

(11) Número de Publicação: **PT 1470144 E**

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(51) Classificação Internacional:

C07H 21/00 (2006.01) **C12N 15/09** (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01) **A61K 31/712**
(2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) **A61P 1/00** (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01) **A61P 3/00** (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01) **A61P 9/00** (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01) **A61P 29/00** (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01) **A61P 31/12** (2006.01)
A61P 31/18 (2006.01) **A61P 31/20** (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) **C07H 21/02** (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01) **C12Q 1/68** (2006.01)
C12Q 1/70 (2006.01) **A61K 38/00** (2006.01)

(22) Data de pedido: **2003.01.31**

(30) Prioridade(s): **2002.02.01 US 352873 P**

(43) Data de publicação do pedido: **2004.10.27**

(45) Data e BPI da concessão: **2008.12.03**
028/2009

(73) Titular(es):

MCGILL UNIVERSITY
845 SHERBROOKE STREET WEST MONTREAL,
QUÉBÉC H3A 2T5 CA

(72) Inventor(es):

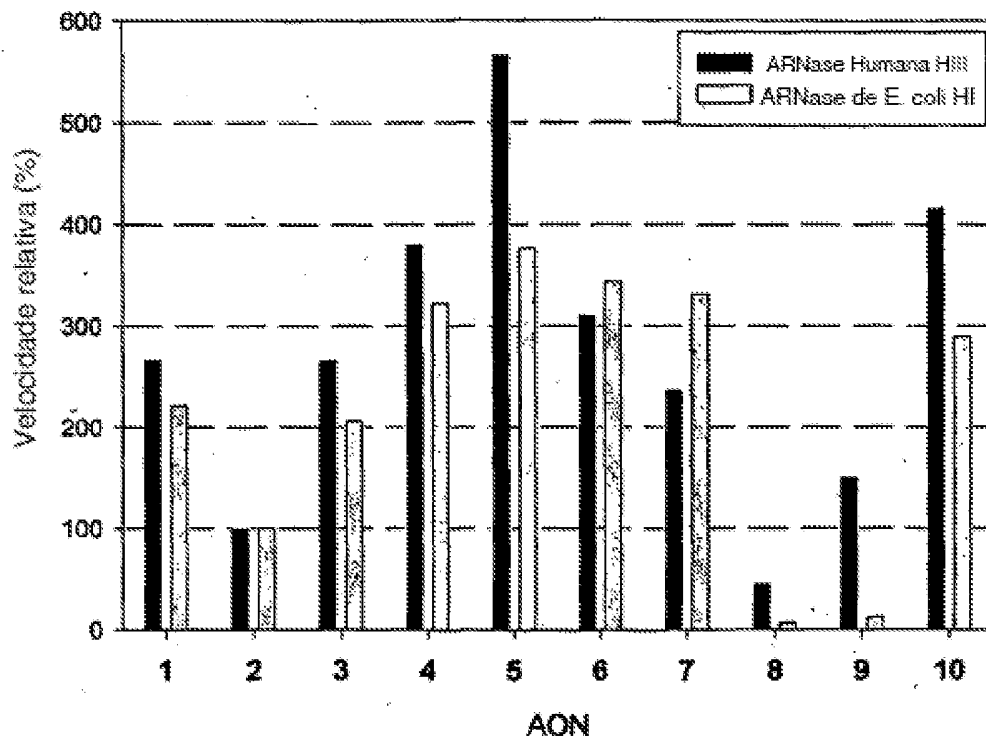
MASAD J. DAMHA CA
MICHAEL A. PARNIAK US

(74) Mandatário:

JOSÉ EDUARDO LOPES VIEIRA DE SAMPAIO
R DO SALITRE 195 RC DTO 1250-199 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **OLIGONUCLEÓTIDOS INCLUINDO SEGMENTOS ALTERNANTES E AS SUAS UTILIZAÇÕES**

(57) Resumo:

RESUMO

A invenção diz respeito a oligonucleótidos contendo segmentos alternativos de nucleósidos com açúcares modificados e 2'-deoxinucleótidos, bem como às suas utilizações. A invenção diz também respeito a oligonucleótidos contendo segmentos alternantes de nucleótidos com os açúcares modificados e 2'-deoxinucleótidos, bem como a utilizações destes. Incluem-se nessas utilizações a preparação de oligonucleótidos de sentido reverso e a sua utilização para impedir ou para esvaziar as funções do ácido nucleico de interesse, tal como um ARN, num sistema. Um oligonucleótido da invenção é portanto útil em métodos e para utilizações terapêuticas e analíticas e diagnósticas bem como a título de componentes de composições e de embalagens comerciais correspondentes a tais métodos e utilizações.

DESCRIÇÃO

"OLIGONUCLEÓTIDOS INCLUINDO SEGMENTOS ALTERNANTES E AS SUAS UTILIZAÇÕES"

DOMÍNIO DA INVENÇÃO

A invenção diz respeito a oligonucleósidos e a oligonucleótidos bem como às suas utilizações, e em especial diz respeito a oligonucleósidos e a oligonucleótidos modificados e às suas utilizações.

ESTADO DOS CONHECIMENTOS

Os oligonucleótidos são utilizados para uma série de aplicações biotecnológicas, com base na sua capacidade para conferir especificidade, atenta a composição da sua sequência. Atenta, por exemplo, a sua capacidade para serem designados para alvejar uma molécula que codifique para uma proteína, tal como ARN, uma utilização específica de oligonucleótidos é na tecnologia de sentido reverso.

Oligonucleótidos de sentido reverso (AON)

Uma vez que o substrato natural da ARNase H é um heteroduplex de ADN/ARN, tem sido utilizado ADN para a tecnologia de sentido reverso. No entanto, como as nucleases do soro e intracelulares degradam rapidamente os AON com ligações fosfodiéster (PDE), os AON constituídos

por ADN-PDE têm uma utilidade limitada nestes sistemas. Os ADN com ligações fosforotioato (AND-PS) podem induzir a degradação por ARNase H do ARN alvo, e são resistentes à degradação por nucleases do soro e celulares, mas no entanto, formam duplexes mais fracos com o ARN alvo, em comparação com o ADN-PDE.

ARNase H

A ARNase H degrada selectivamente a cadeia de ARN de um heteroduplex de ADN/ARN (Hausen, P.; Stein, H. Eur. J. Biochem. 1970, **14**, 279). Estudos com extractos de células eucariotas contendo ARNase H sugerem que os enzimas de procariotas e de eucariotas exibem propriedades de clivagem de ARN semelhantes (Monia *et al.* J. Biol. Chem. 1993, **268**, 14514; Crooke *et al.* Biochem J. 1995, **312**, 599; Lima, W.F.; Crooke, S.T. Biochemistry 1997, **36**, 390). Crê-se que a ARNase H1 de *E. coli* se ligue à ranhura menor da hélice dupla do ADN/ARN e clive o ARN por actividades tanto de endonuclease como de exonuclease progressiva 3'-para-5' (Nakamura, H. *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1991, **88**, 11535; Fedoroff, O.Y. *et al.*, J. Mol. Biol. 1993, **233**, 509). A eficiência da degradação pela ARNase H evidencia uma dependência mínima da sequência e, tal como se menciona acima, é bastante sensível a alterações químicas no oligonucleótido de sentido reverso.

Existe portanto uma necessidade de oligonucleótidos melhorados, para fazer face a uma ou mais das limitações que se anotaram acima.

No WO 99/67.378 descrevem-se oligonucleótidos com modificações uniformes do açúcar construídos a partir de arabinonucleótidos ou resíduos modificados de arabinonucleótidos.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

De acordo com um primeiro aspecto, a invenção proporciona um oligonucleósido que inclua um primeiro e um segundo segmentos alternantes, em que o primeiro segmento inclua pelo menos um arabinonucleósido, e em que o segundo segmento inclua pelo menos um 2'-desoxiribonucleósido. O oligonucleósido inclui pelo menos 2 de cada um dos primeiro e segundo segmentos incluindo portanto pelos menos 4 segmentos alternantes.

Numa concretização, o oligonucleósido inclui uma ligação internucleósidos que inclui um fosfato, sendo portanto um oligonucleótido. Em concretizações os arabinonucleósidos e/ou 2'-desoxi-ribonucleósidos incluem um fosfato, sendo portanto nucleótidos e/ou 2'-desoxi-ribonucleótidos com modificações do açúcar.

Numa concretização, a invenção proporciona um oligonucleótido que inclui segmentos ou unidades alterantes de arabinonucleótidos e 2'-desoxi-ribonucleótidos, em que os referidos segmentos ou unidades incluem cada um deles independentemente pelo menos um arabinonucleótido ou um 2'-desoxi-ribonucleótido, respectivamente. Numa concretização, o oligonucleótido inclui pelo menos 2 segmentos de

arabinonucleótido e 2 segmentos de 2'-desoxi-ribonucleótido, contendo portanto pelo menos 4 das unidades alternantes.

Numa concretização, os arabino-oligonucleótidos são capazes de adoptar uma conformação semelhante à do ADN.

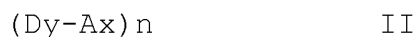
Numa concretização, os segmentos incluem cada um deles entre cerca de 1 e cerca de 6 arabinonucleótidos ou 2'-desoxi-ribonucleótidos. Noutras concretizações adicionais, os segmentos incluem independentemente entre cerca de 2 e cerca de 5 ou entre cerca de 3 e cerca de 4 arabinonucleótidos ou 2'-desoxi-ribonucleótidos. Numa concretização adicional, os segmentos incluem, cada um deles independentemente cerca de 3 arabinonucleótidos ou 2'-desoxi-ribonucleótidos.

Numa concretização, o oligonucleótido mencionado acima tem uma estrutura seleccionada de entre o conjunto constituído por:

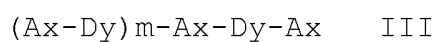
a)



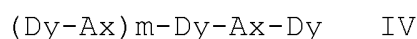
b)



c)



d)



em que cada um de entre m , x e y seja independentemente um inteiro maior ou igual a 1, n seja um inteiro maior ou igual a 2, A seja um arabinonucleótido e D seja um 2'-desoxi-ribonucleótido.

Numa concretização, o arabinonucleótido mencionado acima inclui um substituinte 2' seleccionado de entre o conjunto constituído pelos grupos fluoro, hidroxilo, amino, ciano, azido, $-\text{CH}=\text{CH}_2$, $-\text{C}\equiv\text{CH}$, alquilo, alquilo funcionalizado, alcoxilo e alcoxilo funcionalizado. Numa concretização, o grupo alquilo é um grupo alquilo inferior. Numa concretização, o grupo alquilo inferior é seleccionado de entre o conjunto constituído pelos grupos metilo, etilo e propilo. Numa concretização, o grupo alquilo funcionalizado é seleccionado de entre o conjunto constituído pelos grupos metilamino, etilamino e propilamino. Numa concretização, o grupo metoxilo é seleccionado de entre o conjunto constituído pelos grupos metiloxilo, etoxilo e propoxilo. Numa concretização, o grupo alcoxilo funcionalizado é $-\text{O}(\text{CH}_2)_q-\text{R}$, em que $q=2, 3$ ou 4 e $-\text{R}$ é seleccionado de entre o conjunto constituído pelos grupos $-\text{NH}_2$, $-\text{OCH}_3$, e $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$.

Numa concretização, o substituinte em 2' é fluoro e o arabinonucleótido é um 2'-fluoroarabinonucleótido (2'F-ANA; também conhecido sob a designação abreviada de "FANA").

Numa concretização, o oligonucleótido mencionado acima inclui uma ou mais ligações internucleótido seleccionadas de entre o conjunto constituído por:

- a) fosfodiéster;
- b) fosfotriéster;
- c) fosforotioato;
- d) fosforoditioato;
- e) Rp-fosforotioato;
- f) Sp-fosforotioato;
- g) boranofosfato;
- h) 3'-tioformacetal
- i) metileno (metilimino);
- j) amida;
- k) metilfosfonato;
- l) fosforamidato (5'P-N3'); e
- m) qualquer combinação de (a) a (l).

Numa concretização, o oligonucleótido mencionado acima é constituído por cerca de 30 ou menos nucleótidos, numa concretização adicional, por entre cerca de 8 e cerca de 25 nucleótidos, numa outra concretização ainda, por cerca de 18 nucleótidos.

Numa concretização, o oligonucleótido mencionado acima tem a estrutura I na qual $x=1$, $y=1$ e $n=9$, apresentando portanto a estrutura:

A-D-A-D-A-D-A-D-A-D-A-D-A-D-A-D-A-D.

Numa concretização, o oligonucleótido mencionado acima tem a estrutura II na qual $x=1$, $y=1$ e $n=9$, apresentando portanto a estrutura:

D-A-D-A-D-A-D-A-D-A-D-A-D-A-D-A-D-A.

Numa concretização, o oligonucleótido mencionado acima tem a estrutura III na qual $x=2$, $y=2$ e $m=3$, apresentando portanto a estrutura:

A-A-D-D-A-A-D-D-A-A-D-D-A-A-D-D-A-A.

Numa concretização, o oligonucleótido mencionado acima tem a estrutura IV na qual $x=2$, $y=2$ e $m=3$, apresentando portanto a estrutura:

D-D-A-A-D-D-A-A-D-D-A-A-D-D-A-A-D-D.

Numa concretização, o oligonucleótido mencionado acima tem a estrutura I na qual $x=3$, $y=3$ e $n=3$, apresentando portanto a estrutura:

A-A-A-D-D-D-A-A-A-D-D-D-A-A-A-D-D-D.

Numa concretização, o oligonucleótido mencionado acima tem a estrutura II $x=3$, $y=3$ e $n=3$, apresentando portanto a estrutura:

D-D-D-A-A-A-D-D-D-A-A-A-D-D-D-A-A-A.

Numa concretização, o oligonucleótido mencionado acima tem a estrutura III na qual $x=4$, $y=3$ e $m=1$, apresentando portanto a estrutura:

A-A-A-A-D-D-D-A-A-A-A-D-D-D-A-A-A-A.

Numa concretização, o oligonucleótido mencionado acima tem a estrutura IV na qual $x=4$, $y=3$ e $m=1$, apresentando portanto a estrutura:

D-D-D-D-A-A-A-D-D-D-D-A-A-A-D-D-D-D.

Numa concretização, o oligonucleótido mencionado contém ainda um terceiro segmento que inclui um nucleósido modificado, em que o terceiro segmento referido seja adjacente a (a) a extremidade 5' dos referidos primeiro e segundo segmentos alternantes, (b) a extremidade 3' dos

referidos primeiro e segundo segmentos alternantes, ou (c) tanto (a) como (b).

Numa concretização, o oligonucleótido mencionado contém ainda um terceiro segmento que inclui um nucleótido modificado, a) a extremidade 5' dos referidos primeiro e segundo segmentos alternantes, (b) a extremidade 3' dos referidos primeiro e segundo segmentos alternantes, ou (c) tanto (a) como (b). Numa concretização, o nucleótido modificado é um ribonucleótido modificado. Numa concretização, o ribonucleótido modificado inclui uma modificação na sua posição 2'. Numa concretização, a modificação em 2' é seleccionada de entre o conjunto constituído pelos grupos metoxilo, metoxietilo, fluoro e propilamino.

Numa concretização, o oligonucleótido mencionado acima é de sentido reverso em relação a um ARN alvo.

A invenção proporciona também um método de se impedir ou se diminuir a translação, a transcrição reversa e/ou a replicação de um ARN alvo num sistema, incluindo o método referido levar-se o ARN referido com o oligonucleótido mencionado acima. Numa concretização, o sistema é seleccionado de entre o conjunto constituído por uma célula, um tecido ou um sujeito. Numa concretização, a célula, o tecido ou o sujeito são uma célula, um tecido ou um sujeito mamíferos, numa concretização suplementar, serão uma célula, um tecido ou um sujeito humanos.

A invenção proporciona ainda um método de se induzir uma clivagem mediada por uma ARNase H, de um ARN alvo, num sistema, incluindo este método levar-se o ARN alvo a um contacto com o oligonucleótido mencionado acima. Numa concretização, a clivagem mediada por ARNase H é levada a cabo pela actividade de ARNase H associada com uma transcriptase reversa de um vírus. Numa concretização, o vírus é um vírus patogénico humano, numa concretização suplementar, o vírus é seleccionado de entre o conjunto constituído por HIV (por exemplo HIV-1 e HIV-2) e hepadnavírus (por exemplo o vírus da hepatite B). Numa concretização, a clivagem mediada por ARNase H é levada a cabo por uma actividade de ARNase H associada com um enzima ARNase H com origem procariótica ou eucariótica. Numa concretização, a ARNase H eucariótica é uma ARNase H de mamíferos, e numa concretização suplementar, uma ARNase H humana (por exemplo ARNase H1 e ARNase H2).

A invenção proporciona também um método de impedir ou de diminuir a translação, a transcrição reversa e/ou a replicação de um ARN alvo num sistema, e/ou para se detectar a presença de um ARN alvo num sistema e/ou para se validar um gene alvo num sistema, incluindo o método referido:

- a) se fazer contactar o ARN alvo com o oligonucleótido mencionado acima; e
- b) se permitir a clivagem do ARN alvo por parte do ARNase H.

A invenção proporciona também levar-se a cabo um processo seleccionado de entre o conjunto constituído por:

(a) se induzir uma clivagem mediada por ARNase de um ARN H alvo;

(b) se impedir ou se diminuir a translação de um ARN alvo;

(c) se impedir ou se diminuir a transcrição reversa de um ARN alvo;

(d) se impedir ou se diminuir a replicação de um ARN alvo;

(e) se detectar a presença de um ARN alvo;

(f) se validar um gene alvo correspondente a um ARN alvo; e

(g) qualquer combinação de (a) a (f);

incluindo o método referido levar-se o referido ARN alvo ao contacto com o oligonucleótido mencionado acima.

A invenção proporciona também um método de levar a cabo um processo seleccionado de entre o conjunto constituído por:

(a) se induzir uma clivagem mediada por ARNase de um ARN H alvo;

(b) se impedir ou se diminuir a translação de um ARN alvo;

(c) se impedir ou se diminuir a transcrição reversa de um ARN alvo;

(d) se impedir ou se diminuir a replicação de um ARN alvo;

(e) se detectar a presença de um ARN alvo;

(f) se validar um gene alvo correspondente a um ARN alvo; e

(g) qualquer combinação de (a) a (f);

incluindo o método referido introduzir-se o oligonucleótido no sistema referido.

A invenção diz ainda respeito à utilização do oligonucleótido mencionado acima para uma utilização medicamentosa ou em investigação. Nas concretizações, a utilização medicamentosa ou de investigação é seleccionada de entre o conjunto constituído por:

(a) se induzir uma clivagem mediada por ARNase de um ARN H alvo num sistema;

(b) se impedir ou se diminuir a translação de um ARN alvo num sistema;

(c) se impedir ou se diminuir a transcrição reversa de um ARN alvo num sistema;

(d) se impedir ou se diminuir a replicação de um ARN alvo num sistema;

(e) se detectar a presença de um ARN alvo num sistema;

(f) se validar um gene alvo correspondente a um ARN alvo num sistema;

(g) se impedir ou tratar uma doença relacionada com um ARN alvo num sistema; e

(h) qualquer combinação de (a) a (g).

A invenção proporciona também a utilização do oligonucleótido acima mencionado para a preparação de um medicamento. Numa concretização o medicamento destina-se a uma utilização seleccionada de entre o conjunto constituído por:

(a) se induzir uma clivagem mediada por ARNase de um ARN H alvo num sistema;

(b) se impedir ou se diminuir a translação de um ARN alvo num sistema;

(c) se impedir ou se diminuir a transcrição reversa de um ARN alvo num sistema;

(d) se impedir ou se diminuir a replicação de um ARN alvo num sistema;

(e) se detectar a presença de um ARN alvo num sistema;

(f) se validar um gene alvo correspondente a um ARN alvo num sistema;

(g) se impedir ou tratar uma doença relacionada com um ARN alvo num sistema; e

(h) qualquer combinação de (a) a (g).

A invenção proporciona ainda uma composição incluindo o oligonucleótido mencionado acima misturado com um veículo aceitável do ponto de vista farmacêutico. Numa concretização, a composição destina a uma utilização seleccionada de entre o conjunto constituído por:

(a) se induzir uma clivagem mediada por ARNase de um ARN H alvo num sistema;

(b) se impedir ou se diminuir a translação de um ARN alvo num sistema;

(c) se impedir ou se diminuir a transcrição reversa de um ARN alvo num sistema;

(d) se impedir ou se diminuir a replicação de um ARN alvo num sistema;

(e) se detectar a presença de um ARN alvo num sistema;

(f) se validar um gene alvo correspondente a um ARN alvo num sistema;

(g) se impedir ou tratar uma doença relacionada com um ARN alvo num sistema; e

(h) qualquer combinação de (a) a (g).

A invenção proporciona ainda uma embalagem comercial incluindo o oligonucleótido mencionado acima em conjunto com instruções para a sua utilização. Numa concretização, as instruções destinam-se a uma utilização seleccionada de entre o conjunto constituído por:

(a) se induzir uma clivagem mediada por ARNase de um ARN H alvo num sistema;

(b) se impedir ou se diminuir a translação de um ARN alvo num sistema;

(c) se impedir ou se diminuir a transcrição reversa de um ARN alvo num sistema;

(d) se impedir ou se diminuir a replicação de um ARN alvo num sistema;

(e) se detectar a presença de um ARN alvo num sistema;

(f) se validar um gene alvo correspondente a um ARN alvo num sistema;

(g) se impedir ou tratar uma doença relacionada com um ARN alvo num sistema; e

(h) qualquer combinação de (a) a (g).

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Figura 1. Estrutura de exemplos de determinadas componentes de nucleótido utilizadas em oligonucleótidos de sentido reverso (AON).

Figura 2. Clivagem mediada por ARNase HII humana, de um duplex de ARN com diversos oligonucleótidos de acordo com determinadas concretizações da invenção. **(A).** Análise por electroforese dos produtos de degradação de ARN alvo

marcado com ^{32}P . Incubaram-se os duplexes de AON com ARN 5'-[^{32}P] com ARNase HII humana, à temperatura ambiente, e tomaram-se alíquotas aos 0, 5, 10, e 20 minutos, submeteram-se a electroforese e visualizaram-se os produtos de reacção por auto-radiografia. **(B)**. Alvo residual de comprimento inteiro 5'-[^{32}P] em função do período reaccional. Os dados foram obtidos por análise densitométrica do auto-radiograma ilustrado em **A**.

Figura 3. Capacidade dos diversos AON listados na Tabela 1, de acordo com determinadas concretizações da invenção, para originarem a degradação por ARNase H do ARN alvo. Incubaram-se os duplexes de AON com ARN 5'-[^{32}P] com ARNase HII humana (barras negras) ou com ARNase HI de *E. coli* (barras ensombradas) durante 10 minutos à temperatura ambiente, e depois resolveram-se as misturas reaccionais por electroforese, visualizou-se por auto-radiografia, e quantificou-se por densitometria a perda de ARN intacto. Normalizaram-se os valores aos encontrados para o AON 2 de 2'F-ANA como 100 %.

DESCRIÇÃO PORMENORIZADA DA INVENÇÃO

A invenção diz respeito a oligonucleósidos incluindo segmentos alternantes ("altímeros") de arabinonucleósidos e de 2'-desoxi-ribonucleósidos. Numa concretização, o oligonucleósido ou os nucleósidos inclui um fosfato, sendo portanto respectivamente um oligonucleótido ou nucleótidos.

Numa concretização, estes "altímeros" incluem segmentos alterantes, de arabinonucleótidos (ANA) tais como o 2'F-ANA (ou FANA) e ADN. "Arabinonucleótido", tal como se utiliza neste documento, refere-se a um nucleótido incluindo um açúcar arabinofuranose.

Os resultados apresentados neste documento incluem estudos de (1) a afinidade de ligação do oligonucleótido ao ARN alvo e (2) a capacidade do oligonucleótido para originar a clivagem por uma ARNase H de um ARN alvo. Avaliaram-se tanto "altímeros" ligados por fosfodiéster como por fosfoditioato nos resultados descritos neste documento.

A invenção relaciona-se portanto com oligonucleótidos modificados que são utilizados em concretizações para impedir selectivamente a expressão genética de uma forma que seja específica da sequência. Numa concretização, a invenção diz respeito à inibição selectiva da biossíntese de proteínas por uma estratégia de sentido reverso utilizando pequenas cadeias constituídas por segmentos alternantes ou por unidades de ácidos nucleicos cujos açúcares foram modificados (por exemplo ácidos arabinonucleicos [por exemplo FANA]), e ADN. Cada segmento ou unidade pode conter um ou mais nucleótidos. Em concretizações a invenção diz respeito à utilização de oligonucleótidos modificados incluindo unidades alternantes de ácidos nucleicos com os seus açúcares modificados, e ADN, para se hibridizar ao seu complemento (numa concretização, ao seu complemento exacto) de ARN, tal como

ARN mensageiro celular, ARN viral, etc. Numa concretização complementar, a invenção diz respeito à utilização de tais oligonucleótidos modificados para se hibridizarem a e induzir a clivagem de ARN complementar, pela activação/indução da actividade de ARNase H.

Numa concretização, a invenção diz respeito a um oligonucleótido de sentido reverso (AON), quimeras construídas a partir de arabinonucleótidos e 2'-desoxi-ribonucleótidos, que em determinadas concretizações são modificadas, que são capazes de formar um duplex com uma sequência alvo de ARN. Numa concretização, os duplexes resultantes AON/ARN são substratos para a ARNase H, um enzima que reconhece um tal duplex e degrada a porção de ARN alvo. A clivagem de alvos de ARN mediada por ARNase H é considerada como sendo um mecanismo principal de acção dos oligonucleótidos de sentido reverso.

A invenção presente diz respeito ao facto inesperado e surpreendente de que as quimeras de sentido reverso construídas com unidades ou segmentos alternantes de arabinonucleótidos tais como ANA modificado (tal como 2'-desoxi-2'-fluoro-p-D-arabinonucleótidos [FANA]), e 2'-desoxi-ribonucleótidos (DNA), contendo cada unidade um ou mais desses resíduos, são superiores para originar uma actividade de ARNase H (por exemplo ARNase H eucariótica) *in vitro* em comparação com (a) a estrutura de ADN nativa, e (b) oligómeros FANA uniformemente modificados. De forma semelhante, a invenção presente mostra que a competência da ARNase H para os oligodesoxinucleótidos (tais como o ADN)

pode ser melhorada inserindo resíduos desses nucleótidos com açúcares modificados (por exemplo arabinonucleótidos [por exemplo FANA]) na cadeia de oligonucleótido. Os oligonucleótidos da invenção, contendo unidades ou segmentos alternantes de arabinonucleótido e desoxi-ribonucleótido são portanto úteis como agentes terapêuticos e/ou ferramentas para o estudo e o controlo da expressão específica de genes em células e em organismos, por exemplo para uma série de utilizações medicinais e de investigação. Os oligonucleótidos da invenção também são úteis para métodos de diagnóstico e de detecção para identificar a presença de um determinado ácido nucleico, com base na sua capacidade de alvejar o ácido nucleico.

"Nucleósido com o açúcar modificado" ou "nucleótido com o açúcar modificado" tal como se utilizam neste documento, referem respectivamente um nucleósido ou um nucleótido, que apresenta um açúcar cuja estrutura está modificada ou é diferente quando se compara com a espécie açúcar, respectivamente de um desoxi-ribonucleósido ou de um desoxi-ribonucleótido, ou de um ribonucleósido ou um ribonucleótido. Incluem-se nessas modificações sem que elas a estas se limitem, alterações de conformação do anel do açúcar, substituição ou adição de diferentes estruturas anelares, e a modificação (substituição, deleção ou adição) de quaisquer substituintes anelares do açúcar. Numa concretização adicional, um tal nucleósido ou nucleótido cujo açúcar é modificado pode adoptar uma conformação semelhante à do ADN. Uma "conformação semelhante à do ADN", tal como se utiliza neste documento, refere-se à estrutura

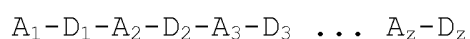
do açúcar do nucleósido ou nucleótido, e refere-se a uma conformação que se assemelha à conformação do resíduo no 2'-desoxi-ribonucleósido ou 2'-desoxi-ribonucleótido, isto é, uma em que o resíduo açúcar seja capaz de adoptar uma conformação C2'-endo (torsa a sul) e/ou 04'-endo (torsa a leste). Uma vez que os arabinonucleótidos conseguem adoptar essas conformações C2'-endo (torsa a sul) e/ou 04'-endo (torsa a leste), os ácidos arabinonucleicos e o ADN exibem preferências conformacionais semelhantes (Venkateswarlu, D. *et al.* J. Am. Chem. Soc. 1999, **121**, 5609; Trempe, J-F. *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 2001, **123**, 4896; Denisov, A.Y. *et al.*, Nucleic Acids Res. 2001, **29**, 4284), e portanto, nas concretizações, os ANA e os seus derivados (por exemplo FANA), são um tipo de nucleótido semelhante a ADN tal como definido neste documento. Incluem-se em outro nucleótidos semelhantes ao ADN, sem que a estes eles se limitem o alfa-L-ALN (Petersen, M. *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 2001; **123**; 7431) é s ácido ciclohexenonucleicos Wang, J. *et al.*, J. Am. Chem. Soc., 2000, **122**, 8595).

Em concretizações, as ligações internucleótido dos oligonucleótidos da invenção incluem mas não se limitam aos grupos fosfodiéster, fosfotriéster, fosforotioato (5'O-P(S)O-3'O-, 5'S-P(O)O-3'O-, e 5'O-P(O)O-3'S-), fosforoditioato, Rp-fosforotioato, Sp-fosforotioato, boranofosfato, metileno (metilimino), amida (3'-CH₂-CO-NH-5' e 3'-CH₂-NH-CO-5'), metilfosfonato, 3'-tioformacetal, (3'S-CH₂-O5'), amida (3'CH₂-C(O)NH-5'); fosforamidado (por exemplo 5'N-3'P), ou a quaisquer combinações destes. O substituinte em 2', por exemplo do açúcar arabinose no

resíduo ANA, inclui mas não se limita a fluoro, hidroxilo, amino, ciano, azido, $-\text{CH}=\text{CH}_2$, $-\text{C}\equiv\text{CH}$, alquilo (por exemplo alquilo inferior [por exemplo alquilo $\text{C}_1\text{-C}_9$] por exemplo metilo, etilo, propilo, etc.), alcoxilo ([por exemplo alcoxilo inferior, por exemplo alcoxilo $\text{C}_1\text{-C}_9$] por exemplo metoxilo, etoxilo, propoxilo, etc.) e alquilo funcionalizado (por exemplo alquilo inferior funcionalizado [por exemplo $2'\text{-CF}_3$]) e grupos alcoxilo (por exemplo grupos etilamino, propilamino e butilamino), e alcoxialquilo (por exemplo metoxietilo, etoxietilo, etc.). Numa concretização, o substituinte 2' do açúcar arabinose é fluoro e o derivado arabinonucleótido é o 2'F-ANA (ou FANA). Para além dos descritos acima, o açúcar arabinose também inclui o derivado carbocíclico ($4'\text{-CH}_2$) (por exemplo, FANA carbocíclico). Em concretizações, o nucleótido com açúcar modificado inclui outros esqueletos que originam actividade de RNase H (por exemplo, ácidos nucleicos aferrolhados alfa, ácidos ciclohexenonucleicos), ou quando as riboses não possuam o átomo de oxigénio electronegativo em 2' (por exemplo, 2'-alquil-D-ribose, 2'-SCH₃-D-ribose).

Os solicitantes demonstram neste documento que AON com esqueleto misto incluindo segmentos alternantes de um nucleótido com o seu açúcar modificado (por exemplo ANA [por exemplo FANA]) e ADN ("altímeros") são capazes de originar actividade de RNase H (por exemplo RNase HII humana) de degradação de ARN alvo. Alguns AON "altímeros", nomeadamente aqueles que possuem segmentos alternantes trinucleotídicos, são especialmente melhores para este objectivo.

Um oligonucleótido da invenção inclui portanto segmentos ou unidades alternantes de arabinonucleótidos (por exemplo análogos a arabinonucleótidos [por exemplo, FANA]) e 2'-desoxi-ribonucleótidos (ADN). O oligonucleótido inclui pelo menos 2 de cada um dos segmentos de nucleótidos com açúcar modificado e de 2'-desoxinucleótido, tendo portanto pelo menos 4 segmentos alternantes ao todo. Cada segmento ou unidade alternante pode conter 1 ou diversos nucleótidos. Em concretizações, a pluralidade de nucleótidos pode ser constituída por 2, 3, 4, 5 ou 6 nucleótidos. Os oligonucleótidos podem conter nas concretizações um número par ou ímpar de segmentos ou unidades alternantes. O oligonucleótido pode iniciar-se e/ou terminar com um segmento contendo resíduos de nucleótido com açúcar modificado ou resíduos de ADN. Podem portanto representar-se os oligonucleótidos da invenção, nas concretizações, tal como se segue:



Em que cada um dos A_1 , A_2 , etc. representa uma unidade com um ou mais resíduos de nucleótido com açúcar modificado e cada um dos D_1 , D_2 , etc. representa uma unidade com um ou mais resíduos de ADN. O número de resíduos em cada unidade pode ser o mesmo ou variável de uma para a outra unidade. O oligonucleótido pode conter um número par ou ímpar de unidades. O oligonucleótido pode iniciar-se (isto é, na sua extremidade 5') quer por uma unidade contendo ANA quer por uma unidade contendo ADN. O oligonucleótido pode terminar (isto é, na sua extremidade

3') quer com uma unidade nucleótido contendo açúcar modificado, quer com uma unidade contendo ADN. O número total de unidades pode ser tão pequeno como 4 (isto é, pelo menos 2 de cada tipo).

Nas concretizações, a porção "altímero" de um oligonucleósido ou de um oligonucleótido da invenção pode também incluir um ou mais nucleósidos ou nucleótidos modificados na (isto é na posição adjacente a) os seus terminais 5' e/ou 3', incluindo mas não se limitando a ribonucleósidos ou ribonucleótidos modificados, tais como ribonucleósidos ou ribonucleótidos modificados em 2', tais como 2'-metoxi-ARN (2'-O-Me-RNA) ou 2'-metoxietil-ARN (2'-MOE-RNA). Um tal oligonucleótido baseado em 2'-O-Me-ARN - altímero - 2'-OMe-ARN é capaz de originar uma actividade de ARNase H sobre um alvo de ARN adequado, tal como se descreve nos Exemplos neste documento.

Nas concretizações, o comprimento total de um oligonucleótido da invenção é de cerca de 30 ou menos resíduos de nucleótido, numa concretização adicional, 8 a cerca de 25 resíduos de nucleótido. Em concretizações suplementares, o comprimento é de entre cerca de 9 e cerca de 24, entre cerca de 10 e cerca de 23, entre cerca de 11 e cerca de 22, entre cerca de 12 e cerca de 21, entre cerca de 13 e cerca de 20, entre cerca de 14 e cerca de 19, entre cerca de 15 e cerca de 18, ou entre cerca de 16 e cerca de 17 resíduos de nucleótido. Numa concretização, o comprimento de um oligonucleótido da invenção é de 18 resíduos de nucleótido.

Nas concretizações, os resíduos de ADN podem conter qualquer uma das bases seleccionadas de entre adenina (A), citosina (C), guanina (G) ou timina (T), ou versões que incluam modificações da estrutura da base do nucleótido ou do esqueleto. Nas concretizações, os resíduos de ANA podem conter qualquer uma das bases seleccionadas de entre adenina (A), inosina (I), 2,6-diaminopurina (2,6-DAP), citosina (C), 5-metilcitosina (5MeC), guanina (G) ou timina (T) ou uracilo (U).

Os AON desta invenção contêm uma sequência que é complementar (em certas concretizações parcialmente complementar, e noutras concretizações exactamente complementar) em relação a um "ARN alvo". "Hibridização" tal como utilizada neste documento refere-se à ligação por ponte de hidrogénio entre nucleótidos complementares. O grau de complementaridade entre um AON e a sua sequência alvo pode ser variável, e nas concretizações o AON é exactamente complementar em relação à sua sequência alvo tal como se afirmou acima. Deve entender-se que não é essencial que um AON seja exactamente complementar em relação à sua sequência alvo para se conseguir uma especificidade suficiente, isto é, para minimizar a ligação não específica do oligonucleótido a sequências que não são alvos, nas condições especificamente utilizadas (por exemplo condições fisiológicas *in vivo* ou condições de um ensaio *in vitro*). "ARN alvo" refere-se a uma molécula de ARN de interesse que é o alvo para a hibridização com ou a ligação a, um oligonucleótido da invenção, para impedir ou para diminuir por exemplo a translação, a transcrição

reversa e/ou a replicação do ARN. Nas concretizações, este impedimento e inibição acontece pela indução de uma clivagem mediada por RNase H do ARN alvo, e portanto numa concretização, a invenção proporciona um método de se clivar um ARN alvo, incluindo o método referido levar-se ao contacto o ARN com um oligonucleótido da invenção. Nas concretizações, uma tal clivagem pode ser ainda mais facilitada proporcionando adicionalmente que levem a uma actividade da RNase H, tais como meios tampão (por exemplo por controlarem o pH e a força iónica), meios de controlar a temperatura, e quaisquer outras componentes que possam contribuir para uma indução da actividade da RNase H. Em determinadas concretizações, a actividade de RNase H é a actividade de um enzima RNase H ou de um enzima multifuncional que possui a actividade de RNase H (por exemplo, a transcriptase reversa do HIV). Em determinadas concretizações, uma tal actividade de RNase H inclui, mas não se limita a, uma actividade de RNase H associada com as transcriptases reversas de vírus patogénicos humanos, tais como o HIV (por exemplo os retrovírus HIV-1 e HIV-2) e os hepadnavírus, por exemplo vírus da hepatite B. Em concretizações adicionais, uma tal actividade como RNase H inclui, mas não se limita, uma actividade como RNase H associada a um enzima RNase H com origem procariótica ou eucariótica, numa concretização, com origem num mamífero, numa concretização, com origem humana. Em concretizações adicionais, uma tal actividade com RNase H inclui, sem que se limite a, uma actividade como RNase H associada à RNase H1 e à A RNase H2 (por vezes referida com RNase HII) com origem eucariótica ou procariótica. Numa

concretização, uma tal actividade como ARNase H está associada à ARNase H2 humana.

Nas concretizações, o ARN mencionado acima inclui ARN mensageiro, ou ARN genómico viral, de tal modo que o oligonucleótido pode inibir especificamente a biossíntese de proteínas codificadas pelo mARN, ou inibir uma replicação do vírus, respectivamente. Encontram-se dentro do âmbito da invenção modificações parciais dos oligonucleótidos dirigidas às extremidades 5' e/ou 3', ou do esqueleto de fosfato ou dos resíduos de açúcar para aumentar as suas propriedades de sentido reverso (por exemplo resistência a nuclease). Tal como se demonstra nesta invenção (veja-se adiante), estes oligonucleótidos são conformes com uma das condições para agentes terapêuticos de sentido reverso, isto é, eles são capazes de ligarem a ARN alvo formando um duplex AON/ARN, que numa concretização é reconhecido e degradado pela ARNase H. Para além disto, tal como se mostra nos Exemplos adiante, a eficiência com a qual os oligonucleótidos "altímeros" da invenção promovem a clivagem do ARN é superior à observada para o AON contendo apenas FANA e em alguns casos é superior à observada para o AON contendo apenas resíduos de ADN. Isto é verdade quer as ligações internucleótido do "altímero" sejam fosfodiéster, quer sejam fosforoditioato.

Os resultados apresentados neste documento estabelecem portanto que o "altímero" - incluindo oligonucleósidos ou oligonucleótidos da invenção - pode ser utilizado nas concretizações como agente de sentido

reverso, e deverá poder ser utilizado como agente terapêutico e/ou como ferramenta valiosa para estudar e para controlar a expressão de genes nas células e nos organismos.

Deste modo, em concretizações alternativas, a invenção proporciona moléculas de sentido reverso que se ligam a, induzem a degradação de, e/ou inibem a translação de (por exemplo induzindo a actividade de RNase H e/ou por levar a cabo um "arresto translacional" ou um bloqueio) de um ARN alvo (por exemplo mRNA). Incluem-se nos exemplos de aplicações terapêuticas dos oligonucleótidos de sentido reverso, incorporadas neste documento por citação: Pat. U.S. No. 5.135.917, emitida a 4 de Agosto de 1992; Pat. U.S. No. 5.098.890, emitida a 24 de Março de 1992; Pat. U.S. No. 5.087.617, emitida a 11 de Fevereiro de 1992; Pat. U.S. No. 5.166.195 emitida a 24 de Novembro de 1992; Pat. U.S. No. 5.004.810, emitida a 2 de Abril de 1991; Pat. U.S. No. 5.194.428, emitida a 16 de Março de 1993; Pat. U.S. No. 4.806.463, emitida a 21 de Fevereiro de 1989; Pat. U.S. No. 5.286.717 emitida a 15 de Fevereiro de 1994; Pat. U.S. No. 5.276.019 e Pat. U.S. No. 5.269.423; BioWorld Today, 29 de Abril de 1994, pág. 3.

Em moléculas de sentido reverso existe de preferência um grau de complementaridade suficiente face ao ARN alvo para evitar a ligação não específica da molécula de sentido reverso a sequências que não sejam alvos em condições nas quais se pretenda a ligação específica, tais como em condições fisiológicas no caso de testes *in vivo* ou

de tratamento terapêutico ou, no caso de testes *in vitro*, em condições nas quais esses testes são levados a cabo. O ARN alvo para a ligação em sentido reverso pode incluir não só a informação para codificar para uma proteína, mas também para ribonucleótidos associados, ribonucleótidos que formam por exemplo a região 5' não transladada, a região 3' não transladada, a região de encabeçamento 5' e a junção intrão/exão. Um método para despistar ácidos nucleicos de sentido reverso e do ribozima que se podem utilizar para proporcionar moléculas tais como os inibidores PLA₂ da invenção foi descrito na Patente U.S. No. 5, .932.435.

As moléculas de sentido reverso (oligonucleósidos ou oligonucleótidos) da invenção podem incluir as que contenham ligações entre os açúcares esqueléticos tais como ligações entre açúcares do tipo fosfotriésteres, metilfosfonatos, 3'-tioformacetal, amida, alquilo com cadeia curta ou cicloalquilo, ou ligações entre açúcares do tipo cadeia curta heteroatómica ou heterocíclica, fosforotioatos e aquelas ligações esqueléticas com CH₂--NH--O--CH₂, CH₂--N(CH₃)--O--CH₂ (conhecida como metileno(metilimino) ou MMI esquelético), CH₂--O--N(CH₃)--CH₂, CH₂--N(CH₃)--N(CH₃)--CH₂ e O---N(CH₃)--CH₂--CH₂ esqueléticos (em que o fosfodiéster seja O-P(O)₂--O--CH₂). Em concretizações alternativas, os oligonucleótidos de sentido reverso podem ter um esqueleto de ácido peptidonucleico (APN, por vezes referido como ácido "proteína" nucleico ou "péptido" nucleico), no qual o esqueleto fosfodiéster do oligonucleótido pode ser substituído por um esqueleto de poliamida ao qual se ligam

directamente as bases nucleosídicas ou indirectamente a átomos de azoto aza ou a grupos metileno no esqueleto de poliamida (Nielsen *et al.*, Science, 1991, **254**, 1497 e Pat. U.S. No. 5.539.082). As ligações fosfodiéster podem ser substituídas por estruturas que são quirais e enantiomericamente específicas.

Tal como se afirmou acima, nos oligonucleótidos também se podem incluir espécies que contenham pelo menos uma base de nucleótido modificada. Deste modo, podem utilizar-se purinas e pirimidinas diferentes das que se encontram normalmente na natureza. Tal como se afirmou acima, um nucleótido do segmento de nucleótidos com açúcar modificado (por exemplo o segmento ANA) pode incluir modificações na sua porção pentofuranosilo. São exemplos de tais modificações os nucleótidos substituídos com 2'-O-alquilo e com 2'-halogéneo. São alguns exemplos específicos de modificações na posição 2' de espécies açúcar que são úteis na invenção presente os substituintes OH, SH, SCH₃, F, OCN, O(CH₂)_nNH₂ ou O(CH₂)_nCH₃ em que n seja de 1 cerca de 10; alquilo inferior em C₁ a C₁₀, alquilo inferior substituído, alquilarilo ou aralquilo; Cl; Br; CN; CF₃; OCF₃; O-, S-, ou N-alquilo; O-, S-, ou N-alcenilo; SOCH₃; SO₂CH₃; ONO₂; NO₂; N₃; NH₂; heterocicloalquilo; heterocicloalquilarilo; aminoalquilamino; polialquilamino; sililo substituído; um grupo de clivagem de ARN; um grupo repórter; um espaçador; um grupo para melhorar as propriedades farmacocinéticas de um oligonucleótido; ou um grupo para melhorar as propriedades farmacodinâmicas de um oligonucleótido e outros substituintes que tenham

propriedades similares. Um ou mais dos grupos pentofuranosilo do nucleótido no segmento de nucleótido com açúcar modificado pode ser substituído por outro açúcar, por um agente que mimetize um açúcar tal como o ciclobutilo, ou por outra espécie que assuma o lugar do açúcar.

"Nucleósido" refere-se a uma base (por exemplo uma purina [por exemplo A e G] ou uma pirimidina [por exemplo C, 5-metil-C, T e U]) combinado com um açúcar (por exemplo [desoxi]ribose, arabinose e seus derivados). "Nucleótido" refere-se a um nucleósido que tenha um grupo fosfato ligado à sua espécie açúcar. Nas concretizações podem incluir-se diversas modificações nestas estruturas, por exemplo quer na base, no açúcar e/ou na espécie fosfato. "Nucleótido/nucleósido modificado" tal como se utilize neste documento, refere-se a um nucleótido/nucleósido que difere daquele com o qual se aparenta, e exclui portanto a forma nativa definida. "Oligonucleótido", tal como se utilize neste documento, refere-se a uma sequência incluindo uma pluralidade de nucleótidos ligados uns aos outros. Um oligonucleótido pode incluir estruturas modificadas no seu esqueleto e/ou em um ou mais dos nucleótidos seus componentes. Nas concretizações, os oligonucleótidos da invenção têm comprimentos de cerca de 1 a 200 bases, noutras concretizações adicionais entre cerca de 5 e cerca de 50 bases, entre cerca de 8 e cerca de 40 bases, e em outras concretizações adicionais ainda, entre cerca de 12 e cerca de 25 bases de comprimento.

"Alquil(o)" refere-se a grupos hidrocarboneto saturado com cadeia linear ou ramificada (por exemplo metilo, etilo, propilo, butilo, isopropilo, etc.). "Alcenilo" e "alcinilo" referem grupos hidrocarboneto com, respectivamente, pelo menos uma ligação dupla ou tripla C-C. "Alcoxilo" refere-se a uma estrutura -O-alquilo. "Alquilamino" refere-se a estruturas -NH(alquilo) ou -N(alquilo)₂. "Ariilo" refere-se a estruturas aromáticas substituídas ou não substituídas (por exemplo a grupos fenilo, naftilo, antracilo, fenantrilo, pirenilo, e xililo). "Hetero" refere-se a um átomo que não seja C; incluindo mas não se limitando, os átomos de N, O, ou S. Nas concretizações, os grupos mencionados acima podem ser substituídos.

Em diversas concretizações, pode portanto utilizar-se um oligonucleótido modificado da invenção de forma terapêutica em formulações ou em medicamentos para impedir ou para tratar uma doença caracterizada pela expressão de um ARN alvo específico. Em determinadas concretizações, um tal ácido nucleico alvo está contido em, ou é derivado de, determinados agentes infecciosos e/ou é necessário para a função e/ou a viabilidade e/ou a replicação/propagação do agente infeccioso. Em determinadas concretizações, o agente infeccioso é um vírus, em determinadas concretizações, é um retrovírus, numa concretização adicional, é HIV. Em concretizações adicionais, a expressão de um tal ácido nucleico alvo está associada com doenças que incluem mas não se limitam a doenças inflamatórias, diabetes, doença cardiovascular (por

exemplo restenose), e o cancro. A invenção diz respeito aos métodos correspondentes de tratamento medicinal, nos quais se administra uma dose terapêutica de um oligonucleótido modificado da invenção numa formulação farmacologicamente aceitável. A invenção proporciona portanto também composições terapêuticas que incluem um oligonucleótido modificado da invenção, e um excipiente ou veículo aceitável do ponto de vista farmacêutico. A composição terapêutica pode ser solúvel em solução aquosa a um valor de pH que seja fisiologicamente aceitável.

Numa concretização, inclui-se nestas composições uma quantidade eficaz do ponto de vista terapêutico ou profiláctico de um oligonucleótido da invenção, suficiente para tratar ou para impedir uma doença caracterizada pela expressão de um ácido nucleico alvo bem determinado, e um veículo aceitável do ponto de vista farmacêutico.

Uma "quantidade eficaz do ponto de vista terapêutico" refere-se a uma quantidade eficaz, a dosagens e durante os períodos de tempo que sejam necessários, para se conseguir o efeito terapêutico pretendido, tal como uma diminuição ou um impedimento da expressão de um ácido nucleico alvo bem determinado. Uma quantidade eficaz do ponto de vista terapêutico de um ácido nucleico modificado da invenção pode variar de acordo com factores tais como o estado da doença, a idade, o sexo, e o peso do indivíduo, bem como da capacidade do ácido nucleico modificado para originar uma reacção pretendida no indivíduo. Podem ajustar-se os regimes de dosagem para proporcionarem a

resposta terapêutica óptima. Uma quantidade eficaz do ponto de vista terapêutico é também uma quantidade para a qual quaisquer efeitos prejudiciais ou tóxicos do composto sejam mais do que contrabalançados pelos efeitos terapêuticos benéficos. Uma "quantidade eficaz do ponto de vista profilático" refere-se a uma quantidade eficaz, a dosagens e durante os períodos de tempo necessários, para conseguir o efeito profilático pretendido, tal como o de impedir ou o de tratar uma doença caracterizada pela expressão de um ácido nucleico alvo bem determinado. Pode determinar-se uma quantidade eficaz do ponto de vista profilático tal como se descreveu acima para a quantidade eficaz do ponto de vista terapêutico. Para um determinado sujeito, podem ajustar-se os regimes de dosagem específicos ao longo do tempo de acordo com a necessidade individual e com a opinião profissional da pessoa que administra ou que supervisiona a administração das composições.

Tal como se utilize neste documento "veículo, ou excipiente, aceitável do ponto de vista farmacêutico" inclui quaisquer e todos os solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes de isotonicidade e de retardamento da absorção, e outros semelhantes que sejam fisiologicamente compatíveis. Numa concretização, o veículo é adequado para administração parentérica. em alternativa, o veículo pode ser adequado para administração pelas vias endovenosa, intraperitoneal, intramuscular, sublingual ou oral. Incluem-se nos veículos aceitáveis do ponto de vista farmacêutico soluções ou dispersões aquosas estéreis e pós estéreis para a

preparação na altura de soluções ou de dispersões estéreis e injectáveis. A utilização destes meios e agentes para substâncias activas do ponto de vista farmacêutico é bem conhecida na técnica. Excepto no que diga respeito a uma incompatibilidade de um meio ou agente convencional qualquer com o composto activo, a sua utilização nas composições farmacêuticas da invenção está contemplada. Podem também incorporar-se nas composições compostos activos suplementares.

As composições terapêuticas têm tipicamente que ser estéreis e estáveis nas condições de manufactura e de armazenagem. Pode formular-se a composição sob a forma de uma solução, uma micro emulsão, liposomas, ou outra estrutura ordenada adequada para uma concentração elevada de fármaco. O veículo pode ser um solvente ou um meio de dispersão contendo, por exemplo, água, etanol, poliol (por exemplo, glicerol, propilenoglicol, e polietilenoglicol líquido, e outros semelhantes), bem como as misturas adequadas de todos estes. Pode manter-se o grau de fluidez adequado, por exemplo, pela utilização de um revestimento tal como a lecitina, pela manutenção da dimensão de partícula necessária no caso de uma dispersão, e pela utilização de tensioactivos. Em muitos casos, será preferível incluir agentes de isotonicidade, por exemplo açúcares, poli álcoois tais como o manitol, o sorbitol, ou cloreto de sódio, na composição. Pode conseguir-se uma absorção prolongada das composições injectáveis incluindo na composição um agente que retarde a absorção, por exemplo, sais monoestearato e gelatina. Para além disto,

pode administrar-se um oligonucleótido da invenção numa formulação para libertação prolongada, por exemplo numa composição que inclua um polímero para libertação lenta. O oligonucleótido modificado pode ser preparado com veículos que protegerão o oligonucleótido modificado contra uma libertação rápida, tal como uma formulação para libertação controlada, incluindo implantes e sistemas microencapsulados de libertação. Podem utilizar-se polímeros biodegradáveis, biocompatíveis, tais como acetato de viniletileno, polianidridos, ácido poliglicólico, colagéneo, poliortoésteres, ácido poliláctico e copolímeros de ácidos poliláctico e poliglicólico (PLG). Estão patenteados muitos métodos para o fabrico deste tipo de preparações, ou eles são em geral conhecidos dos especialistas da técnica.

Podem preparar-se soluções estéreis injectáveis incorporando a quantidade necessária de um composto activo, tal como um oligonucleótido da invenção, num solvente adequado com um ou uma combinação dos ingredientes enumerados acima, consoante sejam necessários, seguindo-se uma esterilização por filtração. Em geral, preparam-se as dispersões incorporando o composto activo num veículo estéril que contém um meio de dispersão de base bem como os outros ingredientes, de entre os enumerados acima. No caso de pós estéreis para a preparação de soluções estéreis injectáveis, os métodos de preparação preferidos são a secagem em vazio e a liofilização de que resulta um pó do ingrediente activo com qualquer ingrediente adicional pretendido, a partir de uma solução destes que havia sido

previamente esterilizada por filtração. De acordo com um aspecto alternativo da invenção, pode formular-se um oligonucleótido da invenção com um ou mais compostos adicionais que aumentem a sua solubilidade.

Uma vez que os oligonucleótidos da invenção são capazes de induzir a clivagem de um ARN alvo mediada por ARNase H, diminuendo desta forma a produção da proteína codificada pelo ARN alvo, os oligonucleótidos modificados da invenção podem ser utilizados em qualquer sistema no qual seja pretendida a inactivação ou a inibição selectiva de uma ARN alvo específico. Tal como se afirmou acima, incluem-se nos exemplos dessas aplicações a terapêutica com moléculas de sentido reverso, na qual a expressão do ARN alvo se encontra associada a doenças.

Um exemplo adicional de uma tal utilização é o esvaziamento selectivo de um produto alvo específico num sistema, para se estudar(em) o(s) efeito(s) fenotípicos desse esvaziamento do sistema. As observações feitas aquando desse tipo de esvaziamento podem permitir determinar a função do produto genético alvo. Em determinadas concretizações, inclui-se nesses estudos a "validação do alvo", na qual a estratégia que se descreveu acima permite confirmar se um determinado ácido nucleico alvo se encontra associado a um fenótipo ou a uma actividade específicos, e permite portanto "a validação" do alvo. O sistema mencionado acima pode conter células ou não; ser *in vitro* ou *in vivo*; procariota ou eucariota.

A invenção proporciona também embalagens comerciais que incluem um oligonucleótido da invenção. Numa concretização, a embalagem comercial contém também instruções para a utilização do oligonucleótido. Em determinadas concretizações, essas instruções incluem pelo menos um de entre os seguintes: utilização do oligonucleótido para (a) diminuir a expressão de uma sequência alvo de ARN; (b) induzir a clivagem de uma sequência de ARN alvo por ARNase H; (c) impedir ou tratar uma doença caracterizada pela expressão de um ARN alvo específico; (d) impedir ou diminuir a transcrição reversa de um ARN alvo específico num sistema; (e) impedir ou diminuir a replicação de um ARN alvo específico num sistema; (f) detectar a presença de um ARN alvo específico num sistema; (g) validar um gene alvo num sistema; e (h) qualquer combinação de (a) a (g).

A invenção diz também respeito à utilização de um oligonucleótido da invenção, com finalidades tais como: (a) diminuir a expressão de uma sequência de ARN alvo; (b) induzir a clivagem de uma sequência alvo de ARN por ARNase H; (c) impedir ou tratar uma doença caracterizada pela expressão de um ARN alvo bem determinado; (d) impedir ou diminuir a transcrição reversa de um ARN alvo num sistema; (e) impedir ou diminuir a replicação de um ARN alvo específico num sistema; (f) detectar a presença de um ARN alvo específico num sistema; (g) validar um gene alvo num sistema; e (h) qualquer combinação de (a) a (g).

A invenção diz ainda respeito à utilização de um oligonucleótido da invenção para a preparação de um medicamento, com as finalidades de (a) diminuir a expressão de uma sequência de ARN alvo; (b) induzir a clivagem de uma sequência alvo de ARN por ARNase H; (c) impedir ou tratar uma doença caracterizada pela expressão de um ARN alvo bem determinado; (d) impedir ou diminuir a transcrição reversa de um ARN alvo num sistema; (e) impedir ou diminuir a replicação de um ARN alvo específico num sistema; (f) detectar a presença de um ARN alvo específico num sistema; (g) validar um gene alvo num sistema; e (h) qualquer combinação de (a) a (g).

Embora sejam descritas neste documento diversas concretizações da invenção, podem ser feitas muitas adaptações e modificações que caem dentro do âmbito da invenção, de acordo com os conhecimentos gerais de qualquer pessoa que seja especialista da técnica. Incluem-se nessas modificações a substituição por equivalentes conhecidos em qualquer dos aspectos da invenção, para se conseguir o mesmo resultado substancialmente do mesmo modo. As gamas numéricas são inclusivas no que toca aos números que definem essas gamas. Nas reivindicações, a palavra "incluindo" é utilizada a título de termo com extremos abertos, substancialmente equivalente à frase "incluindo, mas sem que se limite a". Os exemplos que se seguem ilustram diversos aspectos da invenção e não limitam a invenção nos seus aspectos de âmbito, tal como é descrita neste documento.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Materiais e método

Síntese dos AON. Sintetizaram-se monómeros 5'-monometoxitritilados de 3'-O-cianoetilfosforamidito de 2'-desoxi-2'-fluoroarabinonucleósido tal como havia sido anteriormente descrito [Wilds, C.J. & Damha, M.J. *Nucleic Acids Res.* 2000, **28**, 3625; Elzagheid, M.I. *et al.*, em *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*, Unit **1.7**, Beaucage, S. L., Bergstrom, D. E., Gli, G. D., Editores, 2002]. A síntese de oligonucleótidos ilustrada na Tabela 1 e na Tabela 2 foi levada a cabo à escala de 1-micromole utilizando um sintetizador de ADN Expedite 8909. Utilizou-se a título de suporte sólido vidro com poros controlados com alquilaminas de cadeia longa (LCAA-CPG). O ciclo sintético consistia nos seguintes passos: (a) Detritilação da ligação do nucleósido ou nucleótido ao CPG (ácido tricloroacético a 3 % e diclorometano): 150 segundos; (b) acoplamento de monómeros de um 2'-F-arabinonucleósido (15 minutos) ou de um 3'-fosforamidito de um 2'-desoxi-ribonucleósido (2 minutos). As concentrações de monómeros utilizadas foram de 50 mg/mL para os monómeros F-T, araF-C e DNA, e 60 mg/mL para araA e araF-G (acetonitrilo como solvente); (c) acetilação utilizando o passo clássico de encapelamento: 20 segundos. A solução de encapelamento era constituída por 1:1 (em volume) de reagentes "cap A" e "cap B". (Cap A: anidrido acético/colidina/THF, a 1:1:8; cap B: N-Metilimidazole/THF, a 4:21); (d) lavagem extensiva com acetonitrilo (50 pulsos); (e) oxidação durante 20 segundos

com iodo/água (no caso dos oligómeros ligados por fosfodiéster) ou uma sulfuração durante 10 minutos (no caso de oligómeros PS) com uma solução recentemente preparada 0,1 M de 3-amino-1,2,4-ditiazolina-5-tiona (ADTT) em piridina/acetonitrilo (a 1/1, em volume); (f) lavagem com acetonitrilo: 20 pulsos; (g) secagem do suporte sólido por adição do reagente de encapselamento (veja-se o passo c acima): 5 segundos; (h) lavagem com acetonitrilo (20 pulsos).

A seguir à montagem da cadeia, clivam-se os oligonucleótidos do suporte sólido e desprotegem-se tal como já se descreveu previamente [Wilds, C.J. & Damha, M.J. *Nucleic Acids Res.* 2000, **28**, 3625; Viazovkina, E. *et al.*, em *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*, Unidade **4.15**, Beaucage, S.L., Bergstrom, D. E., Gli, G. D., Editores, 2002]. Purificaram-se os oligómeros em bruto por HPLC de permuta aniónica seguida por uma dessalinização (cartuchos SepPak). Rendimentos: 50-100 unidades A_{260} . As condições para a purificação por HPLC são: Coluan: Protein Pak DEAE-5PW (7,5 mm x 7,5 cm, Waters), Solventes: Tampão A: H_2O ; Tampão B: $LiClO_4$ 1 M (ou $NaClO_4$ 1 M), Gradiente: 100 % de tampão A, isocrática, durante 12 minutos, 100 % A - 15 % B, linear (ao longo de 5 minutos), 15 % B - 55 % B, linear (ao longo de 60 minutos); Ajustou-se o caudal para 1 mL/minuto, ajustou-se a temperatura a 50°C. Regulou-se o detector para 260 nm para a cromatografia analítica e para 290 nm para a cromatografia preparativa. Nestas condições, o oligómero de comprimento inteiro que se pretendia era o último a eluir. Os oligonucleótidos foram caracterizados

por electroforese sobre gel e por espectrometria de massa. São proporcionadas as sequências dos oligonucleótidos nas Tabelas 1 e 2.

Medições do P_f . Misturaram-se AON com oligonucleótidos de ARN complementares, em quantidades equimolares num tampão contendo KCl 140 mM, MgCl₂ 1 mM, e Na₂HPO₄ 5 mM, a pH 7,2, para se obter uma concentração total de duplex de ca. 5 μ M. Aqueceram-se as amostras a 90°C durante 15 minutos, depois arrefeceu-se lentamente até à temperatura ambiente. A solução de duplex de AON/ARN foi então exposta a temperaturas crescentes (0,5°C/medição), e determinou-se a sua absorvância o UV a 260 nm depois de se equilibrar a temperatura. Os valores de P_f listados nas Tabelas 1 e 2 foram calculados utilizando o método da linha de base e têm uma incerteza de $\pm 0,5^\circ\text{C}$.

Purificação de ARNase H. Purificou-se ARNase HI de *E. coli* tal como havia sido anteriormente descrito (7). Sobre-expressou-se ARNase HII humana e purificou-se se acordo com procedimentos publicados (Wu, H. *et al.*, J. Biol. Chem., 1999, **274**, 28270).

Determinação de ARNase H. As determinações de ARNase H foram levadas a cabo à temperatura ambiente ($\approx 20^\circ\text{C}$) (oligonucleótidos homopoliméricos listados na Tabela 1), ou a 37°C (oligonucleótidos com base mista listados na Tabela 2). Prepararam-se substratos homopoliméricos de ácidos nucleicos em duplex misturando o AON ligado por fosfodiéster (2 pmol) com 0,5 pmol do alvo complementar de

ARN oligo-rA₁₈ (marcado com 5'-³²P-; SEQ ID NO: 21) em 10 µL de Tris-HCl 60 mM (pH 7,8) contendo KCl 60 mM e 2,5 mM em MgCl₂, seguindo-se um aquecimento a 90°C durante 2 minutos e um arrefecimento lento até à temperatura ambiente. Deixaram-se as soluções de substratos duplex repousar à temperatura ambiente durante pelo menos 1 h antes de se utilizarem. Iniciaram-se as reacções pela adição de ARNase H (7 ng do enzima em 2 µL de tampão) e removeram-se alíquotas a diversas alturas terminando-se a reacção por adição de igual volume de uma solução 98 % desionizada de EDTA 10 mM contendo formamida, 1 mg/mL de azul de bromofenol e 1 mg/mL de xileno cianol. Depois de se aquecer a 100°C durante 5 minutos, separaram-se os produtos reaccionais por electroforese sobre geles de poliacrilamida a 16 % de sequenciação, contendo ureia 7 M, visualizando-se por auto-radiografia, e quantificaram-se os produtos formados por densitometria.

Prepararam-se híbridos de AON/ARN com uma composição de uma mistura de bases misturando a cadeia de AON fosforotioato (vejam-se os oligómeros listados na Tabela 2) com os correspondentes 5'-ARN alvos marcados (AAGGGAUACGACAAGGAUAUAA [SEQ ID NO: 22]). Este ARN estava marcado na extremidade 5' com ³²P utilizando [γ-³²P]-ATP com polinucleótido quinase de T4. Misturaram-se vinte pmol (20 pmol) de oligonucleótidos de sentido reverso com 10 pmol de ARN marcado em 5' com ³²P, num tampão, (100 µL no final) contendo Tris.HCl 60 mM (pH 7,8), 60 mM em KCl, 2,5 mM em MgCl₂, aqueceu-se a 90 °C durante 5 minutos e arrefeceu-se lentamente até à temperatura ambiente. Para iniciar as

reacções, adicionou-se ARNase H humana (5 ng em 2 µL de tampão) a 8 µL da solução de substrato acima. Após uma incubação a 37°C, terminaram-se as reacções adicionando-lhes iguais volumes de tampão de carga desnaturante (98 % de formamida desionizada, 10 mM em EDTA, com 1 mg/mL de azul de bromofenol e 1 mg/mL de xileno cianol). Separaram-se os produtos sobre um gel desnaturante de poliacrilamida a 16 % (peso/volume) em ureia 7 M, num tampão de Tris-borato/EDTA a 2000 V durante cerca de 2 h. Após a electroforese, expôs-se o gel a um filme de raios-X e os auto-radiogramas resultantes foram alvo de um varrimento e uma quantificação.

Determinação da luciferase. Cultivaram-se células HeLa X1/5 (transfectadas de forma estável com o gene da luciferase e expressando um enzima luciferase funcional) em meio Eagle modificado da Dulbecco (DMEM) suplementado com 10 % de soro fetal bovino (FBS). Semearam-se as células em placas de 96 poços a 2×10^4 células/poço. Levaram-se a cabo experiências de sentido reverso 24 h depois desta semeadura, altura em que as células já eram confluentes a 80 %. Utilizou-se lipofectina para veicular oligonucleótidos de sentido reverso às células. Em suma, diluíram-se os oligonucleótidos de sentido reverso e a lipofectina com DMEM sem soro para se obter uma concentração de 10 X a final de sentido reverso, e 50 µg/mL de lipofectina. Misturaram-se iguais volumes de solução de oligonucleótido e de lipofectina em tubos em plástico e incubou-se durante 15 minutos à temperatura ambiente para permitir a formação de complexo. Diluiu-se este complexo a

1/5 com DMEM contendo 10 % de FBS, e depois substituiu-se o meio de cultura das células por esta mistura e incubaram-se as células durante 4 horas a 37°C. Removeu-se a mistura de sentido reverso/lipofectina das células e substituiu-se por DMEM contendo 10 % de FBS, e depois incubaram-se as células durante mais 16 horas a 37°C. Depois destas 16 horas adicionais de incubação, avaliou-se a actividade da luciferase celular utilizando o sistema de medição de luciferase (Promega, Madison, WI, USA) de acordo com o protocolo do fabricante. Em suma, removeu-se o meio de cultura, lavaram-se as células com soro salino tamponizado com fosfato, e depois lisaram-se as células. Transferiram-se alíquotas dos lisados celulares para microplacas de avaliação, adicionou-se-lhes solução de substrato de luciferina, e mediu-se imediatamente a luminescência obtida utilizando um espectrofluorímetro de microplacas SPECTRAMax GEMINI XS (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) regulado para o modo de leitura de luminescência.

Exemplo 2: Estabilidade dos duplexes altímero:ARN

Os solicitantes demonstram neste documento que os oligonucleótidos "altímeros" ANA/ADN (por exemplo FANA/ADN) formam duplex com o ARN alvo (Tabelas 1 & 2), e que a temperatura de fusão para estes ADN quiméricos se correlaciona directamente com o seu conteúdo em FANA. Estudos anteriores tinham demonstrado que o AON de 2'-OMe-ARN também alvejava o ARN com uma maior afinidade do que o correspondente AON de ADN. No entanto, os AON de esqueleto misto 2'-OMe-ARN/ADN (com as SEQ ID No: 8 a 10) apenas

evidenciavam afinidades de ligação térmicas semelhantes ou inferiores em relação ao ARN alvo, em comparação com o AON de ADN apenas (SEQ ID NO: 1).

Tabela 1. Altímeros AON altímeros e a sua formação de duplex com ácido octadeca-riboadenílico (r-A₁₈).

AON Nº. ou SEQ ID Nº:	Sequência de AON ^a	Pf (°C)
1	5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'	40
2	5'-FFFFFFFFFFFFFFFFFF-3'	53
3	5'-FTFTFTFTFTFTFTFT-3'	45,5
4	5'-FFTTFFTTFFTTFF-3'	46
5	5'-FFFTTTFFFTTTFFF-3'	47
6	5'-FFFFFFTTFFFTTFF-3'	47
7	5'-FFFFFFTTTTTFFF-3'	48
8	5'-UTUTUTUTUTUTUTUT-3'	33
9	5'-UUUTTTUUUTTTUUU-3'	42
10	5'-UUUUUUTTTTTUUUUU-3'	41

^a T, F, e U referem-se, respectivamente, ao nucleótido natural 2'-desoxi-ribo-2'-timidina, ao nucleótido 2'-desoxi-2'-fluoro-D-arabinotimidina, e ao nucleótido 2'-O-metil-D-uridina. Pf é a temperatura de fusão do duplex AON/ARN, que é definida como sendo a temperatura à qual metade da população (50 %) de moléculas estão em duplexes (AON/ARN), sendo as restantes de cadeia única (AON + ARN). Deste modo os valores de Pf são indicações da estabilidade do duplex AON/ARN.

Exemplo 3: Capacidade dos AON da invenção para originar degradação por ARNase H de ARN alvo

Estudos com AON com esqueleto misto sugerem que a capacidade destes AON para originarem a degradação do ARN alvo por ARNase H *in vitro* permite prever a capacidade destes AON para inibirem a expressão intracelular de genes (Monia, B.P. *et al.* J. Biol. Chem. 1993, **268**, 14514; Gutierrez, A.J. *et al.*, Biochemistry 1997, **36**, 743; Flanagan, W.M. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 1999, **96**, 3513). Os solicitantes avaliaram portanto os duplexes dos diversos AON listados na Tabela 1 ligados a ARN complementar como substratos para a ARNase HI de *E. coli* e a ARNase HII humana. A Figura 2 ilustra o facto de todas as quimeras FANA/ADN induzirem a clivagem do ARN alvo por ARNase HII humana. A eficiência de clivagem pela ARNase H aumentava quando aumentava a dimensão dos segmentos alternantes de ADN adentro do fundo em FANA. Verificou-se uma actividade óptima com a SEQ ID NO: 5, que inclui segmentos trinucleotídicos alternantes de FANA e de ADN. A capacidade deste AON "altímero" para originar a degradação por ARNase HII humana do ARN alvo era significativamente melhor do que a da SEQ ID NO: 1 completamente constituída por ADN. Para além disto, esta característica da SEQ ID NO: 5 foi melhorada em relação à de FANA/ANA/FANA com a SEQ ID NO: 7 (Figura 3).

Ao contrário do AON "altímero" constituído por FANA e ADN, um AON semelhante (SEQ ID NO: 8 e 9) incluindo 2'-O-metil-ARN e ADN mostrava apenas uma capacidade fraca para originar a degradação por ARNase H do ARN alvo (Figura 3).

Exemplo 4: Efeito de oligonucleótidos de sentido reverso sobre a expressão de luciferase.

Foram preparados diversos oligonucleótidos e caracterizados quanto à sua ligação a um alvo de ARN codificando para luciferase, e determinou-se o seu efeito sobre a expressão da luciferase, tal como se descreveu acima. Apresentam-se os resultados na Tabela 2. Com a exceção dos controlos "misturados" e "não emparelhados" que se ilustram adiante, todos os oligonucleótidos incluindo FANA/ADN, os segmentos alternantes exibiam uma inibição significativa da actividade de luciferase. Enquanto essa inibição era máxima para um oligonucleótido com segmentos alternantes de 3-nucleótidos (SEQ ID NO: 12), também se observou nos casos em que se adicionavam em flanco nucleótidos de 2'-metoxi-ARN, a um oligonucleótido alternante de FANA/ADN (por exemplo SEQ ID NO: 15 e a 16). Os oligonucleótidos incluindo segmentos alternantes FANA/ADN eram superiores neste aspecto a oligonucleótidos de ADN puro (SEQ ID NO: 11) ou um oligonucleótido de 2'-metoxi-ADN - 2'-metoxi ARN "falhómero" ("gapmer", (SEQ ID NO: 20) que apenas exibia níveis muito marginais de inibição quando comparado com os oligonucleótidos de controlo.

Tabela 2: Propriedades Físicas e Biológicas de Oligonucleótidos AON

SEQ ID N°:	Sequência de AON ^a	Pf °C	k _{rel} ^b	Actividade como Luciferase ^c (%)
------------	-------------------------------	----------	-------------------------------	--

SEQ ID Nº:	Sequência de AON ^a	Pf °C	k _{rel} ^b	Actividade como Luciferase ^c (%)
11	Ata-tcc-ttg-tcg-tat-ccc	57	3,4	80
12	ATA -tcc- TTG -tcg- TAT -ccc	62	4,2	21
13	ATATCCTT -gtcgtatccc	61	2,9	60
14	Agct CCA ca CTA gaCC (controlo de altímero misturado)	n.a.	n.d.	102
15	[2'OMe-AUAU]-cc- TT -gt- CG-ta [2'OMe-UCCC]	66	3,3	57
16	[2'OMe-AUAU]- CCT -tgt- CG - ta-[2'OMe-UCCC]	66	3,3	42
17	[2'OMe-AUAU]-CCTTG- tcgta-[2'OMe-UCCC]	65	3,8	76
18	[2'OMe-AUAU]- CCTTGTCGTA - [2'OMe-UCCC]	68	0,3	53
19	[2'OMe-AUAA]-cct-t Tt - c Tt -A-[2'OMe-ACCC] (controlo por 4 pb diferentes)	n.a.	n.d.	98
20	[2'OMe-AUAU]-ccttgtcgta- [2'OMe-UCCC]	64	3,6	82

^aAs minúsculas referem ADN; as maiúsculas a negrito, **FANA**; As maiúsculas dentro de parênteses quadrados, 2'-OMe-ARN. Todos os AON são fosforotioatos (todas as ligações são PS). ^bConstantes de pseudo primeira ordem para a hidrólise mediada por ARNase-HII do ARN alvo quando em duplex com AON. ^cA coluna "actividade de luciferase (%)" contém a actividade como luciferase expressa em percentagem em relação à actividade como luciferase na ausência de AON. A concentração de AON era de 250 nM. N.a.=não aplicável; n.d.= não determinado.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<120> OLIGONUCLEÓTIDOS INCLUINDO SEGMENTOS
ALTERNANTES E SUAS UTILIZAÇÕES

<130> 85827-63

<150> US 60/352.873

<151> 2002-02-01

<160> 22

<170> Patente na versão 3.1

<210> 1

<211> 18

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

<400> 1

ttttttttttttttttttttttt 18

<210> 2

<211> 18

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

<220>

<221> característica miscelânea

<222> (1)..(18)

<223> Os resíduos 1 a 18, são 2'-desoxi-2'-
fluoroarabinotimidina

<400> 2

nnnnnnnnnnnnnnnnnnnn 18

<210> 3

<211> 18

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

<220>

<221> característica miscelânea

<222> (1)..(17)

<223> Os resíduos 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17
são 2'-desoxi-2'-fluoroarabinotimidina

<220>

<221> característica miscelânea

<222> (1)..(17)

<223> Os resíduos 1, 3, 5, 7; 9, 11, 13, 15 e 17
são 2'-desoxi-2'-fluoroarabinotimidina

<400> 3
ntntntntntntntntntntnt 18

<210> 4
<211> 18
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido

<220>
<221> característica miscelânea
<222> (1)..(18)
<223> Os resíduos 1, 2, 5, 6, 9, 10, 13, 14, 17 e
18 são 2'-desoxi-2'-fluoroarabinotimidina

<400> 4
nnttnnttnnttnnttnn 18

<210> 5
<211> 18
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido

<220>
<221> característica miscelânea

<222> (1)..(15)

<223> Os resíduos 1-3, 7-9 e 13-15 são 2'-desoxi-
2'-fluoroarabinotimidina

<400> 5

nnnttttnnttttnntttt 18

<210> 6

<211> 18

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

<220>

<221> característica miscelânea

<222> (1)..(18)

<223> Os resíduos 1-4, 8-11 e 15-18 são 2'-
desoxi-2'-fluoroarabinotimidina

<400> 6

nnnttttnnnnttttnnnn 18

<210> 7

<211> 18

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

<220>

<221> característica miscelânea

<222> (1)..(18)

<223> Os resíduos 1-6 e 13-18 são 2'-desoxi-2'-
fluoroarabinotimidina

<400> 7

nnnnnntttttttnnnnnn 18

<210> 8

<211> 18

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

<220>

<221> característica miscelânea

<222> (1)..(17)

<223> Os resíduos 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 e 17
são 2'-O-metil-D-uridina

<400> 8

ututututututututut 18

<210> 9

<211> 18

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

<220>

<221> característica miscelânea

<222> (1)..(15)

<223> Os resíduos 1-3, 7-9, e 13-15 são 2'-O-metil-D-uridina.

<400> 9

uuutttuuutttuuuttt 18

<210> 10

<211> 18

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

<220>

<221> característica miscelânea

<222> (1)..(18)

<223> Os resíduos 1-6 e 13-18 são 2'-O-metil-D-uridina

<400> 10

uuuuuutttttttuuuuuu 18

<210> 11

<211> 18

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

<220>

<221> característica miscelânea

<222> (1)..(18)

<223> Os resíduos 1-18 estão ligados por ligações
fosforotioato

<400> 11

atataccttggtcgatatccc 18

<210> 12

<211> 18

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

<220>

<221> característica miscelânea

<222> (1)..(15)

<223> Os resíduos 2, 7, 8, 13 e 15 são 2'-desoxi-2'-fluoroarabinotimidina; os resíduos 1, 3 e 14 são 2'-desoxi-2'-fluoroarabinoadenosina; o resíduo 9 é 2'-desoxi-2'-fluoroarabinoguanosina

<220>

<221> característica miscelânea

<222> (1)..(18)

<223> Os resíduos 1-18 estão ligados por ligações fosforotioato

<400> 12

nnntccnnntcgnnnccc 18

<210> 13

<211> 18

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

<220>

<221> característica miscelânea

<222> (1)..(8)

<223> Os resíduos 1 e 3 são 2'-desoxi-2'-fluoroarabinotimidina; os resíduos 2, 4, 7 e 8 são 2'-desoxi-2'-

fluoroarabinoadenosina; os resíduos 5 e 6
são 2'-desoxi-2'-fluoroarabinocytidina

<220>

<221> característica miscelânea

<222> (1)..(18)

<223> Os resíduos 1-18 estão ligados por ligações
fosforotioato

<400> 13

nnnnnnnngtcgtatccc 18

<210> 14

<211> 17

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

<220>

<221> característica miscelânea

<222> (1)..(17)

<223> Os resíduos 2, 8 e 13 são 2'-desoxi-2'-
fluoroarabinotimidina; os resíduos 3 e 5
são 2'-desoxi-2'-fluoroarabinoadenosina;
os resíduos 12 e 16-18 são 2'-desoxi-2'-
fluoroarabinocitidina

<220>

<221> característica miscelânea

<222> (1)..(17)

<223> Os resíduos 1-17 estão ligados por ligações
fosforotioato

<400> 14

nngctnnncannngann 17

<210> 15

<211> 18

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

<220>

<221> característica miscelânea

<222> (1)..(18)

<223> Os resíduos 1 e 3 são 2'-O-metil-D-
adenosina; os resíduos 2, 4 e 15 são 2'-O-
metil-D-uridina; os resíduos 16-18 são 2'-
O-metil-D-citidina; os resíduos 7 e 8 são
2'-desoxi-2'-fluoroarabinotimidina; o
resíduo 11 é 2'-desoxi-2'-
fluoroarabinocitidina; o resíduo 12 é 2'-
desoxi-2'-fluoroarabinoguanosina

<220>

<221> característica miscelânea

<222> (1)..(18)

<223> Os resíduos 1-18 estão ligados por ligações
fosforotioato

<400> 15

auaucnngtnntauccc 18

<210> 16

<211> 18

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

<220>

<221> característica miscelânea

<222> (1)..(18)

<223> Os resíduos 1 e 3 são 2'-O-metil-D-
adenosina; os resíduos 2, 4 e 15 são 2'-O-
metil-D-uridina; os resíduos 16-18 são 2'-
O-methyl-D-citidina; o resíduo 7 é 2'-
desoxi-2'-fluoroarabinotimidina; os
resíduos 5, 6 e 11 são 2'-desoxi-2'-
fluoroarabinocitidina; o resíduo 12 é 2'-
desoxi-2'-fluoroarabinoguanosina

<220>

<221> característica miscelânea

<222> (1)..(18)

<223> Os resíduos 1-18 estão ligados por ligações
fosforotioato

<400> 16

auaunnntgtnntauccc 18

<210> 17

<211> 18

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

<220>

<221> característica miscelânea

<222> (1)..(18)

<223> Os resíduos 1 e 3 são 2'-O-metil-D-
adenosina; os resíduos 2, 4 e 15 são 2'-O-
metil-D-uridina; os resíduos 16-18 são 2'-
O-metil-D-citidina; os resíduos 7 e 8 são
2'-desoxi-2'-fluoroarabinotimidina; os
resíduos 5 e 6 são 2'-desoxi-2'-
fluoroarabinocitidina; o resíduo 9 é 2'-
desoxi-2'-fluoroarabinoguanosina

<220>

<221> característica miscelânea

<222> (1)..(18)

<223> Os resíduos 1-18 estão ligados por ligações
fosforotioato

<400> 17

auaunnnntcgtauccc 18

<210> 18

<211> 18

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

<220>

<221> característica miscelânea

<222> (1)..(18)

<223> Os resíduos 1 e 3 são 2'-O-metil-D-adenosina; os resíduos 2, 4 e 15 são 2'-O-metil-D-uridina; os resíduos 16-18 são 2'-O-metil-D-citidina; os resíduos 7, 8, 10 e 13 são 2'-desoxi-2'-fluoroarabinotimidina; o resíduo 14 é 2'-desoxi-2'-fluoroarabinoadenosina; os resíduos 5, 6 e 11 são 2'-desoxi-2'-fluoroarabinocitidina; os resíduos 9 e 12 são 2'-desoxi-2'-fluoroarabinoguanosina

<220>

<221> característica miscelânea

<222> (1)..(18)

<223> Os resíduos 1-18 estão ligados por ligações
fosforotioato

<400> 18

auaunnnnnnnnnnucucc 18

<210> 19

<211> 18

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

<220>

<221> característica miscelânea

<222> (1)..(18)

<223> Os resíduos 1, 3, 4 e 16 são 2'-O-metil-D-
adenosina; o resíduo 2 é 2'-O-metil-D-
uridina; os resíduos 17-19 são 2'-O-metil-
D-citidina; os resíduos 9 e 12 são 2'-
desoxi-2'-fluoroarabinotimidina; o resíduo
14 é 2'-desoxi-2'-fluoroarabinoadenosina

<220>

<221> característica miscelânea

<222> (1)..(18)

<223> Os resíduos 1-18 estão ligados por ligações
fosforotioato

<400> 19

auaaccttntcntnacc 18

<210> 20

<211> 18

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

<220>

<221> característica miscelânea

<222> (1)..(18)

<223> Os resíduos 1 e 3 são 2'-O-metil-D-adenosina; os resíduos 2, 4 e 15 são 2'-O-metil-D-uridina; os resíduos 16-18 são 2'-O-metil-D-citidina

<220>

<221> característica miscelânea

<222> (1)..(18)

<223> Os resíduos 1-18 estão ligados por ligações fosforotioato

<400> 20

auauccttgctgtaucc 18

<210> 21

<211> 18

<212> ARN

<213> Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido da ARN alvo

<400> 21

aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa 18

<210> 22

<211> 22

<212> ARN

<213> Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido da ARN alvo

<400> 22

aagggauacgacaaggauauaa 22

Lisboa, 29 de Janeiro de 2009

REIVINDICAÇÕES

1. Um oligonucleósido incluindo um primeiro e um Segundo segmentos alternantes, em que o primeiro segmento referido inclua pelo menos um arabinonucleósido, em que o segundo segmento referido inclua pelo menos um 2'-desoxi-ribonucleósido, em que o oligonucleósido referido inclua pelo menos 2 de cada um dos referidos primeiro e Segundo segmentos incluindo portanto pelo menos 4 segmentos alternantes, em que o número de resíduos em cada um dos primeiros segmentos e em cada um dos segundos segmentos possa ser o mesmo ou ser variável de um segmento para outro e não sendo o oligonucleósido referido S-ATATCCTTgTCgTATCCC, em que N= 2'-desoxi-2'-fluoro-beta-D-arabinonucleótido (nucleótido FANA); n= nucleótido de ADN; S= ligações contendo fosforotioato.

2. O oligonucleósido da reivindicação 1, no qual (a) o oligonucleósido referido contenha também uma ligação internucleósido que inclua um fosfato, sendo portanto um oligonucleótido, (b) em que o arabinonucleósido referido inclua um fosfato a ele ligado sendo portanto um arabinonucleótido, (c) em que o referido 2'-desoxi-ribonucleósido inclua um fosfato a ele ligado, sendo portanto um 2'-desoxi-ribonucleótido, ou (d) qualquer combinação de (a) a (c).

3. O oligonucleótido da reivindicação 2, em que o arabinonucleótido referido seja capaz de adoptar uma conformação semelhante à do ADN.

4. O oligonucleótido da reivindicação 2, em que os segmentos referidos contenham cada um deles

independentemente 1 a 6 arabinonucleótidos ou 2'-desoxi-ribonucleótidos.

5. O oligonucleótido da reivindicação 4, em que os segmentos referidos contêm cada um deles independentemente 2 a 5 arabinonucleótidos ou 2'-desoxi-ribonucleótidos.

6. O oligonucleótido da reivindicação 5 em que os referidos segmentos contêm independentemente 3 a 4 arabinonucleótidos ou 2'-desoxi-ribonucleótidos.

7. O oligonucleótido da reivindicação 6, em que os referidos segmentos contêm independentemente 3 arabinonucleótidos ou 2'-desoxi-ribonucleótidos.

8. O oligonucleótido da reivindicação 2, em que o oligonucleótido referido tenha uma estrutura seleccionada de entre o conjunto constituído por

a)

$(Ax-Di)_n$ I

b)

$(Di-Ax)_n$ II

c)

$(Ax-Di)_m-Ax-Di-Ax$ III

d)

$(Di-Ax)_m-Di-Ax-Di$ IV

em que cada um de entre m , x e i seja independentemente um inteiro maior ou igual a 1, n seja um inteiro maior ou igual a 2, A seja um arabinonucleótido e D seja um 2'-desoxi-ribonucleótido.

9. O oligonucleótido da reivindicação 2, em que o arabinonucleótido inclua um substituinte 2' seleccionado de entre o conjunto constituído pelos grupos fluoro, hidroxilo, amino, ciano, azido, $-\text{CH}=\text{CH}_2$, $-\text{C}\equiv\text{CH}$, alquilo, alquilo funcionalizado, alcoxilo e alcoxilo funcionalizado.

10. O oligonucleótido da reivindicação 9, em que o grupo alquilo referido seja um grupo alquilo $\text{C}_1\text{-C}_9$

11. O oligonucleótido da reivindicação 10, em que o referido grupo alquilo $\text{C}_1\text{-C}_9$ seja seleccionado de entre o conjunto constituído pelos grupos metilo, etilo e propilo.

12. O oligonucleótido da reivindicação 9, em que o grupo alquilo funcionalizado referido seja seleccionado de entre o conjunto constituído pelos grupos metilamino, etilamino e propilamino,

13. O oligonucleótido da reivindicação 9, em que o grupo alcoxilo referido seja seleccionado de entre o conjunto constituído pelos grupos metoxilo, etoxilo e propoxilo.

14. O oligonucleótido da reivindicação 9, em que o grupo alcoxilo funcionalizado referido seja $-\text{O}(\text{CH}_2)_q\text{-R}$, em que $q = 2, 3$ ou 4 e $-\text{R}$ seja seleccionado de entre o conjunto constituído pelos grupos $-\text{NH}_2$, $-\text{OCH}_3$, e $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$.

15. O oligonucleótido da reivindicação 9, em que o substituinte 2' seja fluoro.

16. O oligonucleósido da reivindicação 1, em que o oligonucleósido referido contenha uma ou mais ligações internucleósido seleccionadas de entre o conjunto constituído por:

- a) fosfodiéster;
- b) fosfotriéster;
- c) fosforotioato;
- d) fosforoditioato;
- e) Rp-fosforotioato;
- f) Sp-fosforotioato;
- g) boranofosfato;
- h) 3'-tioformacetal
- i) metileno (metilimino);
- j) amida;
- k) metilfosfonato;
- l) fosforamidato (5'P-N3'); e
- m) qualquer combinação de (a) a (l).

17. O oligonucleótido de qualquer uma das reivindicações 2-15, em que o oligonucleótido referido seja constituído por 30 ou menos nucleótidos.

18. O oligonucleótido da reivindicação 17, em que o oligonucleótido referido seja constituído por 8 a 25 nucleótidos.

19. O oligonucleótido da reivindicação 18, em que o oligonucleótido referido seja constituído por 18 nucleótidos.

20. O oligonucleótido da reivindicação 8, em que o oligonucleótido referido tenha a estrutura I em que $x=1$, $i=1$ e $n=9$, apresentando portanto a estrutura:

A-D-A-D-A-D-A-D-A-D-A-D-A-D-A-D-A-D.

21. O oligonucleótido da reivindicação 8, em que o oligonucleótido apresente a estrutura II em que $x=1$, $i=1$ e $n=9$, apresentando portanto a estrutura:

D-A-D-A-D-A-D-A-D-A-D-A-D-A-D-A-D-A.

21. O oligonucleótido da reivindicação 8, em que o oligonucleótido referido apresente a estrutura III em que $x=2$, $i=2$ e $m=3$, apresentando portanto a estrutura:

A-A-D-D-A-A-D-D-A-A-D-D-A-A-D-D-A-A.

23. O oligonucleótido da reivindicação 8, em que o oligonucleótido referido tenha a estrutura IV em que $x=2$, $i=2$ e $m=3$, apresentando portanto a estrutura:

D-D-A-A-D-D-A-A-D-D-A-A-D-D-A-A-D-D.

24. O oligonucleótido da reivindicação 8, em que o oligonucleótido referido tenha a I em que $x=3$, $i=3$ e $n=3$, apresentando portanto a estrutura:

A-A-A-D-D-D-A-A-A-D-D-D-A-A-A-D-D-D.

25. O oligonucleótido da reivindicação 8, em que o referido oligonucleótido tenha a estrutura II em que $x=3$, $i=3$ e $n=3$, apresentando portanto a estrutura:

D-D-D-A-A-A-D-D-D-A-A-A-D-D-D-A-A-A.

26. O oligonucleótido da reivindicação 8, em que o referido oligonucleótido tenha a estrutura referida III em que $x=4$, $i=3$ e $m=1$, apresentando portanto a estrutura:

A-A-A-A-D-D-D-A-A-A-A-D-D-D-A-A-A-A.

27. O oligonucleótido da reivindicação 8, em que o referido oligonucleótido tenha a estrutura referida IV em que $x=4$, $i=3$ e $m=1$, apresentando portanto a estrutura:

D-D-D-D-A-A-A-D-D-D-D-A-A-A-D-D-D-D.

28. O oligonucleósido da reivindicação 1, incluindo também um terceiro segmento que inclui um nucleósido modificado, em que o terceiro segmento referido seja adjacente a (a) o terminal 5' dos referidos primeiro e segundo segmentos alternantes, (b) o terminal 3' dos referidos primeiro e segundo segmentos alternantes, ou (c) tanto (a) como (b).

29. O oligonucleótido da reivindicação 2, incluindo também um terceiro segmento que contenha um nucleótido modificado, em que o terceiro segmento referido seja adjacente a (a) o terminal 5' dos referidos primeiro e

segundo segmentos alternantes, (b) o terminal 3' dos referidos primeiro e segundo segmentos alternantes, ou (c) tanto (a) como (b).

30. O oligonucleótido da reivindicação 29, em que o nucleótido modificado referido seja um ribonucleótido modificado.

31. O oligonucleótido da reivindicação 30, em que o ribonucleótido modificado referido inclua uma modificação na sua posição 2'.

32. O oligonucleótido da reivindicação 30, em que a modificação em 2' referida seja seleccionada de entre o conjunto constituído pelos grupos metoxilo, metoxietilo, fluoro e propilamino.

33. O oligonucleótido de qualquer uma das reivindicações 2-15, 17-27 e 29-32, em que o referido oligonucleótido seja de sentido reverso em relação a um ARN alvo.

34. Um método de impedir ou diminuir a translação, a transcrição reversa e/ou a replicação de um ARN alvo, incluindo o método referido levar-se ao contacto o ARN alvo referido com o oligonucleótido de qualquer uma das reivindicações 2-15, 17-27 e 29-33, em que o método referido não seja um método terapêutico praticado no corpo humano ou de um animal.

35. Um método de induzir a clivagem mediada por ARNase H de um ARN alvo, incluindo o método referido levar-se ao contacto o referido ARN alvo com o de qualquer uma das reivindicações 2-15, 17-27 e 29-33, em que o método

referido não seja um método terapêutico praticado no corpo humano ou de um animal.

36. O método da reivindicação 35, em que a referida clivagem mediada por RNase H seja levada a cabo devida à actividade da RNase associada com uma transcriptase reversa de um vírus.

37. O método da reivindicação 36, em que o vírus seja um vírus humano patogénico.

38. O método da reivindicação 37, em que o vírus humano patogénico seja seleccionado de entre o conjunto constituído por HIV e os hepadnavírus.

39. O método da reivindicação 38 em que o HIV seja seleccionado de entre o conjunto constituído por HIV-1 e HIV-2.

40. O método da reivindicação 38 em que o hepaADNvírus seja o vírus da hepatite B.

41. O método da reivindicação 38, em que a referida clivagem mediada por RNase H seja devido à actividade de RNase associada com um enzima RN H com origem em procariotas ou em eucariotas.

42. O método da reivindicação 41, em que a RNase H eucariótica seja uma RNase H de mamíferos.

43. O método da reivindicação 42, eu que a RNase H eucariótica seja uma RNase H humana.

44. O método da reivindicação 43, em que a ARNase H humana seja seleccionada de entre o conjunto constituído por ARNase H1 e ARNase H2.

45. Um método de impedir ou diminuir a translação, a transcrição reversa e/ou a replicação de um ARN alvo, incluindo este método:

a) levar-se o ARN alvo referido ao contacto com o oligonucleótido de qualquer uma das reivindicações 2-15, 17-27 e 29-33; e

b) permitir-se a clivagem do referido AR alvo pela ARNase H,

em que o método referido não seja um método terapêutico praticado no corpo humano ou de um animal.

46. Um método de levar a cabo um processo, em que o processo referido seja seleccionada de entre o conjunto constituído por:

(a) se induzir uma clivagem mediada por ARNase de um ARN H alvo;

(b) se impedir ou se diminuir a translação de um ARN alvo;

(c) se impedir ou se diminuir a transcrição reversa de um ARN alvo;

(d) se impedir ou se diminuir a replicação de um ARN alvo;

(e) se detectar a presença de um ARN alvo;

(f) se validar um gene alvo correspondente a um ARN alvo; e

(g) qualquer combinação de (a) a (f);

incluindo o método referido levar-se o referido ARN alvo ao contacto com o oligonucleótido de qualquer uma das reivindicações 2-15, 17-27 e 29-33, em que o método referido não seja um método terapêutico praticado no corpo humano ou no de um animal.

47. Um método para se levar a cabo um processo, em que o processo referido seja seleccionado de entre o conjunto constituído por:

(a) se induzir uma clivagem mediada por ARNase de um ARN H alvo;

(b) se impedir ou se diminuir a translação de um ARN alvo;

(c) se impedir ou se diminuir a transcrição reversa de um ARN alvo;

(d) se impedir ou se diminuir a replicação de um ARN alvo;

(e) se detectar a presença de um ARN alvo;

(f) se validar um gene alvo correspondente a um ARN alvo; e

(g) qualquer combinação de (a) a (f);

incluindo o método referido introduzir-se o oligonucleótido de qualquer uma das reivindicações 2- 15, 17-27 e 29-33, em que o método referido não seja um método terapêutico praticado no corpo humano ou no de um animal.

48. Uma composição que inclua o oligonucleótido de acordo com qualquer uma das reivindicações 2-15, 17-27 e 29-33 misturado com um veículo aceitável do ponto de vista farmacêutico.

49. A composição da reivindicação 48, em que a composição referida se destina a uma utilização seleccionada de entre o grupo constituído por:

(a) se induzir uma clivagem mediada por ARNase de um ARN H alvo num sistema;

(b) se impedir ou se diminuir a translação de um ARN alvo num sistema;

(c) se impedir ou se diminuir a transcrição reversa de um ARN alvo num sistema;

(d) se impedir ou se diminuir a replicação de um ARN alvo num sistema;

(e) se detectar a presença de um ARN alvo num sistema;

(f) se validar um gene alvo correspondente a um ARN alvo num sistema;

(g) se impedir ou tratar uma doença relacionada com um RNA alvo num sistema; e

(h) qualquer combinação de (a) a (g).

50. Uma embalagem comercial incluindo o oligonucleótido de acordo com qualquer uma das reivindicações 2-15, 17-27 e 29-33 em conjunto com instruções para a sua utilização.

51. A embalagem comercial da reivindicação 50, em que as instruções referidas se destinam a utilizações seleccionadas de entre o conjunto constituído por:

(a) se induzir uma clivagem mediada por ARNase de um ARN H alvo num sistema;

(b) se impedir ou se diminuir a translação de um ARN alvo num sistema;

(c) se impedir ou se diminuir a transcrição reversa de um ARN alvo num sistema;

(d) se impedir ou se diminuir a replicação de um ARN alvo num sistema;

(e) se detectar a presença de um ARN alvo num sistema;

(f) se validar um gene alvo correspondente a um ARN alvo num sistema;

(g) se impedir ou tratar uma doença relacionada com um RNA alvo num sistema; e

(h) qualquer combinação de (a) a (g).

52. A utilização do oligonucleótido de qualquer uma das reivindicações 2-15, 17-27 e 29-33 na preparação de um medicamento para impedir ou para diminuir a translação,

a transcrição reversa e/ou a replicação de um ARN alvo num sistema, em que o referido oligonucleótido entre em contacto como ARN alvo referido.

53. A utilização da reivindicação 52, em que o sistema referido seja seleccionado de entre o conjunto constituído por uma célula, um tecido ou um sujeito.

54. A utilização da reivindicação 53, em que a célula, o tecido ou o sujeito que se referiram sejam uma célula, um tecido ou um sujeito mamíferos.

55. A utilização da reivindicação 53, em que os referidos célula, tecido ou sujeito sejam respectivamente uma célula, um tecido ou um sujeito humanos.

56. A utilização do oligonucleótido de qualquer uma das reivindicações 2-15, 17-27 e 29-33 na preparação de um medicamento para induzir a clivagem mediada por RNase H de um ARN num sistema, em que o referido oligonucleótido entre em contacto com o ARN referido.

57. A utilização da reivindicação 56, em que a referida clivagem mediada por RNase H seja levada a cabo pela actividade da RNase H associada com a transcriptase reversa de um vírus.

58. A utilização da reivindicação 57, em que o vírus seja um vírus patogénico humano.

59. A utilização da reivindicação 58 em que o vírus patogénico humano seja seleccionado de entre o conjunto constituído por HIV e hepadnavírus.

60. A utilização da reivindicação 59 que o HIV seja seleccionado de entre o conjunto constituído por HIV-1 e HIV-2.

61. A utilização da reivindicação 59 em que o hepadnavírus seja o vírus da hepatite B.

62. A utilização da reivindicação 56, em que a referida clivagem mediada por uma ARNase H seja levada a cabo por uma actividade de ARNase H associada com um enzima ARNase H com origem eucariótica.

63. A utilização da reivindicação 62, em que a ARNase H eucariótica seja uma ARNase H de mamíferos.

64. A utilização da reivindicação 63, em que a ARNase H eucariótica seja uma ARNase H humana.

65. A utilização da reivindicação 64, em que a ARNase H humana seja seleccionada de entre o conjunto constituído por ARNase H1 e ARNase H2.

66. A utilização do oligonucleótido de qualquer uma das reivindicações 2-15, 17-27 e 29-33 para a preparação de um medicamento para impedir ou diminuir a translação a transcrição reversa e/ou a replicação de um ARN alvo num sistema, em que:

a) o referido ARN alvo entre em contacto com o referido oligonucleótido; e

b) uma ARNase H clive o referido ARN alvo.

67. A utilização do oligonucleótido de qualquer uma das reivindicações 2-15, 17-27 e 29-33 na preparação de

um medicamento para levar a cabo um processo seleccionado de entre o conjunto constituído por:

(a) induzir uma clivagem mediada por RNase de um ARN H alvo num sistema;

(b) impedir ou se diminuir a translação de um ARN alvo num sistema;

(c) impedir ou se diminuir a transcrição reversa de um ARN alvo num sistema;

(d) impedir ou se diminuir a replicação de um ARN alvo num sistema;

(e) detectar a presença de um ARN alvo num sistema;

(f) validar um gene alvo correspondente a um ARN alvo num sistema;

(g) impedir ou tratar uma doença relacionada com um RNA alvo num sistema; e

(h) qualquer combinação de (a) a (g);

em que o referido oligonucleótido entre em contacto com o ARN alvo referido.

68. A utilização do oligonucleótido de qualquer uma das reivindicações 2-15, 17-27 e 29-33 na preparação de um medicamento para levar a cabo um processo seleccionado de entre o conjunto constituído por:

(a) induzir uma clivagem mediada por ARNase de um ARN H alvo num sistema;

(b) impedir ou se diminuir a translação de um ARN alvo num sistema;

(c) impedir ou se diminuir a transcrição reversa de um ARN alvo num sistema;

(d) impedir ou se diminuir a replicação de um ARN alvo num sistema;

(e) detectar a presença de um ARN alvo num sistema;

(f) validar um gene alvo correspondente a um ARN alvo num sistema;

(g) impedir ou tratar uma doença relacionada com um RNA alvo num sistema; e

(h) qualquer combinação de (a) a (g);

em que o referido oligonucleótido seja introduzido no sistema referido.

Lisboa, 29 de Janeiro de 2009

Figure 1

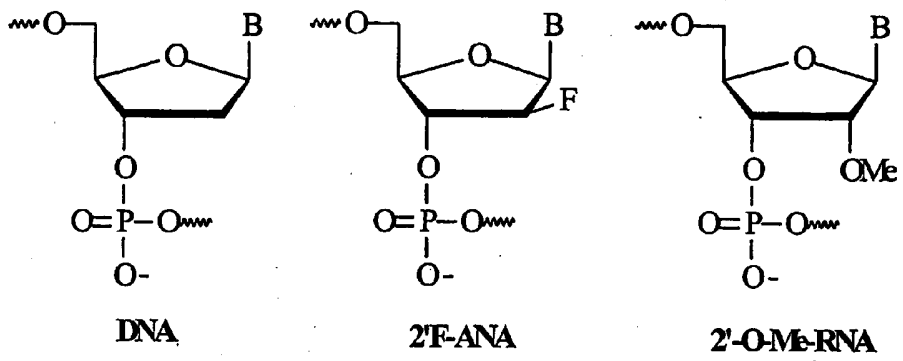
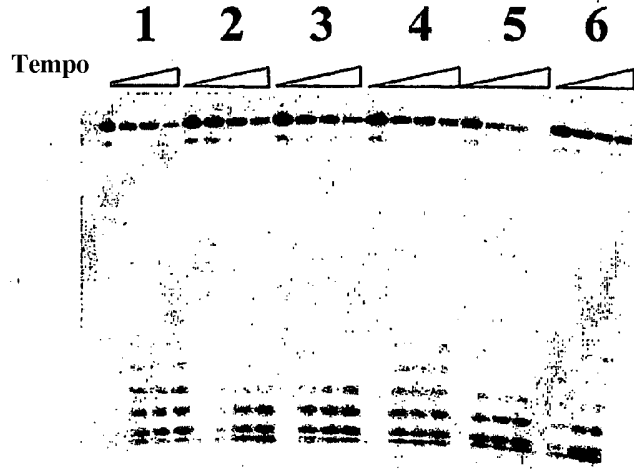


Figura 2

A)



B)

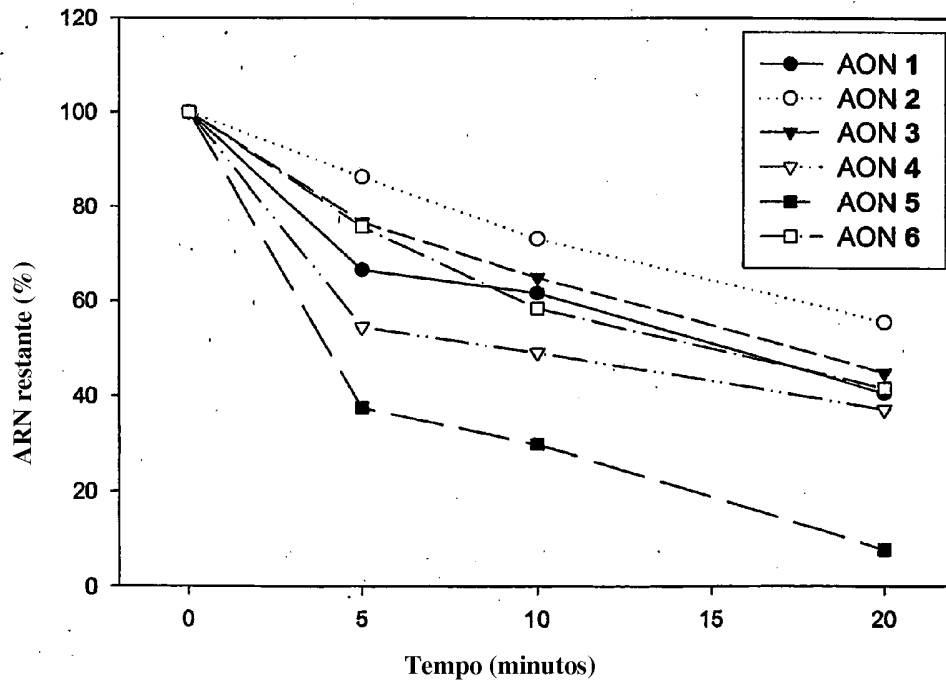


Figura 3

