG CUG CUG	101
	<u>CUG</u> CUG CUG CUG CUG CUG <u>CUG</u>	102
	CUG CUG <u>CUG</u> CUG <u>CUG</u> CUG CUG	103
PS660	<u>CUG</u> <u>CUG</u> <u>CUG</u> <u>CUG</u> <u>CUG</u> <u>CUG</u> <u>CUG</u>	104
	CUG CUG <u>CUG</u> <u>CUG</u> <u>CUG</u> CUG CUG	105
	<u>CUG</u> CUG CUG CUG CUG CUG <u>CUG</u>	106
PS684	<u>CUG</u> <u>CUG</u> <u>CUG</u> <u>CUG</u> <u>CUG</u> <u>CUG</u> <u>CUG</u>	107
	<u>CUG</u> <u>CUG</u> <u>CUG</u> <u>CUG</u> <u>CUG</u> <u>CUG</u> <u>CUG</u> QQQQ	220
	<u>CUG</u> CUG <u>CUG</u> CUG <u>CUG</u> CUG CUG <u>CUG</u>	108
	<u>CUG</u> CUG <u>CUG</u> CUG <u>CUG</u> CUG CUG <u>CUG</u> QQQQ	221
	<u>CUG</u> <u>CUG</u> <u>CUG</u> <u>CUG</u> <u>CUG</u> <u>CUG</u> <u>CUG</u> <u>CUG</u>	109
	<u>CUG</u> CUG <u>CUG</u> <u>CUG</u> <u>CUG</u> <u>CUG</u> CUG CUG <u>CUG</u>	110
	<u>CUG</u> <u>CUG</u> <u>CUG</u> <u>CUG</u> <u>CUG</u> <u>CUG</u> <u>CUG</u> <u>CUG</u> <u>CUG</u>	111
	<u>CUG</u> CUG <u>CUG</u> <u>CUG</u> <u>CUG</u> <u>CUG</u> CUG CUG <u>CUG</u> <u>CUG</u>	112
	<u>CUG</u>	113
	<u>CUG</u> CUG <u>CUG</u> <u>CUG</u> <u>CUG</u> <u>CUG</u> CUG CUG <u>CUG</u> <u>CUG</u> <u>CUG</u>	114
	<u>CUG</u>	115
	<u>CUG</u> CUG <u>CUG</u>	116
	<u>CUG</u>	117

	<u>CUG</u> <u>CUG</u> <u>CUG</u> <u>CUG</u>	118
(GCG) n	<u>CGC</u> <u>CGC</u> <u>CGC</u> <u>CGC</u>	119
	<u>CGC</u> <u>CGC</u> <u>CGC</u> <u>CGC</u>	120
	<u>CGC</u> <u>CGC</u> <u>CGC</u> <u>CGC</u> <u>CGC</u>	121
	<u>CGC</u> <u>CGC</u> <u>CGC</u> <u>CGC</u> <u>CGC</u>	122
	<u>CGC</u> <u>CGC</u> <u>CGC</u> <u>CGC</u> <u>CGC</u> <u>CGC</u>	123
	<u>CGC</u> <u>CGC</u> <u>CGC</u> <u>CGC</u> <u>CGC</u> <u>CGC</u>	124
	<u>CGC</u> <u>CGC</u> <u>CGC</u> <u>CGC</u> <u>CGC</u> <u>CGC</u> <u>CGC</u>	125
	<u>CGC</u> <u>CGC</u> <u>CGC</u> <u>CGC</u> <u>CGC</u> <u>CGC</u> <u>CGC</u> <u>CGC</u>	126
	<u>CGC</u> <u>CGC</u> <u>CGC</u> <u>CGC</u> <u>CGC</u> <u>CGC</u> <u>CGC</u> <u>CGC</u> <u>CGC</u>	127
	<u>CGC</u> <u>CGC</u> <u>CGC</u> <u>CGC</u> <u>CGC</u> <u>CGC</u> <u>CGC</u> <u>CGC</u> <u>CGC</u>	128
	<u>CGC</u>	129
(CGG) n	<u>CGC</u>	130
	<u>CGC</u>	131
	<u>CGC</u>	132
	<u>CCG</u> <u>CCG</u> <u>CCG</u> <u>CCG</u>	133
	<u>CCG</u> <u>CCG</u> <u>CCG</u> <u>CCG</u>	134
	<u>CCG</u> <u>CCG</u> <u>CCG</u> <u>CCG</u> <u>CCG</u>	135
	<u>CCG</u> <u>CCG</u> <u>CCG</u> <u>CCG</u> <u>CCG</u>	136
	<u>CCG</u> <u>CCG</u> <u>CCG</u> <u>CCG</u> <u>CCG</u> <u>CCG</u>	137
	<u>CCG</u> <u>CCG</u> <u>CCG</u> <u>CCG</u> <u>CCG</u> <u>CCG</u> <u>CCG</u>	138
	<u>CCG</u> <u>CCG</u> <u>CCG</u> <u>CCG</u> <u>CCG</u> <u>CCG</u> <u>CCG</u> <u>CCG</u>	139
	<u>CCG</u> <u>CCG</u> <u>CCG</u> <u>CCG</u> <u>CCG</u> <u>CCG</u> <u>CCG</u> <u>CCG</u>	140

(GAA) n	<u>CCG</u> <u>CCG</u> <u>CCG</u> <u>CCG</u> <u>CCG</u> <u>CCG</u> <u>CCG</u> <u>CCG</u> <u>CCG</u>	141
	<u>CCG</u> <u>CCG</u> <u>CCG</u> <u>CCG</u> <u>CCG</u> <u>CCG</u> <u>CCG</u> <u>CCG</u> <u>CCG</u>	142
	<u>CCG</u> <u>CCG</u> <u>CCG</u> <u>CCG</u> <u>CCG</u> <u>CCG</u> <u>CCG</u> <u>CCG</u> <u>CCG</u>	143
	<u>CCG</u> <u>CCG</u> <u>CCG</u> <u>CCG</u> <u>CCG</u> <u>CCG</u> <u>CCG</u> <u>CCG</u> <u>CCG</u>	144
	<u>CCG</u> <u>CCG</u> <u>CCG</u> <u>CCG</u> <u>CCG</u> <u>CCG</u> <u>CCG</u> <u>CCG</u> <u>CCG</u>	145
	<u>CCG</u> <u>CCG</u> <u>CCG</u> <u>CCG</u> <u>CCG</u> <u>CCG</u> <u>CCG</u> <u>CCG</u> <u>CCG</u>	146
	<u>UUC</u> <u>UUC</u> <u>UUC</u> <u>UUC</u>	147
	<u>UUC</u> <u>UUC</u> <u>UUC</u> <u>UUC</u>	148
	<u>UUC</u> <u>UUC</u> <u>UUC</u> <u>UUC</u>	149
	<u>UUC</u> <u>UUC</u> <u>UUC</u> <u>UUC</u>	150
	<u>UUC</u> <u>UUC</u> <u>UUC</u> <u>UUC</u> <u>UUC</u> <u>UUC</u>	151
	<u>UUC</u> <u>UUC</u> <u>UUC</u> <u>UUC</u> <u>UUC</u> <u>UUC</u>	152
	<u>UUC</u> <u>UUC</u> <u>UUC</u> <u>UUC</u> <u>UUC</u> <u>UUC</u>	153
	<u>UUC</u> <u>UUC</u> <u>UUC</u> <u>UUC</u> <u>UUC</u> <u>UUC</u>	154
	<u>UUC</u> <u>UUC</u> <u>UUC</u> <u>UUC</u> <u>UUC</u> <u>UUC</u>	155
	<u>UUC</u> <u>UUC</u> <u>UUC</u> <u>UUC</u> <u>UUC</u> <u>UUC</u>	156
	<u>UUC</u> <u>UUC</u> <u>UUC</u> <u>UUC</u> <u>UUC</u> <u>UUC</u>	157
	<u>UUC</u> <u>UUC</u> <u>UUC</u> <u>UUC</u> <u>UUC</u> <u>UUC</u>	158
	<u>UUC</u> <u>UUC</u> <u>UUC</u> <u>UUC</u> <u>UUC</u> <u>UUC</u>	159
	<u>UUC</u> <u>UUC</u> <u>UUC</u> <u>UUC</u> <u>UUC</u> <u>UUC</u>	160
	<u>UUC</u> <u>UUC</u> <u>UUC</u> <u>UUC</u> <u>UUC</u> <u>UUC</u>	161
	<u>UUC</u> <u>UUC</u> <u>UUC</u> <u>UUC</u> <u>UUC</u> <u>UUC</u>	162
	<u>UUC</u> <u>UUC</u> <u>UUC</u> <u>UUC</u> <u>UUC</u> <u>UUC</u>	163

	<u>UUC</u> <u>UUC</u> <u>UUC</u>	164
	<u>UUC</u> <u>UUC</u> <u>UUC</u>	165
	<u>UUC</u> <u>UUC</u> <u>UUC</u> <u>UUC</u>	166
	<u>UUC</u> <u>UUC</u> <u>UUC</u> <u>UUC</u>	167
(GCC) n	<u>GGC</u> <u>GGC</u> <u>GGC</u> <u>GGC</u>	168
	<u>GGC</u> <u>GGC</u> <u>GGC</u> <u>GGC</u> <u>GGC</u>	169
	<u>GGC</u> <u>GGC</u> <u>GGC</u> <u>GGC</u> <u>GGC</u> <u>GGC</u>	170
	<u>GGC</u> <u>GGC</u> <u>GGC</u> <u>GGC</u> <u>GGC</u> <u>GGC</u> <u>GGC</u>	171
	<u>GGC</u> <u>GGC</u> <u>GGC</u> <u>GGC</u> <u>GGC</u> <u>GGC</u> <u>GGC</u>	172
	<u>GGC</u> <u>GGC</u> <u>GGC</u> <u>GGC</u> <u>GGC</u> <u>GGC</u> <u>GGC</u>	173
	<u>GGC</u> <u>GGC</u> <u>GGC</u> <u>GGC</u> <u>GGC</u> <u>GGC</u> <u>GGC</u>	174
	<u>GGC</u> <u>GGC</u> <u>GGC</u> <u>GGC</u> <u>GGC</u> <u>GGC</u> <u>GGC</u>	175
	<u>GGC</u> <u>GGC</u> <u>GGC</u> <u>GGC</u> <u>GGC</u> <u>GGC</u> <u>GGC</u> <u>GGC</u>	176
	<u>GGC</u> <u>GGC</u> <u>GGC</u> <u>GGC</u> <u>GGC</u> <u>GGC</u> <u>GGC</u> <u>GGC</u> <u>GGC</u>	177
(CCG) n	<u>CGG</u> <u>CGG</u> <u>CGG</u> <u>CGG</u>	178
	<u>CGG</u> <u>CGG</u> <u>CGG</u> <u>CGG</u> <u>CGG</u>	179
	<u>CGG</u> <u>CGG</u> <u>CGG</u> <u>CGG</u> <u>CGG</u> <u>CGG</u>	180
	<u>CGG</u> <u>CGG</u> <u>CGG</u> <u>CGG</u> <u>CGG</u> <u>CGG</u> <u>CGG</u>	181
	<u>CGG</u> <u>CGG</u> <u>CGG</u> <u>CGG</u> <u>CGG</u> <u>CGG</u> <u>CGG</u> <u>CGG</u>	182
	<u>CGG</u> <u>CGG</u> <u>CGG</u> <u>CGG</u> <u>CGG</u> <u>CGG</u> <u>CGG</u> <u>CGG</u> <u>CGG</u>	183
	<u>CGG</u> <u>CGG</u> <u>CGG</u> <u>CGG</u> <u>CGG</u> <u>CGG</u> <u>CGG</u> <u>CGG</u> <u>CGG</u>	184

(AUUCU) n	<u>AGAAU</u> <u>AGAAU</u> <u>AGAAU</u>	185
	<u>AGAAU</u> <u>AGAAU</u> <u>AGAAU</u> <u>AGAAU</u>	186
	<u>AGAAU</u> AGAAU AGAAU <u>AGAAU</u>	187
	<u>AGAAU</u> AGAAU <u>AGAAU</u> AGAAU	188
	<u>AGAAU</u> AGAAU <u>AGAAU</u> AGAAU	189
	<u>AGAAU</u> <u>AGAAU</u> <u>AGAAU</u> AGAAU <u>AGAAU</u>	190
	<u>AGAAU</u> <u>AGAAU</u> <u>AGAAU</u> AGAAU <u>AGAAU</u> <u>AGAAU</u>	191
	<u>AGAAU</u> <u>AGAAU</u> <u>AGAAU</u> AGAAU <u>AGAAU</u> AGAAU <u>AGAAU</u> <u>AGAAU</u>	192
(CCUG) n	<u>CAGG</u> <u>CAGG</u> <u>CAGG</u>	193
	<u>CAGG</u> <u>CAGG</u> <u>CAGG</u>	194
	<u>CAGG</u> <u>CAGG</u> <u>CAGG</u> <u>CAGG</u>	195
	<u>CAGG</u> <u>CAGG</u> <u>CAGG</u> <u>CAGG</u>	196
	<u>CAGG</u> <u>CAGG</u> <u>CAGG</u> <u>CAGG</u> <u>CAGG</u>	197
	<u>CAGG</u> <u>CAGG</u> <u>CAGG</u> <u>CAGG</u> <u>CAGG</u>	198
	<u>CAGG</u> <u>CAGG</u> <u>CAGG</u> CAGG <u>CAGG</u>	199
	<u>CAGG</u> <u>CAGG</u> <u>CAGG</u> CAGG <u>CAGG</u>	200
	<u>CAGG</u> <u>CAGG</u> <u>CAGG</u> <u>CAGG</u> <u>CAGG</u> <u>CAGG</u>	201
	<u>CAGG</u> <u>CAGG</u> <u>CAGG</u> <u>CAGG</u> <u>CAGG</u> CAGG	202
	<u>CAGG</u> <u>CAGG</u> <u>CAGG</u> <u>CAGG</u> <u>CAGG</u> <u>CAGG</u> <u>CAGG</u>	203
	<u>CAGG</u> <u>CAGG</u> <u>CAGG</u> <u>CAGG</u> <u>CAGG</u> <u>CAGG</u> CAGG	204
	<u>CAGG</u> <u>CAGG</u> <u>CAGG</u> <u>CAGG</u> <u>CAGG</u> <u>CAGG</u> CAGG <u>CAGG</u>	205
	<u>CAGG</u> <u>CAGG</u> <u>CAGG</u> <u>CAGG</u> <u>CAGG</u> <u>CAGG</u> CAGG <u>CAGG</u>	206
	<u>CAGG</u> <u>CAGG</u> <u>CAGG</u> <u>CAGG</u> <u>CAGG</u> <u>CAGG</u> CAGG <u>CAGG</u> <u>CAGG</u>	207

		CAGG CAGG CAGG CAGG CAGG CAGG CAGG CAGG CAGG CAGG	208
(GGGGCC) <sub>n</sub>	PS1252	GGCUCC GGCUC GGCUC	209
		GGCQCC GGCQCC GGCQCC	210
		GGCUCC GGCUC GGCUC	211
		GGCUCC GGCUC GGCUC GGCUC	212
		GGCQCC GGCQCC GGCQCC GGCQCC	213
		GGCICC GGCICC GGCICC GGCICC	214
		GGCCUC GGCCUC GGCCUC GGCCUC	215

### **Exemplos**

#### **EXEMPLO 1**

#### **Introdução**

[239] As características particulares de uma química escolhida de oligonucleotídeos anti-sentido (AON) pode, pelo menos em parte, aumentar a afinidade de ligação e estabilidade, aumentar a atividade, melhorar a segurança, e/ou reduzir o custo dos produtos, reduzindo o comprimento ou melhorando a síntese e/ou os procedimentos de purificação. Este exemplo descreve a análise comparativa da atividade dos AONs concebidos para dirigir a repetição expandia (CAG)<sub>n</sub> em transcritos HTT em fibroblastos de DH *in vitro*, e inclui AONs ou com 5-metilcitosinas (XYG)<sub>7</sub>, em que X é 5-metilcitosina e Y=U, sendo também identificado como SEQ ID NO:90 (e derivado a partir da SEQ ID NO:2), ou 5-

metiluracilas (XYG)<sub>7</sub>, na qual X=C e Y = 5-metiluracila sendo também identificado como SEQ ID NO:97 (e derivada a partir da SEQ ID NO:3).

**Materiais e método**

[240] **Cultura celular.** Os fibroblastos derivados do paciente DH (GM04022) (adquirido a partir de Coriell Cell Repositories, Camden, EUA) foram cultivados a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> em Meio Essencial Mínimo (MEM) (Gibco Invitrogen, Carlsbad, EUA) com 15% de Soro Fetal Bovino (FBS) inativado pelo calor (Clontech, Palo Alto EUA), 1% de Glutamax (Gibco) e 100 U/ml de penicilina/estreptomicina (P/S) (Gibco).

[241] **Oligonucleotídeos.** Os AONs foram 2'-O-metil fosforotioato completamente modificado: PS659; (XYG)<sub>7</sub>, em que X é 5-metilcitosina e Y=U, sendo também identificado como SEQ ID NO:90 (e derivada a partir da SEQ ID NO:2), e PS661; (XYG)<sub>7</sub>, na qual X=C e Y = 5-metiluracila, sendo também identificado como SEQ ID NO:97 (e derivada a partir da SEQ ID NO:3).

[242] **Transfecção.** As células foram transfectadas com AONs complexados com PEI (2 µL por µg de AON, em 0,15 M de NaCl). O complexo AON-PEI foi adicionado em meio MEM com FBS a 5% para células a uma concentração final de AON, variando entre 0,5 a 200 Nm. O meio fresco foi completado após quatro horas, e depois de 24 horas o RNA foi isolado.

[243] **Isolamento do RNA.** O RNA a partir de células

em cultura foi isolado usando o Mini Kit de RNA Total Aurum (Bio-Rad, Hercules, CA), de acordo com o protocolo do fabricante.

[244] **RT-PCR e análise Lab-on-a-chip.**

Aproximadamente 200 ng de RNA foi submetida a síntese de DNAc com hexâmeros aleatórios, utilizando o sistema de síntese de primeira cadeia SuperScript (Invitrogen) em um volume total de 20 µL. O PCR foi realizado com os primers para HTT (em toda a CAG) e β-actina. O programa de PCR começou com uma desnaturação inicial de 4 min a 95°C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos de desnaturação a 94°C, 30 s de reconhecimento a 60°C, 45 s de alongamento a 72°C, após o qual uma etapa final de alongamento foi realizada a 72°C durante 7 min. Lab-on-a-chip foi realizada no Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanha), utilizando o Kit Agilent DNA 1000. Os níveis de expressão foram normalizados para níveis de β-actina, e em relação aos níveis de transcrição sem transfecção. Os seguintes primers foram utilizados:

HTT dianteiro; 5'-ATGGCGACCCTGGAAAAGCTGAT-3' (SEQ ID NO:70)

HTT reverso: 5'-TGAGGCAGCAGCGGCTG-3' (SEQ ID NO:71)

β-actina dianteira; 5'-GGACTTCGAGC AAGAGATGG-3' (SEQ ID NO:72)

β-actina reversa; 5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3' (SEQ ID

NO:73)

### **Resultados**

[245] Ambos PS659 (SEQ ID NO:90 derivada da SEQ ID NO:2), e PS661 (SEQ ID NO:97 derivada da SEQ ID NO:3) foram altamente eficazes e reduziram as transcrições HTT em fibroblastos DH de maneira dose-dependente (**Figura 1a, b**). Ambos AONs também mostraram uma preferência para o alelo com as repetições CAG expandidas. PS659 (SEQ ID NO:90 derivada da SEQ ID NO:2) foi mais eficaz e mais alelo específico em concentrações mais baixas (efeito mais forte em 5 nM) (**1a**) do que PS661 (SEQ ID NO:97 derivada da SEQ ID NO:3) (efeito mais forte em 20 nM) (**1b**).

### **EXEMPLO 2.**

#### **Introdução**

[246] PS659 (XYG)<sub>7</sub>, em que X é 5-metilcitosina e Y=U, também identificado como SEQ ID NO:90 (derivada a partir da SEQ ID NO:2), foi selecionado a partir de estudos *in vitro*, como o candidato mais eficiente e seguro. Este exemplo descreve a sua atividade em um modelo de rato transgênico DH após uma série de injeções intraventriculares diretas.

#### **Materiais e métodos**

[247] **Animais.** Os ratos transgênicos DH carregam um fragmento de cDNA de Huntington truncado com 51 repetições CAG sob o controle do promotor de rato nativo Huntington. O produto do gene expresso é de cerca de 75 kDa, correspondendo

a 22% do Huntington de comprimento total (posição de cDNA 324 a 2321, posição de aminoácido 1 a 709/825, correspondente ao éxon 1 a 16), sob o controle de 886 pb do promotor de rato de Huntington (von Hörsten S. et al.). Todos os experimentos com animais foram aprovados pelos Comitês de Cuidado Animal Institucional e Uso da Universidade de Maastricht, Maastricht.

[248] **Oligonucleotídeos.** PS659 (XYG) <sub>7</sub>, em que X é 5-metilcitosina e Y=U também identificado como SEQ ID NO:90 (derivada a partir da SEQ ID NO:2), é um AON 2'-O-metil fosforotioato completamente modificado.

[249] **Tratamento *in vivo*.** Os ratos transgênicos HD receberam 15 vezes de uma injeção intraventricular em uma dose final de 200 µg PS659, também identificada como SEQ ID NO: 90 (derivada a partir da SEQ ID NO:2) ao longo de 18 semanas. Os ratos de controle DH receberam apenas o veículo. Os ratos foram sacrificados uma semana após a injeção final.

[250] **Isolamento do RNA.** O RNA a partir do tecido do cérebro foi isolado utilizando reagente RNA-Bee (Teste Tel, Inc.). Em resumo, as amostras de tecido foram homogeneizadas em tubos de grânulos verdes MagNA Lyser (Roche), adicionando-se RNA-Bee (50 mg de tecido/mL de RNA-Bee) e homogeneizando utilizando um instrumento MagNA Lyser (Roche). O lisado foi transferido para um tubo novo, clorofórmio (SIGMA) foi adicionado (0,2 ml por ml de RNA-

Bee), misturado, incubado em gelo durante 5 minutos e centrifugado a 13.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. A fase aquosa superior foi coletada e um volume igual de isopropanol (SIGMA) foi adicionado, seguido por um período de incubação de 1 hora a 4°C e centrifugação (13.000 rpm, 15 min, 4°C). O precipitado de RNA foi lavado com 70% (v/v) de etanol (BioSolve), seco ao ar e dissolvido em MilliQ.

[251] **Análise quantitativa por RT-PCR.** Cerca de 200 ng foi submetida à síntese de DNAc com hexâmeros aleatórios, utilizando o sistema de síntese de primeira cadeia Superscript (Invitrogen) em um volume total de 20 µl. 3 µl de preparação de diluição cDNA 1/40 foi subsequentemente utilizada em análise quantitativa de PCR de acordo com os procedimentos padrão, na presença de iQ™ SYBRO® Green Supermix (Bio-Rad). Os primers de PCR quantitativos foram concebidos com base na informação da sequência de base de dados do NCBI. A identidade do produto foi confirmada por sequenciação de DNA. O sinal para Rab2 e YWHAZ foi utilizado para normalização. Foram utilizados os seguintes primers:

Rat Htt-F; 5'- CGCCGCCTCCTCAGCTTC -3' (SEQ ID NO: 74)

Rat Htt-R; 5'- GAGAGTTCCCTCTTGGTCGGTGC -3' (SEQ ID NO: 75)

Rab2-F; 5'- TGGGAAACAGATAAAACTCCAGA-3' (SEQ ID NO: 76)

Rab2-R; 5'- AATATGACCTTGTGATAGAACGAAAG-3' (SEQ ID NO: 77)

YWHAZ-F; 5'- AAATGAGCTGGTGCAGAAGG-3' (SEQ ID NO: 78)

YWHAZ -R; 5'- GGCTGCCATGTCATCGTAT -3' (SEQ ID NO: 79)

## Resultados

[252] PS659 (também identificado como SEQ ID NO: 90 ou derivado a partir da SEQ ID NO:2) reduziu os níveis de transcritos transgênicos HTT no córtex (**Figura 2a**), hipocampo (**Figura 2b**), bulbo olfatório (**Figura 2c**), assim como no tálamo (**Figura 3d**) quando comparados com ratos tratados com solução salina. Estes resultados demonstram que PS659 (também identificado como SEQ ID NO: 90 ou derivado a partir da SEQ ID NO:2) é eficaz *in vivo* após a injeção direta intraventricular.

## Lista de referências

- Aartsma-Rus et al., Hum Mol Gen 2003; 12(8):907-14.
- Arai K et al. Bioorg. Med. Chem. 2011, 21, 6285
- Bauer et al., 2009; J Neurochem. 110:1737-65
- Braida C., et al, Human Molecular Genetics, 2010, vol 9: 1399-1412
- Bruno et al., Adv Drug Deliv Rev. 2011;63(13):1210-26
- Diebold et al., 2006, Eur J Immunol; 36(12): 3256-67
- Evers et al. PLoS ONE 2011, 6 (9) e24308
- Huang et al., 1998 Somat Cell Molec Gen 24:217-33;
- Krieg AM. et al., Nature 1995; 374: 546-549.
- Krieg, A. M., Curr. Opin. Immunol. 2000; 12: 35-43.
- Kumar L, Pharm. Technol. 2008, 3, 128.

- Muchowski et al., 2002 PNAS 99: 727-32
- Mulders et al. PNAS 2009 106(33); p13915-20
- Peacock H et al. J. Am. Chem. Soc. 2011, 133, 9200
- Popovic PJ. et al. J of Immunol 2006; 177: 8701-8707.
- Roon-Mom et al., 2002 Mol Brain Res 109: 1-10
- Ropper AH. and Brown RH., 2005 Principles of neurology.  
8th Ed. New York: McGraw-Hill, 2005.
- Ross et al., 2011; Lancet Neurol. 10:83-98
- Rigo, F, et al, 2012, Nature chemical biology, 8: 555-561.
- Steffan et al., 2000 PNAS 97: 6763-68
- von Hörsten S. et al. Hum Mol Genet. 2003;12(6):617-24
- Wagner, H., Adv. Immunol. 1999; 73: 329-368.
- Yu RZ., Anal Biochem 2002; 304: 19-25.

**REIVINDICAÇÕES**

1. Oligonucleotídeo compreendendo um resíduo de nucleotídeo de 2'-O-metil RNA, possuindo uma cadeia principal em que pelo menos uma porção do fosfato é substituída por uma porção de fosforotioato, **caracterizado pelo** fato de que possui uma cadeia principal em que todas as porções fosfato são substituídas por porções fosforotioato e tem uma sequência base consistindo em (XYG)<sub>7</sub>, em que cada X é 5-metilcitosina e cada Y é uracila, o referido oligonucleotídeo tendo uma sequência de bases que consiste em SEQ ID NO: 90.

2. Oligonucleotídeo, de acordo com reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que o referido oligonucleotídeo é um oligonucleotídeo de cadeia simples.

3. Composição **caracterizada pelo** fato de compreender um oligonucleotídeo conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 ou 2.

4. Composição, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizada pelo** fato de compreender pelo menos um excipiente que pode ajudar ainda mais a melhorar o direcionamento e/ou entrega da referida composição e/ou o referido oligonucleotídeo para um tecido e/ou célula e/ou em um tecido e/ou célula.

5. Uso de um oligonucleotídeo conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 ou 2, ou uma composição

conforme definida em qualquer uma das reivindicações 3 ou 4 **caracterizado por** ser para a fabricação de um medicamento para prevenção, tratamento e/ou retardo de um distúrbio genético associado à instabilidade de repetição do elemento cis humano.

6. Uso, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado por** que o referido distúrbio genético associado à instabilidade de repetição do elemento cis humano é selecionado da lista que consiste na doença de Huntington, ataxia espinocerebelar (SCA), atrofia muscular espinhal e bulbar (SBMA) e atrofia dentatorubro-palidoluisiana (DRPLA).

Fig. 1a

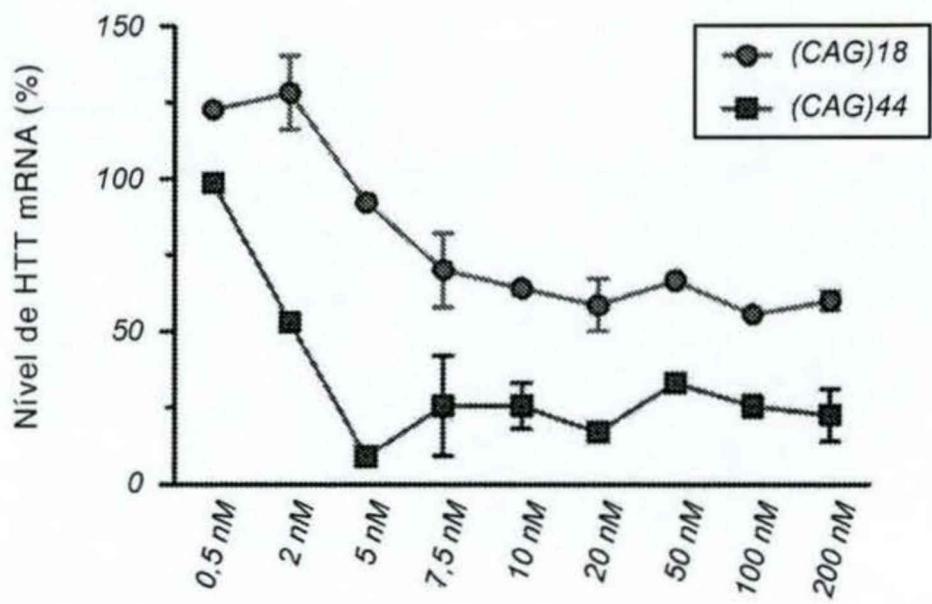


Fig. 1b

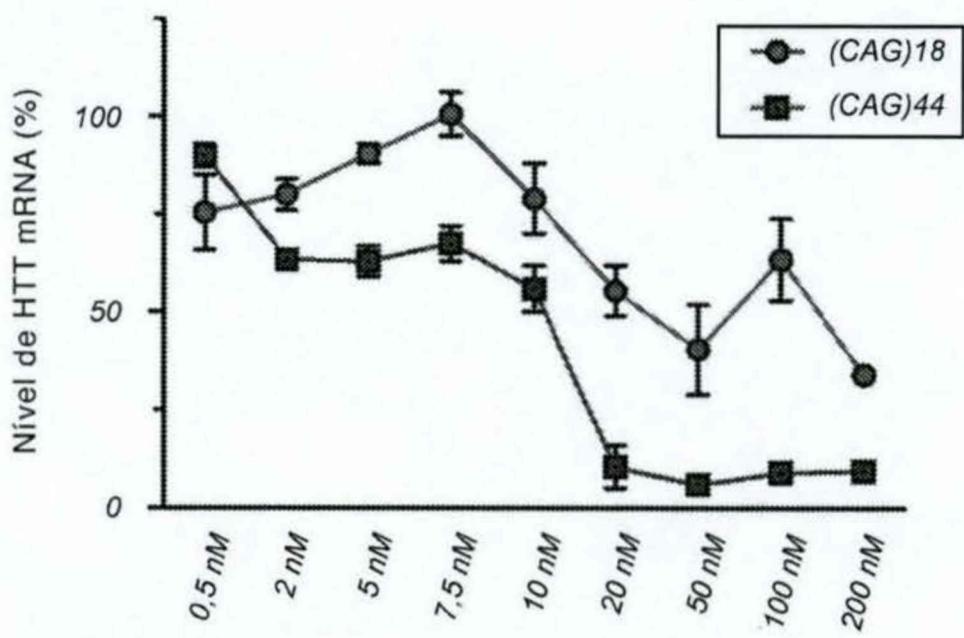


Fig. 2a

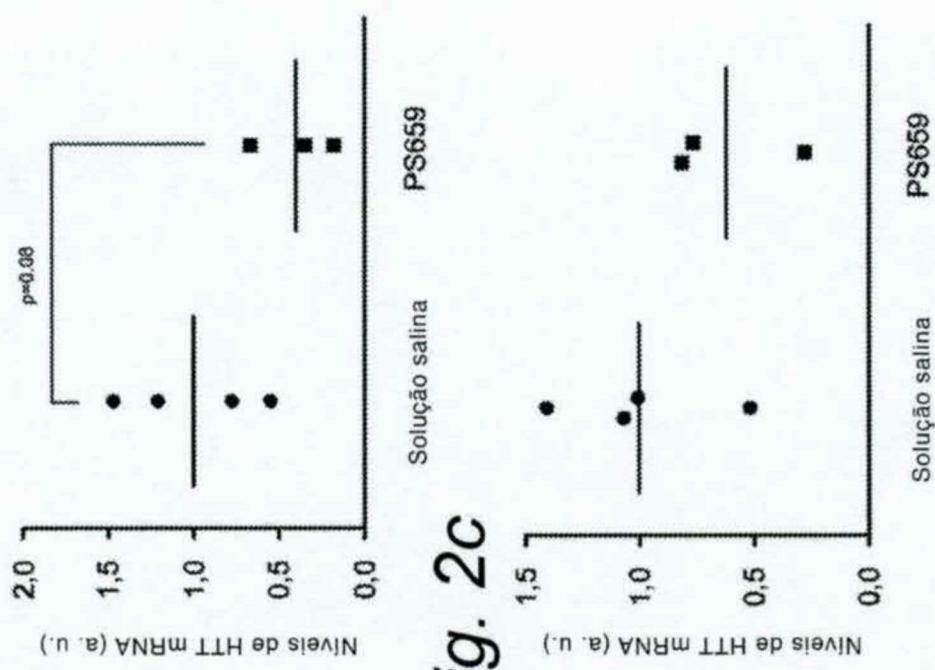


Fig. 2b

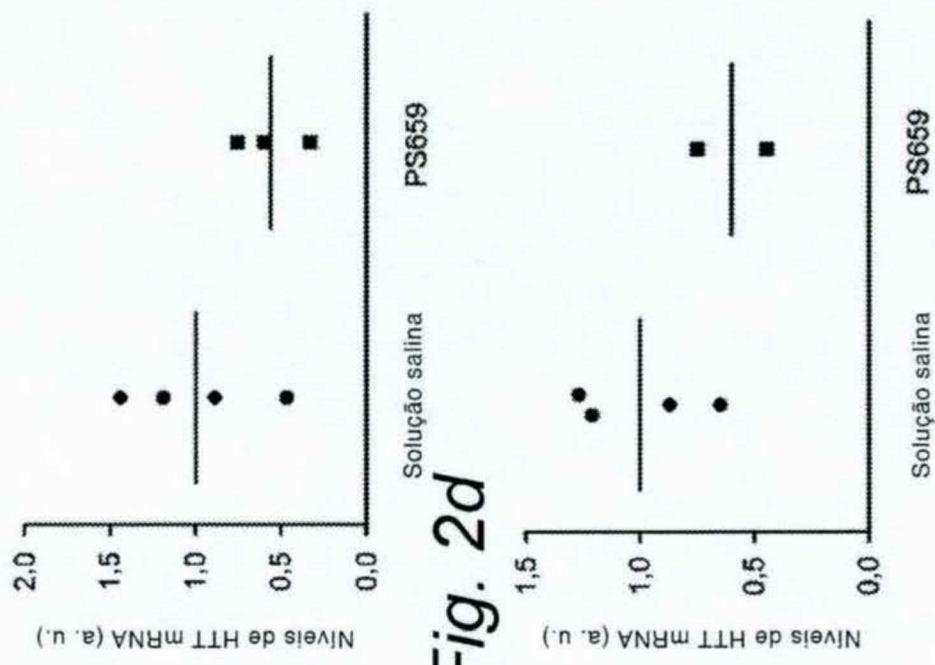


Fig. 2c

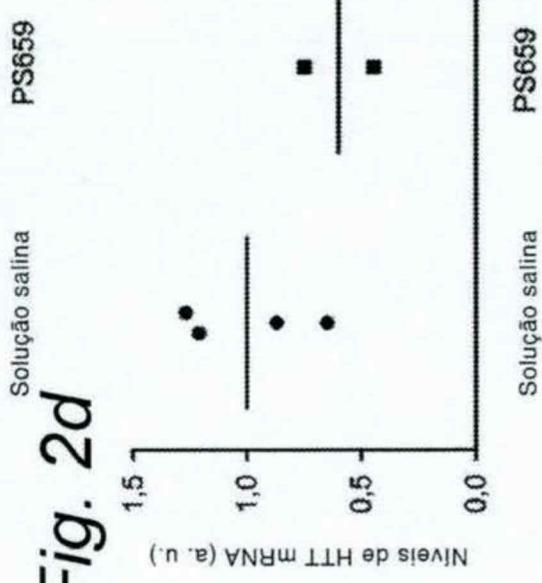


Fig. 2d