



EESTI VABARIIK

PATENDIAMET

(11) **EE-EP 2 320 925 B1**(51) Int. Cl.  
C12N 15/113 (2010.01)  
A61K 31/7088 (2006.01)(12) **EESTIS KEHTIVA EUROOPA PATENDI  
PATENDIKIRJELDUSE TÕLGE**

(10) Registreeringu number: <b>E011736</b>	(73) Patendiomanik:  <b>Regenesance B.V.</b> <b>Meibergdreef 9, D3307,</b> <b>1105 AZ Amsterdam Zuidoost, NL</b>
(11) Patendikirjelduse tõlke number: <b>EE-EP 2 320 925 B1</b>	(72) Leiutise autorid:  <b>BAAS, Frank</b> <b>Surinamelaan 17a,</b> <b>NL-1213 VL Hilversum, NL</b>
(30) Prioriteediandmed: <b>10.07.2008</b> <b>US 79501 P</b>	<b>FLUITER, Kees</b> <b>Cooperatiehof 4-1,</b> <b>NL-1073 JR Amsterdam, NL</b>
(96) Euroopa patenditaotluse esitamise kuupäev: <b>10.07.2009</b>	(74) Patendivolinik:  <b>Alla Hämmalov</b> <b>INTELS Patendibüroo OÜ</b> <b>Magasini 12, 51005 Tartu, EE</b>
(96) Euroopa patendi-taotluse number: <b>09788222.9</b>	
(97) Euroopa patendi väljaand-misest teatamise kuupäev: <b>23.12.2015</b>	
(97) Euroopa patendi number: <b>EP 2 320 925</b>	
Patendikirjelduse tõlke esitamise kuupäev: <b>23.03.2016</b>	
Patendikirjelduse tõlke avalikustamise kuupäev: <b>16.05.2016</b>	

(54) **Komplementantagonistid ja nende kasutamine**

## KOMPLEMENTANTAGONISTID JA NENDE KASUTAMINE

### LEIUTISE VALDKOND

5 [0001] Käesolev leiutis seisneb koostistes ja meetodites komplement koostisosa 6 (C6) ekspresseerimise moduleerimiseks. Ühe teostusviisi kohaselt seisneb leiutis antagonistides, mis piiravad või blokeerivad antud valgu ekspresseerimise. Leiutis leiab kasutust suurel hulgal rakendustes, sealhulgas kasutamine närvi regereerimise edendamiseks imetajatel pärast akuutseid või kroonilisi kahjustusi närvisüsteemis.

10

### LEIUTISE TAUST

[0002] Komplementisüsteem hõlmab umbes kolmekümne (30) valgu rühma, mis teadaolevalt on immuunvastuse üheks tähtsaks osaks. Süsteem võib olla aktiveeritud klassikalise (tavaliselt antikehast sõltuva) või alternatiivse (tavaliselt antikehast sõltuva) raja poolt. Aktiveerimine ükskõik kumma raja üleselt toob kaasa ensüümi tekke, mida nimetatakse C5 konvertaasiks. Konvertaas aitab kaasa C5b nimetatava valgu moodustamisele, mis lisaks muudele funktsioonidele käivitab, nii nagu seda sageli nimetatakse, terminalkomplementi raja. Selle raja eesmärgiks on moodustada membraaniründe kompleks (MAC) pealetungiva patogeeni membraani siseselt, mille tagajärjeks on lüüsi toimumine. MAC on reeglina moodustatud komplementvalkude C6, C7, C8 ja (C9)<sub>n</sub> järjestikkooslusest koos C5b-ga. Vt üldteave Walport, M.J. 2001. N. Engl. J. Med. 344: 1058-1066: ning 1140-1144.

25 [0003] Komplementisüsteemi inhibiitoreid on teadaolevalt olemas nii looduslikke kui ka sünteetilisi.

[0004] Nende hulgas on näiteks teatavad väikemolekulid, valgud, antikehad, flavonoidid ning polüsahhariidid. Vt S. Bureeva *et.al.* (2005) Drug Discovery Today 10: 1535.

- [0005] Neuronaalne degeneratsioon on paljude akuutsete ja krooniliste neuro-paatiate tunnuseks. Üks aksonaalse degeneratsiooni vorm, mida nimetatakse Wallerian Degeneration (WD), seisneb väga destruktiivses protsessis, mille korral vigastuse distaalne aksoni osa sureb. Esialgsed kõrvalekalded on täheldatavad juba mõni tund pärast vigastust, millele järgneb veelgi ilmsem WB päeva või kahe möödudes (Ballin RH ja Thomas PK (1969) *Acta Neuropathol (Ber/)* 14: 237. Näiteks varisevad kokku müeliinkestad, mis neelatakse alla kõrvaldavate rakkude poolt (Leonhard *et.al.* (2002) *Eur. J. Neurosci.* 16: 1654). Nimetatud protsessid seonduvad võimaliku närvikahjustuse ja regenereerimisega. On olemas andmeid selle kohta, et kindlad komplement koostisosad vahendavad müeliini fagotsütoosi (Dailey *et.al.* (2002) *J. Neurosci* 18: 6713; ning Liu (1999) *J. Peripher. Nerv. Syst.* 4: 123). Kuigi see ei ole hetkel veel päris kindel, kas komplement koostisosad on nimetatud protsesside vahendamiseks vajalikud, on MAC moodustumist kirjeldatud olulise osana kiire WD juures (Ramaglia, V. *et.al.* (2007) *J. Neurosci.* 27: 7663).
- 15 Rahvusvahelises patendinõudluses WO 2008/044928 on kirjeldatud komplemendi inhibeerimist närvi regenereerimise tõhustamiseks. Kirjeldatud komplementinhibiitorid hõlmavad näiteks antikehi, nukleiinhappe inhibiitoreid, komplementregulaatoreid, kobra mürgi faktorit, polüanioonseid inhibiitoreid ning sünteetilisi või looduslikke väikemolekule.
- 20 [0006] Teada on terve hulk nukleiinhappe antagonistide. Näiteks on kindlaks tehtud erinevate antisens oligomeeride kasulikkus seonduvalt mitmete terapeutiliste, diagnostiliste ja teadusuuringute rakendustega (vt nt Cheson, BD (2007) *Ther Clin Risk Manag.* 3(5):855 (milles räägitakse näiteks soodsatest kliiniliste uuringute andmetest obliterseeni osas). Lühike interfereeruv RNA (siRNA), mis on üks RNA antagonistide tüüp, arvatakse olevat kasulik terapeutiline ja uurimuslik vahend (McManus and Sharp, (2002) *Nature Reviews Genetics* 3:737. Otstarbekohaselt on kajastamist leidnud ka muud RNA antagonistid nagu näiteks RNAi-indutseeritud vaigistavad kompleksid koos katkematu reisija ahelga (Leuschner, *et.al.* (2006) *EMBO Reports* 7:314).

[0007] Seega on olemas vajadus antagonistide järele, mis blokeerivad või inhibeerivad imetaja komplement komponent 6 (C6) valgu. Veelgi suurem otstarbekohane vajadus on antagonistide järele, mida saab kasutada neuropaatiate ennetamiseks, ravimiseks või nende tõsiduse leevendamiseks, mis on teadaolevalt või arvatavasti seotud MAC-i moodustumisega.

### LEIUTISE KOKKUVÕTE

[0008] Käesolev leiutis seisneb antagonistides, mis pärsivad või blokeerivad imetaja komplement komponent 6 (C6) valgu aktiivsuse. Näitlikustavad antagonistid on kasutatavad neuropaatiate ennetamiseks, ravimiseks või tõsiduse leevendamiseks, mis on teadaolevalt või arvatavalt seotud membraaniründe kompleksi (MAC) moodustumisega. Konkreetsed antagonistid seisnevad üheaahelalistes ja mitmeahelalistes nukleiinhapetes (tüüpiliselt ühe, kahe või kolme ahelaga), mis blokeerivad või pärsivad imetaja komplement 6 (C6) valgu ekspresseerimise aktiivsust. Leiutis leiab kasutust suurel hulgal rakendustes, sealhulgas kasutamine närviregeneratsiooni edendamiseks imetajatel pärast akuutset või kroonilist närvikahjustust.

[0009] Ühest aspektist seisneb käesolev leiutis ühe-ahelalises antisenss oligomeeris pikkusega ligikaudu 10 kuni 50 nukleotiidi, külgneva nukleoaluse järjestusega, mille järjestus on vähemalt 80% ulatuses identne nukleiinhappe komplementaarse piirkonnaga, mis kodeerib KOMPLEMENT KOOSTISOSA 6 (C6) järjestuse, mis kannab tähistust SEQ ID NO: 1; kusjuures oligomeer hõlmab vähemalt ühte nukleotiidi analoogi ja on võimeline vähendama C6 mRNA ekspresseerimise taset imetajal vähemalt 20% võrra, nii nagu see on qPCR katsega määratav, mille korral nimetatud oligomeer on sihitud nukleotiididele nagu 112-152, 433-473, 546-586, 706-746 või 1015-1055 algusega SEQ 1 D NO 1 ATG lähtesaidist.

[0010] Lihtsustavalt tähistatakse lauset „imetaja komplement koostisosa 6 (C6)“ lühendiga „C6“, „imetaja C6 valg“ ja muul sarnasel viisil, kui ei ole märgitud teisiti.

[0011] Teise aspekti kohaselt seisneb leiutis kahe-ahelalises nukleiinhappe ühendis, mis eelistatavalt hõlmab esimest oligomeeri (reisija ahel) ja teist oligomeeri (antisenss ahel), mis on sihitud imetaja C6 valku kodeerivale nukleiinhappe molekulile, milleks otstarbekohaselt on inimese, roti või hiire C6. Ühe näite kohaselt hõlmavad ühendi kõik ahelad alates ligikaudu 12 kuni ligikaudu 35 nukleiinalust ning antisenss ahel hõlmab katkematut nukleiinaluse järjestust, mille järjestus on vähemalt 80% ulatuses identne nukleiinhappe vastava piirkonnaga, mis kodeerib KOMPLEMENT KOOSTISOSA 6 (C6) järjestuse, mis kannab tähistust SEQ ID NO: 1 (inim). Oligomeer hõlmab vähemalt ühte oligonukleotiidi analoogi.

[0012] Teise aspekti kohaselt seisneb leiutis koostises, mis hõlmab RNA kompleksi koos kaheaahelalise tuumpiirkonnaga, mis hõlmab antisenss ahelat, mis koosneb katkematust nukleiinaluse järjestusest, mille järjestus on vähemalt 80% ulatuses identne nukleiinhappe vastava piirkonnaga, mis kodeerib KOMPLEMENT KOOSTISOSA 6 (C6) järjestuse, mis kannab tähistust SEQ ID NO: 1 (inim). Oligomeer hõlmab vähemalt ühte oligonukleotiidi analoogi, RNA kompleks hõlmab lisaks katkematut reisija ahelat, mis on antisenss ahelaga hübridiseeritud.

[0013] Käesolev leiutis on kasulik imetaja C6 nagu näiteks inimese C6 ekspresseerimise pärssimise või inhibeerimise meetodis rakus või koes. Ühe näite kohaselt hõlmab meetod etappi raku või koe kontakti viimiseks vähemalt ühe oligomeeriga, kahe-ahelalise ühendiga või mõne muu leiutisekohase koostisega koguses, millest piisab C6 valgu ekspresseerimise pärssimiseks või inhibeerimiseks rakus või koes.

[0014] Leiutis on ühtviisi kasulik meetodis, mis on mõeldud komplemendisüsteemi, seda otstarbekohaselt MAC soovimatus moodustumises seisnevas soovimatust aktiivsusest vahendatud häire sümptomite ravimiseks, ennetamiseks või pärssimiseks. Ühe näite kohaselt hõlmab meetod leiutisekohase koostise manustamise etappi (terapeutiliselt või profülaktiliselt) seda vajavale imetajale koguses, millest piisab MAC moodustumise pärssimiseks või blokeerimiseks imetajal. Eelistatavaks,

käesoleva leiutisega hõlmatavaks häireks on selline häire, mille korral osutub närviregeneratsioon puudulikuks või mõnel muul viisil häirituks.

[0015] Lisaks on käesolev leiutis kasulik meetodis närvi regenererimise edendamiseks imetajal, hõlmates vähemalt ühe, leitusekohase koostise annuse manustamise etappi (terapeutiliselt või profülaktiliselt) imetajale koguses, millest piisab C6 ekspresseerimise pärssimiseks või inhibeerimiseks imetajal ning viimase närviregenererimise edendamiseks. Eelistatavalt kaasneb sellega ka MAC moodustumise pärssimine või inhibeerimine imetajal.

[0016] Leiutise kasutamisega kaasneb olulisi eeliseid.

10 [0017] Näiteks on olemas andmeid selle kohta, et maks on mõningatel juhtudel võimeline nukleiinhappeid sekvestreerima ja pärssima nukleiinhappe aktiivsust maksaväliste sihtmärkide terapeutilisel põhinevalt.

[0018] Samas seisneb maks ühes tähtsaimas, komplementvalgu sünteesi saidis. Seega on alust arvata, et leiutisekohaste ühendite sekvestreerimine mõjutab 15 soodsalt C6 valgu ekspresseerimise pärssimist või blokeerimist.

[0019] Lisaks on leiutisekohased ühendid kasutatavad eraldi või kombineerituna muude ainetega (sealhulgas vähemalt ühe, leiutisekohase muu koostisega) MAC moodustumise pärssimiseks või inhibeerimiseks imetajal, kes kannatab akuutse või kroonilise neuropaatia all või kelle juures on alust seda kahtlustada. On alust arvata, et 20 leiutise kasutamine enne kahjustuste teket, kahjustuste tekke ajal ja pärast kahjustuste teket aitab edendada närvi regenererimist imetajal.

[0020] Leiutise täiendavad kasutused ja eelised selgavad alljärgnevatest kirjeldustest.

## JOONISTE LÜHIKIRJELDUS

25

[0021] Joonisel 1 on kujutatud graafik, millelt nähtuvad C6 komplement mRNA tasemed kolme päeva möödumisel ravist komplement antisenss LNA-ga hiirtel. Partiinumbrite (Y-telg) tähendusi on selgitatud Näites 2.

Joonisel 2 on kujutatud graafik, millelt nähtub membraaniründe kompleksi (MAC) aktiivsuse tõhusus hiire seerumis pärast ravi LNA-modifitseeritud oligonukleotiididega, mis on sihitud komplementvalkudele C6, C8a või C8b. Oligonukleotiidide manustati ühe nädala jooksul.

- 5 Joonisel 3 on kujutatud graafik, millelt nähtub oligo 1010 (SEQ ID NO. 413) erinevate koguste manustamine hiirele versus C6 mRNA korrigeeritud tase. Samuti on sellel kujutatud vastava siRNA konstrukti tulemused.

### ÜKSIKASJALIK KIRJELDUS

10

[0022] Nagu öeldud, seisneb leiutis antagonistides, mis blokeerivad või inhibeerivad imetaja C6 aktiivsust. Käesolevas kontekstis kannab „nukleiinhappe antagonist“ ühendi tähendust, mis hõlmab või sisaldab nukleiinhapet ja ühte või rohkemat nukleiinhappe analoogi, nii nagu seda on käesolevaga kirjeldatud. „RNA antagonist“  
15 tähendab nukleiinhappe antagonisti, mille otstarbekohaseks funktsiooniks on piirata või blokeerida konkreetse RNA(s) ekspresseerimine.

[0023] Ühest aspektist seisneb käesolev leiutis oligomeersetes ühendites (oligomeerid) kasutamiseks imetaja C6 kodeerivate nukleiinhappe molekulide funktsiooni piiramiseks, otstarbekohaselt toodetava C6 koguse vähendamiseks. Näiteks olgu  
20 siinkohal toodud antisenss ühend. Seatud eesmärk on täidetud näiteks antisenss ühendite tarnimise teel, mis otstarbekohaselt hübridiseeruvad ühe või enama, imetaja C6 kodeeriva nukleiinhappega. Käesolevas kontekstis kannavad terminid „sihtmärk nukleiinhape“ ja „C6 kodeeriv nukleiinhape“ imetaja C6 kodeeriva DNA, imetaja C6 kodeeriva RNA (sealhulgas eel-mRNA ja mRNA), mis on  
25 transkribeeritud nimetatud DNA-st, nagu ka cDNA, mis on tuletatud nimetatud RNA-st, tähendust. Otstarbekohaseks imetaja C6-ks on inimese, cDNA järjestusega kodeeritud komplement koostisosa 6 (C6), mis on Tabelis 3 tähistatud järgmiselt (SEQ ID NO: 1). Teiseks otstarbekohaseks imetaja C6-ks on roti ja hiire C6 järjestused, mis on vastavalt tähistatud SEQ ID Nr-tega 402 ja 403.

[0024] Käesolevas kontekstis kannab „oligonukleotiid“ leiutisekohase ühendi komponendi tähendust, nagu selleks on näiteks ribonukleiinhappe (RNA) või deoksüribonukleiinhappe (DNA) oligomeer või polümeer või selle analoogid. Nimetatud termin hõlmab oligonukleotiide, mis on moodustatud looduslikult esinevatest nukleiinalustest, suhkrutest ja kovalentselt internukleotiidsetest (karkass) linkidest, samuti oligonukleotiididest, millel on looduslikult mitte esinevaid osi. Sellised modifitseeritud või asendatud oligonukleotiidid on sageli sünnipäraste vormide ees eelistatavad nende soovitud omaduste poolest, nii nagu nendeks on näiteks täiuslikum rakkude omastamisvõime, täiuslikum afiinsus nukleiinhappe sihtmärgi osas ja suurem stabiilsus nukleaaside olemasolu korral. Samamoodi kannab leiutisekohane „oligomeer“, mis hõlmab mitmeid vorme, oligonukleotiidi tähendust, mis sisaldab looduslikult esinevaid nukleiinaluseid, suhkruid ja kovalentseid karkassi linke, samuti ühte või mitut selle analoogi sisaldavat konstrukti.

[0025] Käesolevas kontekstis kannab termin „nukleotiid“ 2-deoksüriboos (DNA) üksuse või riboos (RNA) üksuse tähendust, mis on seotud läbi oma number üks süsiniku lämmastikalusega, milleks on näiteks adeniin (A), tsütosiin (C), tümiin (T), guaniin (G) või uratsiil (U) ning mis on seotud läbi oma number viis süsinikuaatomi internukleotiidse siderühmaga (nii nagu seda on allpool määratletud) või terminali rühmadega (nii nagu seda on käesolevaga määratletud). Samal moel kannab antud kontekstis kasutatuna termin „nukleotiid“ RNA üksuste (või monomeeride) tähendust, mis sisaldavad riboosi üksust, mis on seotud läbi oma number üks süsiniku lämmastikalusega, milleks on näiteks A, C, T, G või U, ning mis on seotud läbi oma number viis süsinikuaatomi fosfaatrühmaga või terminalrühmaga. Samal moel kannab termin „nukleotiid“ ka DNA üksuste (või monomeeride) tähendust, mis sisaldavad 2-deoksüriboos üksust, mis on seotud läbi oma number üks süsiniku lämmastikalusega, milleks on näiteks A, C, T, G või U, ning mis on seotud läbi oma number viis süsinikuaatomi fosfaatrühmaga või terminalrühmaga. Termin „nukleotiid“ hõlmab ühtviidi selliste RNA ja DNA monomeeride variante või analooge, nagu neid on käesolevaga kirjeldatud.



[0026] „Nukleosiid“ kannab 2-deoksüriboos (DNA) üksuse või riboos (RNA) üksuse tähendust, mis on seotud läbi oma number üks süsiniku lämmastikalusega, milleks on näiteks adeniin (A), tsütosiin (C), tümiin (T), guaniin (G) või uratsiil (U). Samal moel kannab antud kontekstis kasutatuna termin „nukleosiid“ RNA üksuste  
5 (või monomeeride) tähendust, mis sisaldavad riboosüksust, mis on seotud läbi oma number üks süsiniku lämmastikalusega, milleks on näiteks A, C, T, G või U. Samal moel kannab termin „nukleosiid“ ka DNA üksuste (või monomeeride) tähendust, mis sisaldavad 2-deoksüriboos üksust, mis on seotud läbi oma number üks süsiniku lämmastikalusega, milleks on näiteks A, C, T, G või U. Termin „nukleosiid“ hõlmab  
10 ühtviisi ka selliste RNA ja DNA monomeeride variante või analooge, nagu neid on käesolevaga kirjeldatud. On arusaadav, et eraldiseisvad nukleosiidid on omavahel lingitud internukleotiidse siderühma üleselt, nagu selleks on näiteks looduslikult esinevad ja sünteetilised sidemed, nii nagu neid on käesolevaga kirjeldatud.

#### 15 Antisenss oligomeerid

[0027] Soovimata piirduda teooriaga, on alust arvata, et oligomeerse ühendi spetsiifiline hübridiseerimine oma sihtmärk nukleiinhappega mõjutab nukleiinhappe normaalset funktsiooni. Sellist sihtmärk nukleiinhappe funktsiooni moduleerimist,  
20 seda spetsiifiliselt hübridiseerivate ühendite toimetel, nimetatakse üldiselt „antisensiks“. DNA juures seeläbi mõjutatavateks funktsioonideks on näiteks replikatsioon ja transkriptsioon. Mõjutatavad RNA funktsioonid hõlmavad vähemalt ühte elutähtsat funktsiooni, nagu selleks on näiteks RNA translokatsioon valgu translatsiooni saidile, valgu translatsioon RNA-st, RNA splaissimine ühe või  
25 enama mRNA liigi saamiseks ning katalüütiline aktiivsus, mis võib olla RNA poolt kaasatav või lihtsustatud. Nimetatud, sihtmärk nukleiinhappega mõjutamise kõikehõlmav mõju väljendub imetaja C6 valgu ekspresseerimise moduleerimises. Käesoleva leiutise kontekstis kannab „moduleerimine“ kas geeni ekspresseerimise kasvu (stimuleerimine) või langust (inhibeerimine) seonduvalt otstarbekohase

mõjutamisega, nagu selleks on näiteks ekspresseerimine oligomeeri puudumisel. Käesoleva leiutise kontekstis on geeniekspressiooni moduleerimise eelisvormiks inhibeerimine ja mRNA on üheks sihtmärgiks.

[0028] Käesolevas kontekstis kannab „hübridiseerimine“ üldiselt vesiniku sidumise tähendust, milleks võib olla nii Watson-Crick, Hoogsteen kui ka Hoogsteeni ümberpööratud vesiniku sidumine komplementaarse nukleosiidi või nukleotiidi aluse vahel. Näiteks on vesiniksidemete moodustumise toimetel paaruvateks komplementaarseteks nukleolusteks adeniin ja tümiin. „Komplementaarne“ kannab käesolevas kontekstis täpse paarumise võime tähendust kahe nukleotiidi vahel. Näiteks juhul, kui nukleotiid oligonukleotiidi kindlal positsioonil on vesiniku sidumise võimega nukleotiidiga DNA või RNA molekuli samal positsioonil, siis käsitletakse oligonukleotiidi ning DNA-d või RNA-d omavahel antud positsioonil komplementaarsena. Oligonukleotiid ning DNA või RNA on omavahel komplementaarsed, kui piisaval hulgal vastavaid positsioone igas molekulis on hõivatud nukleotiidide poolt, mis on suutelised vesiniksidemeks üksteisega. Seega kannavad terminid „spetsiifiliselt hübridiseeritav“ ja „komplementaarne“ piisava komplemetaarsusastme või täpse paarumise tähendust, nii nagu selleks on stabiilne ja spetsiifiline sidumine, mis toimub oligonukleotiidi ning DNA või RNA sihtmärgi vahel.

[0029] On arusaadav, et leiutisekohase ühendi järjestus ei pea tingimata olema 100% komplementaarne selle sihtmärk nukleinhappe omaga, et olla spetsiifiliselt hübridiseeritav. Antisenss ühend on näiteks spetsiifiliselt hübridiseeritav, kui see seob ühendi sihtmärk DNA või RNA molekuliga, mõjutab DNA või RNA molekuli normaalset funktsiooni eesmärgiga tuua kaasa selle kasulikkuse kadu ning kui on olemas piisav komplementaarsuse aste, et hoida ära antisenss ühendi mittespetsiifiline sidumine mittesihtmärk järjestustega tingimustes, milles on soovitud spetsiifilise sidumise toimumine, seda näiteks *in vivo* katsete või terapeutilise ravi füsioloogiliste tingimuste juures ning *in vitro* katsete korral katse läbiviimise tingimustes.

[0030] Leiutisekohased eelisoligomeerid identifitseeritakse tüüpiliselt *in silico* mudelil ja, seda mõnedel juhtudel, testimisel *in vitro* ja/või *in vivo*. Leiutisekohaste eelisjärjestustega komplementaarseid sihtmärksaite nimetatakse alljärgnevalt „aktiivsaitideks“, mis seisnevad ka eelistatud sihtmärksaitides. Seega hõlmab leiutis  
5 nimetatud aktiivsaitidega hübridiseeruvaid ühendeid.

[0031] Näiteks seisneb leiutis konkreetsete oligomeeride kasutamises antisenss ühenditena. Antisenss või leiutisekohase ühendi „sihtimine“ konkreetsele nukleiinhappele seisneb mitmeetapilises protsessis. Reeglina algab sihtimisprotsess nukleiinhappe järjestuse identifitseerimisega, mille funktsiooni moduleeritakse.  
10 Selleks võib olla näiteks rakugeen (või geenist transkribeeritud mRNA), mille ekspresseerimine on seotud konkreetse häire või haiguse olekutega, või siis haigustekitaja nukleiinhappe molekul. Käesoleva leiutise korral on sihtmärgiks imetaja C6 valku kodeerivale nukleiinhappe molekulide, otstarbekohaselt inimese, roti ja hiire C6 järjestused, mis on esitatud Tabelis 3 (SEQ ID Nr-d 1,  
15 402 ja 403). Sihtimisprotsess hõlmab ka saidi või saitide kindlaksmääramist antud geeni siseselt antisenss koostoime saavutamiseks, sealhulgas, kuid mitte ainult, valgu ekspresseerimise detekteerimist või moduleerimist.

[0032) Täiendavad võimalused seisnevad vähenenud, soovimatute sihtmärkidega risthübridiseerumise võimega oligomeeride selekteerimises ja keeruliste  
20 sekundaarsete struktuuride tagamises lahuses. Leiutisekohased eelisoligomeerid on selekteeritavad veel piiratud toksilise ja miRNA-sarnase söötme alade mudelite otstarbel ja reisija ahelast vahendatavateks möödasuunamisteks. Eelisoligomeerid leiutisekohaseks kasutamiseks on täpsemalt esitatud näiteks Tabelites 4A kuni 4E ja Tabelites 5A kuni 5F.

[0033] Tabelites 4A kuni 4E on inimese C6 järjestuse eelisihtmärkideks järjestused  
25 SEQ ID Nr-tega 2, 24, 46, 68, 90, 112, 134, 156, 178, 200, mis on Tabelis 3 tähistatud järgmiselt (SEQ ID NO 1), koos järjestustega, mis järgnevad vahetult igale näidatud oligomeerile vähenevas eelistatuse järjekorras. Seega on SEQ I D NO: 2 üks eelistatuid inimese C6 sihtmärke oligomeeridega, mis on tähistatud

järjestustega SEQ ID Nr-d: 3 kuni 23, mis on eelistatavad vähenevas eelistatuse järjekorras sihtimiseks antud saidile. Samuti nähtub Tabelitest 4A kuni 4E, et eelissihhtmärgid hõlmavad ka neid järjestusi, mis on tähistatud SEQ ID Nr-tega: 222, 225, 228, 231, 234, 237, 240, 243, 246 ning 249 ja RNA ning nende  
5 ümberpööratud komplemendiversioone, mis on esitatud vahetult iga sihtmärgi all. Roti ja hiire C6 omavad oodatult identseid või siis väga sarnaseid sihtmärksaite.

**[0034]** Lisaks näitavad eelisoligomeerid teatavate teostusviiside korral 100% järjestuse kattuvust inimese, roti ja hiire järjestuste vahel (nt Tabelid 5A kuni 5F; SEQ ID NO: 292). Arusaadavalt on sellised oligomeerid kasutatavad nii inimese, roti  
10 kui ka hiire juures ilma märkimisväärse mittevastavusega või vajaduseta mitme oligomeeri mudeli järele iga imetaja juures.

**[0035]** Ka muud, konkreetseid leiutisekohaseid oligomeerid osutuvad sihtmärgi jaoks piisavalt komplementaarseteks, hübridiseerides näiteks piisavalt hästi ja piisava spetsiifilisusega, et saavutada soovitud tulemused. Soovitud mõjuks on imetaja  
15 C6 valgu, nagu selleks on näiteks inimese, roti või hiire C6 valk, ekspresseerimise piiramine või täielik inhibeerimine, mis väljendub vastava C6 mRNA koguse piiramise või täieliku inhibeerimisena määratuna polümeraasi ahelreaktsioonina (PCR).

**[0036]** Üks PCR meetod näeb ette oligonukleotiidpraimerite väljatöötamise  
20 kasutamiseks PCR reaktsioonides eesmärgiga võimendada vastavaid DNA järjestusi cDNA-st või genoomsest DNA-st, mis on saadud mis tahes otstarbekohasest organismist. Sobivaks cDNA-ks on näiteks inimese C6 järjestus, mis kannab tähistust Tabelis. 1 (SEQ ID NO: 1). PCR praimerite väljatöötamise meetodid ja PCR kloonimine on asjatundjale hästi teada ja neid on kirjeldanud  
25 Sambrook *et al* (1989) väljaandes *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N.Y.), mida alljärgnevalt nimetatakse „Sambrook“, vt ka Innis *et al*, eds. (1990) *PCR Protocols: A Guide to Methods and applications* (Academic Press, New York); Innis ja Gelfand, eds. (1995) *PCR Strategies* (Academic Press, New York); ning Innis ja Gelfand, eds. (

1999) PCR Methods Manual (Academic Press, New York). Valdkonnas laialdaselt kasutatavateks PCR meetoditeks on, kuid mitte ainult, meetodid, milles kasutatakse paarunud praimereid, pesastatud praimereid, üksikuid spetsiifilisi praimereid, degenerereerunud praimereid, geeni-spetsiifilisi praimereid, vektor-spetsiifilisi praimereid, osaliste-mittesobivustega praimereid ja muud sellist. qPCR teostamise meetodit on kirjeldatud Näite jaotises.

[0037] Soovi korral osutub võimalikuks konkreetse oligomeeri lisafunktsionaalsuse testimine ja valikuliselt kvantifitseerimine niinimetatud kogu-hemolüütilise katse teel ((CH50) katse). Selle lähenemise korral isoleeritakse plasma, veri või muu sobiv bioloogiline proov imetajalt, kellele manustati ühte või rohkemat oligomeeri. Katsega mõõdetakse katseproovi võimet lüüsida 50% lamba erütrotsüütide standardiseeritud suspensioonist, mis on kaetud anti-erütrotsüüt antikehaga. Kogu komplementaktiivsust nimetatakse hälbivaks juhul, kui mis tahes komponent on puudulik. Vt nt Kabat, E. A ja Mayer, M. M. (1961) Complement and Complement Fixations väljaandes: Experimental Immunochemistry, 2nd Edition, Charles C. Thomas, Springfield, IL. Lk 133 kuni 240.

[0038] Teise lähenemise kohaselt toimub MAC moodustumise tuvastamine ja kvantifitseerimine vajadusel immunoloogiliste lähenemiste alusel, mida on kirjeldanud Ramaglia, V. *et al* (2007) J. Neurosci. 27:7663.

[0039] Leiutisekohased oligomeerid näitavad häid omadusi mRNA blokeerimisel või piiramisel, mis kodeerib inimese, roti või hiire C6. Otstarbekohaselt on sellised oligomeerid võimelised vähendama konkreetse C6 mRNA taset imetajal, nagu selleks on näiteks inimene, rott või hiir, vähemalt ligikaudu 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, kuni ligikaudu 100% määratuna qPCR katsega. Lisaks on eelisligomeerid imetajast peremehel nagu näiteks närilisel sisuliselt mittetoksilised. See tähendab, et imetaja katse käigus neisse ei surnud. Katse raames toimus terapeutilise koguse oligomeeri manustamine imetajale sobiva perioodi (nt ligikaudu 1 kuni ligikaudu 10mg/kg IP igapäevaselt mõne päeva või nädala vältel) jooksul, imetajalt eemaldati maks ja seda kasutati nukleiinhappe, tüüpiliselt RNA,

allikana. Maksast standardprotseduuridel valmistatud nukleiinhappel tehti qPCR eesmärgiga mõõta C6 mRNA tasemed, milleks kasutati Roche Lightcycler 480 ja universaalsonde vastavalt tootjapoolsetele soovitustele. Katset on illustratiivselt kujutatud Joonisel 1, mille käigus leiti, et paljud leiutisekohased oligomeerid osutusid suhteliselt mittetoksiliseks ja suuteliseks piirama hiire C6 mRNA-d vähemalt ligikaudu 20%, 30%, 40%, vähemalt ligikaudu 50%, 60%, 70%, vähemalt ligikaudu 80% või rohkem kuni ligikaudu 90%, 95%, kuni ligikaudu 99% või 100%. Käesolevas kontekstis kannab „oligomeeri valideerimiskatse“ eelneva spetsiifilise katse tähendust, mis kinnitas mittetoksilisust ja C6 mRNA ekspresseerimise inhibeerimise võimet *in vivo*.

**[0040]** Oligomeeride eeliskasutus seisneb neuropaatiate tõsiduse ennetamises, ravimises või piiramises, mis teadaolevalt või arvatavasti on seotud MAC moodustumisega.

**[0041]** Olgugi et leiutis seisneb ühes sobivas oligomeeris või oligomeeride kombinatsioonis, on üldiselt eelisoligomeeriks selline oligomeer, mille pikkus jääb vahemikku ligikaudu 10 kuni ligikaudu 50 nukleiinalust, näiteks pikkusega vahemikus ligikaudu 12 kuni ligikaudu 45 nukleiinalust, vahemikus pikkusega ligikaudu 15 kuni ligikaudu 40 nukleiinalust, vahemikus pikkusega ligikaudu 16 kuni ligikaudu 35 nukleiinalust koos pikkusega ligikaudu 18 kuni ligikaudu 30 nukleiinalust, mis on kasulikud mitmeteks rakendusteks. Eelistatavalt hõlmab oligomeer külgnevat nukleiinaluse järjestust kogupikkusega vahemikus 10 kuni 50 nukleiinalused, näiteks pikkusega vahemikus ligikaudu 12 kuni ligikaudu 45 nukleiinalust, vahemikus ligikaudu 15 kuni ligikaudu 40 nukleiinalust, vahemikus ligikaudu 16 kuni ligikaudu 35 nukleiinalust koos pikkusega ligikaudu 18 kuni ligikaudu 30 nukleiinalust, mis on kasulikud mitmeteks rakendusteks, mille korral on külgnev nukleiinaluse järjestus vähemalt 80% ulatuses identne järjestusega, nagu näiteks ligikaudu 85%, ligikaudu 90%, ligikaudu 95% või ligikaudu 98% ulatuses identne järjestusega nukleiinhappe vastavas piirkonnas, mis kodeerib asjaomase imetaja C6. Otstarbekohaselt huvipakkuvaks järjestuseks on inimese C6, mida tähistatakse SEQ ID NO: 1, roti C6, mida tähistatakse SEQ ID

NO: 402 ja hiire C6, mida tähistatakse SEQ 10 NO 403 (samuti SEQ 10 looduslikult esinevad alleelsed variandid nr-d: 1, 402 ja 403). „Looduslikult esinevad alleelsed variandid“ võidakse identifitseerida tuginevalt valdkonnas laialdaselt kasutatavatele molekulaarbioloogia tehnikatele, milleks on näiteks polümeraasi ahelreaktsioon (PCR) ja hübriidiseerimise tehnikad, nii nagu neid on käesolevaga kirjeldatud.

**[0042]** Homoloogia ulatus nukleiinhapete paari vahel võidakse määrata ühe strateegia või strateegiate kombinatsiooni alusel. Ühe lähenemise kohaselt määratakse järjestuse identsuse protsent ülevaatusel. Järjestuste joondamise meetodid võrdlemiseks on asjatundjale hästi teada. Seega võib identsusprotsendi mis tahes kahe järjestuse vahel leida matemaatiliste algoritmide alusel. Sellisteks matemaatilisteks algoritmideks on, kuid mitte ainult, Myers ja Milleri algoritm (1988) CABIOS 4:11-17; paikse homoloogia algoritm, Smith *et al* (1981) Adv. Appl. Math. 2:482; Needleman ja Wunsch homoloogia joondamise algoritm (1970) J. Mol. Bioi. 48:443-453; Pearson ja Lipmani sarnasuse otsimise algoritm (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85:2444-2448; Karlin ja Altschul algoritm (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 5873-5877.

**[0043]** Järjestuste võrdlemiseks järjestuse identsuse kindlaksmääramiseks võidakse tugineda nimetatud matemaatiliste algoritmide arvutirakendustele. Sellisteks rakendusteks on näiteks, kuid mitte ainult, järgmised: PC/Gene program CLUSTAL (leitav allikast Intelligenetics, Mountain View, Calif.); ALIGN programm (Versioon 2.0); ALIGN PLUS programm (Versioon 3.0, autoriõigus 1997); ning GAP, BESTFIT, BLAST, FAST A ja TFASTA Genetics Computer Group Wisconsin Genetics Software Package'is, Versioon 10 (leitav allikast Accelrys, 9685 Scranton Road, San Diego, Calif., 92121, USA). Wisconsin Genetics Software Package'is Versioon 10 kasutatavaks skoorimaatriksiks on BLOSUM62 (vt Henikoff ja Henikoff (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915). Need programmid võimaldavad joondamiste parametreerimise vaikeseadete alt. Asjatundjale on teada ka muud joondamisrakendused, vt nt U.S. Pat Nr. 7,378,499 ja seal toodud viited.

- [0044] Kui pole märgitud teisiti, vastavad käesolevas esitatud, nukleotiid- ja aminohappe järjestuse identsus-/sarnasusväärtused GAP või mis tahes samaväärse programmi kasutamisel vaikeseadetega saadud väärtustele. Termin „sellega samaväärne programm“ kannab mis tahes, järjestuse võrdlusprogrammi tähendust, mis võimaldab mis tahes kahe, asjaomase järjestuse joondamise, mis on identse nukleotiid või aminohappe jäägi vastega ja identse protsendimääraga järjestuse identsuse osas võrdlemisel vastava joondamisega, mis on saadud eelisprogrammi toel. Täiendav teave vt Needleman ja Wunsch (1970) J. Mol. Bioi. 48:443-453.
- 10 [0045] Käesoleva leiutise juures kasutatakse nukleotiidi või valgu järjestuste võrdlemiseks järjestuse identsusprotsendi väljaselgitamiseks võrdluses käesolevaga kirjeldatud, inimese, roti või hiire C6 järjestustega eelistatavalt GAP programmi, mis sisaldub Wisconsin Genetics Software Package'is (versioon 10 või hilisem) või mis tahes, sellega samaväärset programmi. Nukleotiidjärjestuste GAP analüüsideks kasutatakse GAP'i massiga 50 ja pikkusega 3.
- 15 [0046] Käesolevas kasutatuna kannab „järjestuse identsus“ või „identsus“ kahe nukleinhappe või polüpeptiidjärjestuse kontekstis nende kahe järjestuse jääkide tähendust, mis on samasugused joondamisel maksimaalse vastavuse saavutamiseks konkreetsele võrdlusaknale. Järjestuse identsuse protsendimäära kasutamisel valkude kontekstis lähtutakse teadmisest, et jäägi positsioonid, mis ei ole identsed, erinevad sageli konservatiivsete aminohappe asenduste poolest, milles aminohappe jäägid on asendatud teiste, samade keemiliste omadustega (nt laeng või hürdofoobsus) aminohappe jääkidega, mistõttu molekuli funktsionaalsed omadused seeläbi ei muutu. Juhul kui järjestused erinevad konservatiivsete asenduste poolest, võidakse järjestuse identsusprotsenti reguleerida asenduse konservatiivse iseloomu korrigeerimiseks ülespoole. Selliste, konservatiivsete asenduste poolest erinevaid järjestusi nimetatakse „järjestussarnasust“ või „sarnasust“ omavateks. Vahendid selliseks reguleerimiseks on asjatundjale hästi teada. Tüüpiliselt kasutatakse konservatiivse asenduse skoori määramiseks osalist, mitte täielikku
- 20
- 25



lahknevust, millega suurendatakse järjestuse identsuse protsendimäära. Sellisel moel, näiteks identse aminohappe skoori korral 1, kui mitte konservatiivne asendus annab skooriks null, annab konservatiivne asendus tulemuseks skoori nulli ja 1 vahel. Konservatiivsete asenduste punktisumma leitakse arvutamise teel, tuginedes selleks näiteks programmi PC/GENE rakendusele (Intelligenetics, Mountain View, Calif.).

[0047] Käesolevas kontekstis kannab „järjestuse identsuse protsendimäär“ väärtuse tähendust, mis määratakse kahe, optimaalselt joondatud järjestuse võrdlemise teel võrdlusaknas, kusjuures võrdlusaknasse jääv polünukleotiidjärjestuse osa võib sisaldada ükskõik kas lisamisi või deletsioone (näiteks vahed) võrdluses võrdlusjärjestusega (mis lisamisi ega deletsioone ei sisalda) nende kahe järjestuse optimaalseks joondamiseks. Protsendimäär kalkuleeritakse positsioonide hulga kindlaksmääramise teel, millel identne nukleiinhappe alus või aminohappe jääk esineb mõlemas järjestuses, saades ühilduvate positsioonide arvu, jagades ühilduvate positsioonide arvu võrdlusakna positsioonide koguarvuga ning korrutades tulemuse 100-ga, millega saadakse järjestuse identsuse protsendimäär.

[0048] Teiseks märgiks selle kohta, et nukleotiidjärjestused on sisuliselt identsed, on see, kui kaks molekuli on omavahel rangetes tingimustes hübriidiseerivad. Üldiselt valitakse ranged tingimused ligikaudu 5 °C madalamad kui seda on termineline sulamistemperatuur ( $T_m$ ) spetsiifilise järjestuse korral kindlal ioontugevusel ja happelisuse tasemel pH. Samas hõlmavad ranged tingimused temperatuure vahemikus ligikaudu 1 °C kuni ligikaudu 20 °C, olenevalt soovitud rangusastmest, erinevalt käesolevaga kvalifitseeritust. Rangetes tingimustes omavahel mitte hübriidiseerivad nukleiinhapped on ikkagi sisuliselt identsed, juhul kui nende poolt kodeeritavad polüpeptiidid on sisuliselt identsed. Näiteks võib selline olukord juhtuda nukleiinhappe koopia loomisel tuginevalt geneetilise koodiga lubatud, koodoni maksimaalsele degenerereerumisele. Üks märk selle kohta, et kaks nukleiinhappe järjestust on sisuliselt identsed, on see, kui esimese

nukleiinhappe poolt kodeeritud polüpeptiid on immunoloogiliselt ristreaktiivne teise nukleiinhappe poolt kodeeritud polüpeptiidiga.

[0049] Ülalkirjeldatud oligomeeride ühe teostusviisi korral hõlmab külgnev nukleiinaluse järjestus mitte rohkem kui ligikaudu 3, milleks on näiteks mitte rohkem kui ligikaudu 1 või ligikaudu 2 mittevastavust nukleiinhappe vastavas piirkonnas, mis kodeerib huvipakkuva imetaja C6, otstarbekohaselt SEQ ID NO: 1. Näiteks võib külgnev nukleiinaluse järjestus sisaldada mitte rohkem kui ühtainsat mittevastavust nukleiinhappe vastavas piirkonnas, mis kodeerib huvipakkuva imetaja C6. Teise võimalusena ei sisalda külgnev nukleiinaluse järjestus mitte ühtegi mittevastavust (olles sellega näiteks täies mahus komplementaarne) nukleiinhappe vastavas piirkonnas, mis kodeerib huvipakkuva imetaja C6. Teise teostusviisi kohaselt sisaldab oligomeeri nukleiinaluse järjestus külgnevat nukleiinaluse järjestust.

[0050] Leiutisekohane lahendus on ühilduv suure hulga, imetaja, sealhulgas käesolevaga kirjeldatud, inimese, roti ja hiire, C6 järjestustega. Nimetatud valkude nukleiinhappe ja valgujärjestused on saadaval asutusest U.S. National Center for Biotechnology Information ((NCBI)-Genetic Sequence Data Bank (Genbank). Täpsemad järjestuste loendid on saadaval asutusest Genbank at the National Library of Medicine, 38A, 8N05, Rockville Pike, Bethesda, Md. 20894. Genbank on ühtlasi kättesaadav ka interneti teel, vt üldteavet Benson. D. A. *et al* (1997) *Nucl. Acids. Res.* 25: 1 Genbank. Otseselt nimetamata valgu- ja nukleiinjärjestused on leitavad Genbankist või muudest, käesolevaga avaldatud allikatest, vt näiteks (NM\_176074), milles on avaldatud roti C6 järjestus, või (NM\_176074), milles on avaldatud hiire C6 järjestus.

[0051] Käesolev leiutis hõlmab ka muid oligomeeride teostusi. Näiteks, ning ühe teostusviisi kohaselt, hõlmab oligomeeri külgnevat nukleiinaluse järjestust sisaldav külgnev alamjärjestus vähemalt 6, näiteks ligikaudu 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 või ligikaudu 30 kuni 32 nukleiinaluse jääki, mis moodustatuna dupleksrežiimis komplementaarse, inimese,

roti või hiire C6 sihtmärk RNAGA on näiteks RNase H värbamise võimega. „RNase H värbamine“ tähendab seda, et ensüüm kontakteerub kompleksiga, mis määratakse kindlaks ühe katsega või kombineeritud katsetega, mis võimaldavad ensüümi aktiivsuse tuvastamise ja kvantifitseerimise. Näitlikustavalt on RNase H raku endonukleas, mis lagundab RNA:DNA duplexi DNA ahela. RNase H aktiveerimine toob seega kaasa RNA sihtmärgi lõhustamise, parandades seeläbi oluliselt oligonukleotiidi tõhusust geeni ekspresseerimise inhibeerimisel. RNA sihtmärgi lõhustamine on rutiinselt tuvastatav geelelektroforeesi teel.

**[0052]** Seega võib oligomeeri külgnev nukleiinaluse järjestus sisaldada ühe teostusviisi kohaselt külgnevat alamjärjestust vähemalt 7, milleks on näiteks vähemalt 8, vähemalt 9 või vähemalt 10 nukleiinaluse jäägiga, mis, moodustatuna dupleks režiimis koos imetaja komplementaarse C6 sihtmärgiga on RNase H värbamise võimega. Teise teostusviisi kohaselt on külgnev alamjärjestus pikkusega vähemalt 9 või vähemalt 10 nukleiinalust, milleks on näiteks pikkus vähemalt 12 nukleiinalust või pikkus vähemalt 14 nukleiinalust, milleks on näiteks 14, 15 või 16 nukleiinaluse jääki, mis, moodustatuna dupleks režiimis koos imetaja komplementaarse C6 sihtmärk RNA-ga on RNase H värbamise võimega.

**[0053]** Lisaks võivad eelisligomeerid leiutisekohaseks kasutamiseks olla otstarbekohaseks kasutamiseks sobiva pikkusega. Seega on oligomeer ühe teostusviisi kohaselt pikkusega vahemikus ligikaudu 10 kuni ligikaudu 50 nukleotiidi, ligikaudu 10 kuni ligikaudu 35 nukleiinalust, ligikaudu 10 kuni ligikaudu 22 nukleiinalust, näiteks ligikaudu 12 kuni ligikaudu 18 nukleiinalust, ligikaudu 14, ligikaudu 15 või ligikaudu 16 nukleiinalust, ligikaudu 10, 11, 12, 13 või ligikaudu 14 nukleiinalust.

**[0054]** Arusaadavalt seisneb nukleosiid alus-suhkru kombinatsioonis. Nukleosiidi aluse portsjoniks on tavaliselt heterotsükliiline alus. Nimetatud, heterotsükliiliste aluste kaks enimlevinud klassi on puriinid ning pürimidiinid. Nukleotiidideks on nukleosiidid, mis edasiselt hõlmavad nukleosiidi suhkru portsjoniga kovalentselt seotud fosfaatrühma. Selliste nukleosiidide korral, mis sisaldavad pentofura-

nosüül suhkrut, võib fosfaatrühmals olla seotud 2', 3' või 5' suhkru hüdroksüülrühm. Oligonukleotiidide moodustamisel seovad fosfaatrühmad kovalentselt külgnevaid nukleosiide omavahel, millega moodustub sirge polümeerne ühend. Lisaks võivad nimetatud sirge polümeerse struktuuri vastavad otsad olla

5 omakorda edasiselt seotud eesmärgiga moodustada ringikujuline struktuur, kuigi samas on eelistatud avatud, sirged struktuurid. Oligonukleotiidstruktuuri siseselt kasutatakse oligonukleotiidide nukleosiidide vahelise karkassi moodustamiseks tavaliselt fosfaatrühmasid. RNA ja DNA karkassi tavasidemeteks on 3' kuni 5' fosfodiesterside.

10 **[0055]** Samas, kui teatavate rakenduste korral osutuvad eelistatavateks ülalnimetatud oligomeerid, on sageli eelistatavad hoopis ühe või rohkema oligonukleotiid-analoogiga oligomeerid (käesolevas paiguti nimetatud kui oligonukleotiide „mimeetikumid või derivaadid“). Seega hõlmavad leiutisekohased oligomeerid

15 ühte või rohkemat mittenukleiinilise ühendit üksi või kombineerituna modifitseeritud karkassiga või looduslikult mitteesineva nukleosiididevahelise sidemega enda sees. Nii nagu seda on käesolevate spetsifikatsioonidega määratletud, hõlmavad modifitseeritud karkassiga oligonukleotiidid neid, mis sisaldavad oma karkassis fosforaatomit ja neid, mis karkassis fosfori aatomit ei oma. Käesolevate spetsifikatsioonide kontekstis ning nii, nagu seda antud valdkonnas

20 vahest ka tehakse, võidakse oligonukleosiididena käsitleda ka oma internukleosiidkarkassis fosfori aatomit mitte omavaid modifitseeritud oligonukleotiide.

**[0056]** Näitlikustavalt sisaldavad modifitseeritud oligonukleotiidkarkassid näiteks fosfortioaate, kiraalseid fosfortioaate, fosfor-ditioaate, fosfotriestreid, aminoalküülfosfotriestreid, metüül ja muid alküülfosfonaate, sealhulgas 3'-alküleenfosfonaat, 5'-alküleenfosfonaat ja kiraalsed fosfonaadid, fosfinaate, fosforamidaate, sealhulgas 3'-amino fosforamidaat ja aminoalküülfosforamidaat, tionofosforamidaate, tionoalküülfosfonaate, tionoalküülfosfotriestreid, selenofosfaate ja boranofosfaate, mis on tavalise 3' - 5' sidemega, 2' - 5' seotud

30 analooge, samuti neid, mis on ümberpööratud polaarsusega, milles üks või

rohkem internukleotiidsidet on 3' - 3', 5' - 5' või 2' - 2' sidemed. Eelistatud, ümberpööratud polaarsusega oligonukleotiidid hõlmavad üksik 3' - 3-sidet äärmisel 3' internukleotiidsidemel, milleks on näiteks üksik ümberpööratud nukleosiidjääk, mis võib olla aluseta (nukleinaalus puudub või selle asemel on 5 hüdroksüülrühm). Hõlmatud on ka erinevad soolad, segatud soolad ja vaba happe vormid. Vt nt U.S. Pat. Nr-d 3,687,808; 4,469,863; 4,476,301; 5,023,243; 5, 177,196; 5,188,897; 5,264,423; 5,276,019; 5,278,302; 5,286,717; 5,321,131; 5,399,676; 5,405,939; 5,453,496; 5,455,233; 5,466,677; 5,476,925; 5,519,126; 5,536,821; 5,541,306; 5,550,111; 5,563,253; 5,571,799; 5,587,361; 5,194,599; 10 5,565,555; 5,527,899; 5,721,218; 5,672,697, 7,335,764 ning 5,625,050, milles on kirjeldatud nimetatud koostiste valmistamist ja kasutamist.

**[0057]** Seega on leiutisekohane oligomeer leiutise ühe teostusviisi kohaselt täies mahus fosfortioolitud karkassiga.

**[0058]** Muud modifitseeritud oligonukleotiidi karkassid, mis ei sisalda oma 15 mudelis fosfori aatomit, on moodustatud lühikese ahelaga alküüli või tsükloalküül internukleosiid linkide abil, segatud heteroaatomi ja alküüli või tsükloalküül internukleotiid linkide abil või ühe või rohkema lühikese ahelaga heteroaatomiga või heterotsükliilise internukleosiid sidemete abil. Nendeks on sellised karkassid, mis hõlmavad morfolino sidemeid (moodustatud osaliselt 20 nukleosiidi suhkru osast); siloksaankarkassid; sulfiid-, sulfoksiid- ja sulfoonkarkassid; formatsetüül ja tioformatsetüülkarkassid; metüleen-formatsetüül- ja tioformatsetüülkarkassid; riboatsetüülkarkassid; alkeeni-sisaldusega karkassid; sulfamaatkarkassid; metüleenimino- ja metüleenhüdra-sinokarkassid; sulfonaat- ja sulfonamiidkarkassid; amiidkarkassid; ja muud, 25 segatud N, O, S ja CH<sub>2</sub> koostisosi sisaldavad karkassid. Vt nt U.S. Pat. Nr-d 5,034,506; 5,166,315; 5,185,444; 5,214,134; 5,216,141; 5,235,033; 5,264,562; 5,264,564; 5,405,938; 5,434,257; 5,466,677; 5,470,967; 5,489,677; 5,541,307; 5,561,225; 5,596,086; 5,602,240; 5,610,289; 5,602,240; 5,608,046; 5,610,289; 5,618,704; 5,623,070; 5,663,312; 5,633,360; 5,677,437;

5,792,608; 5,646,269, 7,335,764 ning 5,677,439, milles on avaldatud leiutised selliste koostiste valmistamiseks ja kasutamiseks.

[0059] Muudes oligonukleotiid analoogides on nii suhkru- kui ka internukleosiidlingid, seda näiteks nukleotiidüksuste karkassis, asendatud muude rühmadega. Põhiüksused hoitakse hübridiseerimise tarvis alles koos sobiva nukleiinhappe sihtmärkühendiga. Ühte sellist oligomeerset ühendit nimetatakse peptiidnukleiinhappeks (PNA). PNA ühendites on oligonukleotiide suhkrukarkass asendatud karkassi sisaldava amiidiga, milleks otstarbekohaselt on aminoetüülglütsiinkarkass. Nukleiinalused hoitakse alles ja need seotakse otseselt või kaudselt asa lämmastikuaatomitega karkassi amiidportsjonis. Vt nt U.S. Pat. Nr-d 5,539,082; 5,714,331; 5,719,262 ning Nielsen *et al*, Science, 1991,254, 1497-1500.

[0060] Täiendavateks leiutisekohasteks teostusteks on fosforotioaat karkassiga oligomeerid ja heteroatomkarkassiga oligonukleosiidid ning otstarbekohaselt -  
 15 -CH<sub>2</sub>-NH-O-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)-O-CH<sub>2</sub>- (mida nimetatakse metüleen (metüülimino) või MMI karkassiks), -CH<sub>2</sub>-O-N(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)-N(CH<sub>3</sub>)—CH<sub>2</sub> ja -O-N(CH<sub>3</sub>)—CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- [mille korral on sünnijärgne fosfodiester karkass tähistatud O-P-O—CH<sub>2</sub>-], mida on kirjeldatud ülalnimetatud dokumendis U.S. Pat. Nr 5,489,677, ning ülalnimetatud dokumendis U.S. Pat. Nr 5,602,240 kirjeldatud amiidkarkassid. Lisaks olgu siin kohal nimetatud oligonukleotiid, mis kannavad morfolino karkassi struktuure, mida on kirjeldatud näiteks ülalnimetatud dokumendis U.S. Pat. Nr 5,034,506.

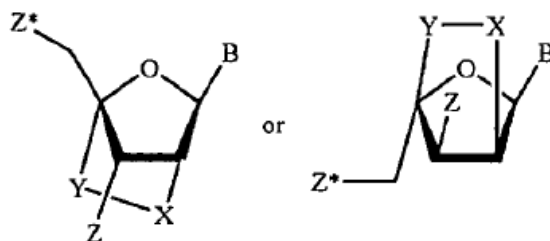
[0061] Leiutisekohased modifitseeritud oligomeerid võivad muuhulgas sisaldada ühte või rohkemat asendatud suhkrufragmenti. Näiteks olgu siin kohal nimetatud oligonukleotiidid, mis omavad 2' positsioonil ühte järgmistest: OH; F; O-, S- või N-alküül; O-, S- või N-alkenüül; O-, S- või N-alkünüül; või O-alküül-O-alküül, milles alküül, alkenüül ja alkünüül võivad olla asendatud C<sub>1</sub> kuni C<sub>10</sub> alküüli või C<sub>2</sub> kuni C<sub>10</sub> alkenüüli ja alkünüüliga või siis olla asendamata. Otstarbekohaselt on eelistatavad O[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>O]CH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OCH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH<sub>2</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>

$(\text{CH}_2)_n\text{ONH}_2$  ning  $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{ON}[(\text{CH}_2)_m\text{CH}_3]_2$ , milles  $n$  ja  $m$  on alates 1 kuni ligikaudu 10. Teine eelistatud oligonukleotiidiidid 2' positsioonil sisaldab ühte järgmistest:  $\text{C}_1$  kuni  $\text{C}_{10}$  madalam alküül, asendatud madalam alküül, alkenüül, alküünüül, alkarüül, aralküül, O-alkarüül või O-aralküül, SH,  $\text{SCH}_3$ , OCN, Cl, Br, CN,  $\text{CF}_3$ ,  $\text{OCF}_3$ ,  $\text{SOCH}_3$ ,  $\text{SO}_2\text{CH}_3$ ,  $\text{ONO}_2$ ,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{N}_3$ ,  $\text{NH}_2$ , heterotsükloalküül, heterotsükloalkarüül, aminoalküülamino, polüalküülamino, asendatud silüül, RNA lõhustav rühm, reporterrühm, interkalaator, rühm oligonukleotiidi farmakoki-  
 neetiliste omaduste parandamiseks, rühm oligonukleotiidi farmakodünaamiliste omaduste parandamiseks ning muud, samu omadusi evivad asendajad. Eelistatud  
 10 modifikatsioon hõlmab 2'-metoksüetoksü ( $2'\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$ , mida tuntakse ka kui 2'-O--(2-metoksüetüül) või 2'-MOE) (Martin *et al*, Helv. Chim. Acta, 1995, 78, 486-504), milleks on näiteks alkoksüalkoksü rühm. Eelistatud modifikatsioone on veel ning need sisaldavad 2'-dimetüülaminooksüetoksü rühma, milleks on näiteks  $\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{ON}(\text{CH}_3)_2$  rühm, mida tuntakse ka kui 2'-DMAOE, nii  
 15 nagu neid on näiteks kirjeldatud alljärgnevatel näidetes, ning 2'-dimetüülaminoetoksüetoksü rühma (mida tuntakse ka kui 2'-O-dimetüülaminoetoksüetüül või 2'-DMAEOE), milleks on näiteks  $2'\text{-O-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{N}(\text{CH}_2)_2$ , mis tuleb samuti alljärgnevatel näidetes kirjeldamiseks.

**[0062]** Eelistatud modifikatsioon hõlmab lukustatud nukleiinhappeid (LNAs), milles  
 20 2'-hüdrosüülrühm on sidestatud suhkru 3' või 4' süsinikuaatomiga, moodustades seeläbi suhkru bitsükliilise molekuliosa. Sidemeks on näiteks metelüün ( $\text{-CH}_2\text{-}$ ) $_n$  rühm, mis sillatab 2' hapnikuaatomi ning 4' süsinikuaatomi, mille korral  $n$  on 1 või 2. LNA-sid ja nende valmistamist on kirjeldatud dokumendis WO 98/39352 ja WO 99/14226.

**[0063]** Lisaks on sobivateks LNA monomeerideks (vahest nimetatud „lukustatud nukleiinhape monomeer“, „lukustatud nukleiinhape jääk“, „LNA monomeer“ või „LNA jääk“) leiutisekohased bitsükliilised nukleotiidi analoogid, nii nagu neid on kirjeldatud näiteks dokumentides WO 00/56746, WO 00/56748, WO 01/25248, WO 02/28875, WO 03/006475, U.S. Patendidokument Nr 2007/0191294, WO

03/095467, U.S. Pat. Nr-d 6,670,461, 6,794,499, 7,034,133, 7,053,207 (L-Ribo-LNA), 7,060,809 ning 7,084,125 (Ksüülo-LNA). LNA monomeer võib ühtlasi olla määratud ka oma keemilise valemiga. Seega on käesoleva leiutise kohane „LNA monomeer“ näiteks järgmise struktuuriga:



5

milles X on valitud rühmast, mis hõlmab järgmist: O, S ja  $\text{NR}^{\text{H}}$ -, milles  $\text{R}^{\text{H}}$  on H või alküül, milleks on näiteks  $\text{C}_{1-6}$ -alküül; Y on  $(-\text{CH}_2)_r$ , milles r on täisarv 1 kuni 6; eeldusel et kui  $\text{X}=\text{O}$ , siis r ei ole 2. Z ja  $\text{Z}^*$  on sõltumatult puudu või valitud rühmast, mis hõlmab järgmist: internukleotiidne siderühm, terminalrühm ja kaitsev rühm; ning B on nukleiinalus. Ühe teostusviisi kohaselt  $r=1$  ja X on O ning kõik Z,  $\text{Z}^*$  on sõltumatult puudu või valitud rühmast, mis hõlmab järgmist: internukleotiidne siderühm, terminalrühm ja kaitsev rühm, ning B on nukleiinalus. Eelnevad LNA monomeerid võivad olla beta-D kujul, alfa-L-kujul, nii nagu seda on kirjeldatud näiteks U S. Patendidokumentis 2007/0191294.

15 [0064] Mõiste „LNA monomeer“ hõlmab ühtlasi ka oligomeere, milles üks või rohkem nukleotiidi on asendatud amino-LNA, tio-LNA või mõlemaga. „Amino-LNA“ ja „tio-LNA“ tähendab, et ülaltoodud valemis kujutatud LNA monomeeris on pentoostsükli hapnikuaatom asendatud vastavalt lämmastiku või väevli aatomiga. Nimetatud LNA monomeeride valmistamise ja kasutamise meetodeid on kirjeldatud näiteks dokumentis US Pat. Nr-d 7,060,809; 7,034, 133; 6,794,499; 20 6,670,461; ja neis toodud viidetes. Otstarbekohaseks asenduseks on C-või T-amino-LNA; või siis C-või T-tio LNA. Konkreetsed amino-LNA ja tio-LNA analoogid on saadaval ettevõttest Ribotask A/S.

25 [0065] Mõiste „ $\text{C}_{1-6}$ -alküül“ kannab sirge või hargnenud, küllastunud süsivesinikahela tähendust, mille pikimad ahelad on alates ühest kuni kuue süsinikuaatomiga,



milleks on näiteks metüül, etüül, n-propüül, isopropüül, n-butüül, isobutüül, sec-butüül, tertbutüül, pentüül, isopentüül, neopentüül ja heksüül. Hargnenud süsivesinikahel kannab C<sub>1-6</sub>-alküüli tähendust, mis on mis tahes süsinikul süsivesinikahelaga asendatud.

- 5 [0066) Konkreetseks terminalirühmade näideteks on terminalirühmad, mis on valitud rühmast, mis hõlmab järgmist: vesinik, asido, halogeen, tsüano, nitro, hüdroksü, Prot-O--, Act-O--, merkpto, Prot-S--, Act-S--, C1-6-alküültio, amino, Prot-N (R<sup>H</sup>)-, Act-N(R<sup>H</sup>)--, mono- või di(C1-6-alküül)amino, valikuliselt asendatud C1-6-alkoksü, valikuliselt asendatud C1-6-alküül, 10 valikuliselt asendatud C2-6-alkenüül, valikuliselt asendatud C2-6-alkenüüloksü, monofosfaat, sealhulgas kaitstud monofosfaat, monotiofosfaat, sealhulgas kaitstud monotiofosfaat, difosfaat, sealhulgas kaitstud difosfaat, ditiofosfaat, sealhulgas kaitstud ditiofosfaat, trifosfaat, sealhulgas kaitstud trifosfaat, tritiofosfaat, sealhulgas kaitstud tntiofosfaat, milles Prot on –OH kaitsev rühm, -- 15 SH ja --NH(R<sup>H</sup>) ning Act on – OH aktiveerimise rühm, --SH ning --NH(R<sup>H</sup>) ning R<sup>H</sup> on vesinik või C 1-6 -alküül.

- [0067] Käesolevas kontekstis kannab termin „C1-4-alküül“ sirge või hargnenud küllastunud süsivesinikahela tähendust, milles pikemad ahelad omavad alates üks kuni neli süsinikuaatomit, milleks on näiteks metüül, etüül, n-propüül, isopropüül, n- 20 butüül, isobutüül, sec-butüül ja tert-butüül. Hargnenud süsivesinikahel kannab C 1-4-alküüli tähendust, mis on mis tahes süsinikul süsivesinikahelaga asendatud.

- [0068] Käesolevas kasutatuna kannab termin „C1<sub>6</sub>-alkoksü“ C1<sub>6</sub>-alküül-oksü tähendust, milleks on näiteks metoksü, etoksü, n-propoksü, isopropoksü, n-butoksü, isobutoksü, sec-butoksü, tert-butoksü, pentoksü, isopentoksü, 25 neopentoksü ja heksoksü.

[0069] Käesolevas kontekstis kannab termin „C<sub>2-6</sub> -alkenüül“ sirge või hargnenud süsivesinikrühma tähendust, millel on alates kaks kuni kuus süsinikuaatomit ja mis sisaldab ühte või rohkemat kaksiksidet. Näiteks hõlmavad C2-6 alkenüülrühmad allüüli, homo-allüüli, vinüüli, krotüüli, butenüüli, butadienüüli,

pentenüüli, pentadienüüli, heksenüüli ja heksadienüüli. Küllastamatuse positsioon (kaksikside) võib olla süsinikahela mis tahes positsioonil.

[0070] Käesolevas kontekstis kannab termin „C<sub>2-6</sub>-alkünüül“ sirge või hargnenud süsivesinikrühma tähendust, mis sisaldab alates kaks kuni kuus süsinikuaatomit ja sisaldab ühte või enam kolmiksidet. C<sub>2-6</sub>-alkünüülrühmadeks on näiteks atsetüleen, propünüül, butünüül, pentünüül ja heksünüül. Küllastamatuse positsioon (kolmikside) võib olla süsinikahela mis tahes positsioonil. Rohkem kui üks side võib olla küllastumata, nagu „C<sub>2-6</sub>-alkünüül“ on näiteks diüün või enediüün, nii nagu see on asjatundjale hästi teada.

[0071] --OH ja --SH rühmade kaitsvateks rühmadeks on näiteks asendatud tritüül, milleks on näiteks 4,4'-dimetoksütritüüloksü (DMT), 4-monometoksütritüüloksü (MMT); tritüüloksü, valikuliselt asendatud 9-(9-fenüül)ksantenüüloksü (piksüül), valikuliselt asendatud metoksütetrahydro-püranüüloksü (mthp); silüüloksü, milleks on näiteks trimetüülsilüüloksü (TMS), triisopropüülsilüüloksü (TIPS), tertbutüüldimetüülsilüüloksü (TBDMS), trietüülsilüüloksü, fenüüldimetüülsilüüloksü; tert-butüüleetrid; atsetaalid (sealhulgas kaks hüdroksürühma); atsüüloksü, milleks on näiteks atsetüül või halogeen-asendatud atsetüülid, nt kloroatsetüüloksü või fluoroatsetüüloksü, isobutüüloksü, pivaloüüloksü, bensoüüloksü ja asendatud bensoüülid, metoksümetüüloksü (MOM), bensüüleetrid või asendatud bensüüleetrid nagu näiteks 2,6-diklorobensüüloksü (2,6-Cl<sub>2</sub> Bzl). Lisaks, juhul kui Z või Z\* on hüdroksüül, võivad need olla kaitstud kinnitamise teel tahkele kandjale, seda valikuliselt linkeri üleselt.

[0072] Nagu eespool öeldud, on Z ja Z\*, mis täidavad internukleosiid sideme rolli, sõltumatult puudu või valitud rühmast, mis hõlmab järgmist: internukleotiidne siderühm, terminalrühm ja kaitsev rühm olenevalt LNA monomeeri tegelikust positsioonist ühendis. On arusaadav, et teostuste korral, milles LNA monomeer asub 3' otsas, on Z terminalrühm ja Z\* internukleosiidlink. Teostusviiside korral, milles LNA monomeer asub 5' otsal, on Z puudu ja Z\* on terminalrühm.

Teostusviiside korral, milles LNA monomeer asub nukleotiidjärjestuse sees, on Z puudu ja Z\* on internukleotiidne siderühm.

[0073] Sobivateks terminalirühmadeks on näiteks kaitsvad rühmad ning konkreetsed, käesolevas leiutises kasutamiseks sobivad LNA monomeerid, mida on kirjeldatud näiteks dokumendis U.S. Pat. Publ. 2007/0191294 ja selles toodud viidetes.

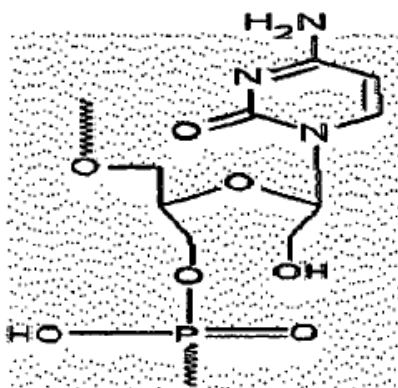
[0074] Muud käesolevas leiutises kasutatavad nukleotiidide analoogid hõlmavad järgmisi; 2'-metoksü (2'-O--CH<sub>3</sub>), 2'-aminopropoksü (2'-OCH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub> NH<sub>2</sub>), 2'-allüül (2'--CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>), 2'--0-allüül (2'-O—CH<sub>2</sub>.CH=CH<sub>2</sub>) ja 2'-fluoro (2'-F). 2'-modifikatsioon võib olla arabino (ülemine) positsioonil või ribo (alumine) positsioonil. Eelistatud 2'-arabino modifikatsiooniks on 2'-F. Sarnaste muudatuste tegemine osutub võimalikuks ka muudel positsioonidel oligonukleotiididel, otstarbekohaselt suhkru 3' positsioonil 3' terminalnukleotiidil või 2'-5' lingitud oligonukleotiidil ning 5' terminalnukleotiidi 5' positsioonil. Oligonukleotiidid võivad omada ka suhkru mimeetikume (suhkru derivaadid), nagu nendeks on näiteks tsüklobutüülfragmendid pentofuranosüül suhkru asemel. Vt nt U.S. Pat. Nr-d 4,981, 957; 5, 118,800; 5,319,080; 5,359,044; 5,393,878; 5,446,137; 5,466,786; 5,514,785; 5,519,134; 5,567,811; 5,576,427; 5,591,722; 5,597,909; 5,610,300; 5,627,053; 5,639,873; 5,646,265; 5,658,873; 5,670,633; 7, 335,764, 5,792,747; ja 5, 700,920, milles on kirjeldatud selliste analoogide valmistamist ja kasutamist.

[0075] Käesoleva leiutisega hõlmatavad oligomeerid hõlmavad oligomeere, millel on üks või rohkem nukleiinaluse modifikatsiooni, asendust ja/või lisandust. Käesolevas kontekstis kannavad „modifitseerimata“ või „loodusikult esinevad“ nukleiinalused puriinaluste adeniini (A) ja guaniini (G) ning pürimidiinaluste tümiini (T), tsütosiini (C) ja uratsiili (U) tähendust. Modifitseeritud nukleiinalused hõlmavad ka muid loodusikult esinevaid nukleiinaluseid nagu nendeks on näiteks 5-metüültsütosiin (5-me-C), 5-hüdroksümetüültsütosiin, ksantiin, hüpoksantiin, 2-aminoadeniin, 6-metüül ja muud adeniini ja guaniini alküül derivaadid, 2-

propüül ja muud adeniini ja guaniini alküül derivaadid, 2-tiouratsiil, 2-tiotümiin ning 2-tiotsütosiin, 5-halouratsiil ja tsütosiin, 5-propüünüül ( $--C=C--CH_3$ ) uratsiil ja tsütosiin ning teised pürimidiinaluste alküüül derivaadid, 6-aso uratsiil, tsütosiin ja tümiin, 5-uratsiil (pseudouratsiil), 4-tiouratsiil, 8-halo, 8-amino, 8-tiool, 8-tioalküül, 8-hüdrosüül ja muud 8-asendatud adeniinid ja guaniinid, 5-halo, otstarbekohaselt 5-bromo, 5-trifluorometüül ja muud 5-asendatud uratsiilid ning tsütosiinid, 7-metüül guaniin ja 7-metüül adeniin, 2-F-adeniin, 2-amino-adeniin, 8-asaguaniin ja 8-asaadeniin, 7-deasaguaniin ja 7-deasaadeniin ning 3-deasaguaniin ja 3-deasaadeniin. Teisteks modifitseeritud nukleiinalusteks on tritsüklilised pürimidiinid nagu näiteks fenoksasiin tsütidiin (1H-pürimido[5,4-b][1,4]bensoksasiin-2(3H)-oon), fenotiasiin tsütidiin (1H-pürimido[5,4-b][1,4]bensotiasiin-2(3H)-oon), G-klambrid nagu näiteks asendatud fenoksasiin tsütidiin (nt 9-(2-aminoetoksü)-H-pürimido[5,4-b][1,4]bensoksasiin-2(3H)-oon), karbasool tsütidiin (2H-pürimido[4,5-b]indool-2-oon), püridoindool tsütidiin (H-pürido[3',2':4,5]pürrolo[2,3-d]pürimidiin-2-oon). Modifitseeritud nukleiinalused võivad muuhulgas hõlmata neid, milles puriin- või pürimidiinalus on asendatud mõne muu heterotsükliga nagu näiteks 7-deasa-adeniin, 7-deasaguanosiin, 2-aminopüridiin ja 2-püridoon. Veel muid nukleiinaluseid on kirjeldatud dokumendis U.S. Pat. Nr 3,687,808, väljaandes The Concise Encyclopedia of Polümeer Science And Engineering, leheküljed 858 kuni 859, Kroschwitz, J. 1., ed. John Wiley & Sons, 1990, väljaandes Englisch *et al*, Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613 ning väljaandes Sanghvi, Y. S., Peatükk 15, Antisense Research and Applications, leheküljed 289 kuni 302, Crooke, S. T. ja Lebleu, B., ed.. CRC Press, 1993.

**[0076]** Paljude leiutisekohaste rakenduste korral on eelistatavad oligomeerid, milles nukleosiidanaloo hõlmab vähemalt metüülitud tsütosiini immuunsüsteemi soovimatu stimuleerimise piiramiseks või blokeerimiseks; vt Näidete lõigust.

[0077] Lisaks hõlmab käesolev leiutus oligomeere, mis sisaldavad endas vähemalt ühte atsükliilist nukleotiidi (nt 1, 2, 3 või 4), eelistavalt 3',4"-seko nukleotiidanalooge, nagu nendeks on näiteks analoogid, mida on kirjeldanud Neilson, P. *Et al* (1994) NAR 22:703; And Neilson, P. *Et al* (1995) Bioorganic & Med. Chern. (1995) 19-28. Atsüülnukleotiidideks on otstarbekohaselt 3',4'-sekotümidiin (seko-RNA-tümidiin), 3',4'-sekotsütosiin (seko-RNA-tsütosiin), 3',4'-sekoadeniin (seko-RNA-adeniin) ning 3'-4'-sekoguaaniin (seko-RNA-guaaniin). 3',4'-sekotsütosiin (seko-RNA-tsütosiin) rühma struktuuri on kujutatud alljärgneval joonisel:



10

[0078] Muud materjalid 3',4'-seko nukleiinhapete valmistamiseks ja kasutamiseks on saadaval ettevõttest Ribotask A/S (Odense, OK). Soovimata piirduda teooriaga, on alust arvata, et seko-RNA kasutamine võimaldab tõsta teatavate leiutisekohaste koostiste kasu, sealhulgas koostised, mis tuginevad, seda vähemalt osaliselt, nukleiin-  
15 hapete nagu näiteks siRNA ensümaatilisele lagunemisele.

[0079] Teatavad nukleiinalused ülalnimetatud nukleiinalustest võivad olla kasulikud leiutisekohaste oligomeersete ühendite sidumisafiinsuse lisamiseks. Nendeks on näiteks 5-asendatud pürimidiinid, 6-asapürimidiinid ning N-2, N-6 ja O-6 asendatud puriinid, sealhulgas 2-aminopropüüladeniin, 5-propünüüluratsiil ja 5-propünüül-  
20 tsütosiin. 5-metüültsütosiin asendused tõstavad tõendatult nukleiinhapete dupleks stabiilsust 0,6 kuni 1,2 °C võrra. (Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. ja Lebleu, B., eds., Antisense Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, lk-d 276 kuni

278) ja on hetkel eelistatavateks aluse asendusteks, seda otstarbekohaselt veelgi eelistatavamalt kombineerituna 2'-O-metoksüetüülsuhkruga ja kindlate muude modifikatsioonidega, nii nagu seda on käesolevaga kirjeldatud, nagu näiteks LNA, vt nt U.S. Pat. Nr-d 3,687,808, 4,845,205; 5, 130,302; 5,134,066; 5,175,273; 5,367,066; 5,432,272; 5,457,187; 5,459,255; 5,484,908; 5,502,177; 5,525,711; 5,552,540; 5,587,469; 5,594,121, 5,596,091; 5,614,617; 5,645,985; 5,830,653; 5,763,588; 6,005,096; 7,335,764, 5,750,692 ja 5,681,941.

**[0080]** Kuigi sageli on eelistatud ülalkirjeldatud, leiutisekohaste oligomeeride kasutamine teatavates rakendustes eraldi või kombinatsioonis, võivad nimetatud koostised olla ka edasiselt soovikohaselt modifitseeritavad vastavalt plaanitud kasutusele. Seega võivad teatavad leiutisekohased oligomeerid olla ühe teostusviisi kohaselt keemiliselt sidestatud ühe või rohkema fragmendi või konjugaadiga, mis parandavad oligonukleotiidide aktiivsust, nende jagunemist rakkudes või nende omandamist rakkude poolt. Leiutisekohased ühendid võivad seega sisaldada konjugaatrühmasid, mis on kovalentselt seotud funktsionaalsete rühmadega, nagu nendeks on näiteks primaarsed või sekundaarsed hüdroksüülrühmad. Leiutisekohased konjugaatrühmad hõlmavad interkalaatoreid, reporterimolekule, polüamiine, polüamiide, polüetüülenglükooli, polüeetreid, rühmasid, mis parandavad oligomeeride farmakodünaamilisi omadusi ning rühmasid, mis parandavad oligomeeride farmakokineetilisi omadusi. Tüüpilised konjugaatide rühmad hõlmavad kolesterooli, lipiide, fosfolipiide, biotiini, fenasiini, folaati, fenantridiini, antrakinooni, akridiini, fluorestseini, rodamiini, kumariini ning värvaineid. Farmakodünaamilisi omadusi parandavad rühmad hõlmavad käesoleva leiutise kontekstis rühmasid, mis parandavad oligomeeri omastamist, suurendavad oligomeeri resistentust lagunemise vastu ning/või tugevdavad järjestusspetsiifilist hübridiseerimist RNA-ga. Farmakokineetilisi omadusi parandavad rühmad hõlmavad käesoleva leiutise kontekstis rühmasid, mis parandavad oligomeeri omandamist, jaotamist, metabolismi või eritamist. Näitlikke konjugaatrühmasid on kirjeldatud näiteks rahvuvahelises Patendinõudluses PCT/US92/09196. Konjugaatfragmendid hõlmavad, kuid mitte ainult, lipiidfragmente, nagu nendeks on näiteks kolesterooli

molekuliosa (Letsinger *et al*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 6553-6556),  
koliinhape (Manoharan *et al*, Bioorg. Med. Chern. Let., 1994,4. 1053-1060),  
tioeeter, nt heksüül-S-tritüültool (Manoharan *et al*, Ann. N.Y. Acad. Sci., 1992,  
660, 306-309; Manoharan *et al*, Bioorg. Med. Chern. Let., 1993, 3, 2765-2770),  
5 tiokolesterool (Oberhauser *et al*, Nucl. Acids Res., 1992, 20, 533-538), alifaatne  
ahel, nt dodekandiool või undetsüüljäägid (Saison-Behmoaras *et al*, EMBO J.,  
1991, 10, 1111-1118; Kabanov *et al*, FEBS Lett., 1990, 259, 327-330; Svinarchuk  
*et al*, Biochimie, 1993, 75, 49-54), fosfolipiidid, nt di-heksadetsüül-rac-  
glütserool või trietüülammonium 1,2-di-0-heksadetsüül-rac-glütsero-3-  
10 H-fosfonaat (Manoharan *et al*, Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654; Shea *et al*,  
Nucl. Acids Res., 1990, 18, 3777-3783), polüamiin või polüetüüleen  
glütsoolahel (Manoharan *et al*, Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14, 969-973)  
või adamantaan äädikhape (Manoharan *et al*, Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-  
3654), palmitüül molekuliosa (Mon Hra *et al*, Biochim. Biophys. Acta, 1995,  
15 1264, 229-237) või oktadetsüülamiin või heksüülamino-karbonüül-  
oksükolesterool molekuliosa (Crooke *et al*, J. Pharmacol. Exp. Ther.,  
1996,277,923-937). Käesolevaga kirjeldatud leiutisekohased ühendid,  
sealhulgas antisenss ühendid, võivad muuhugas olla ka konjugeeritud ravimi  
toimeaineteks, näiteks aspiriiniks, varfariiniks, fenüülbutasooniks, ibupro-  
20 feeniks, suprofeeniks, fenbufeeniks, ketoprofeeniks, (S)-(+)-pranoprofeeniks,  
karprofeeniks, dansüülsarkosiiniks, 2,3,5-triidobensoehappeks, flufenaam-  
happeks, foliinhappeks, bensotiadiasiidiks, klorotiasiidiks, diasepiiniks, indo-  
metitsiiniks, barbituraadiks. tsefalosporiiniks, sulfaravimiks, antidiabeetikuks,  
antibiootikumiks või antibakteriaalseks aineks. Oligonukleotiidravimi  
25 konjugaate ning nende valmistamist on kirjeldatud dokumentides U.S.  
patendinõudlus Ser. Nr 09/334,130 (reg Jun. 15, 1999), näiteks. vt ka, U.S. Pat.  
Nr-d 4,828,979; 4,948,882; 5,218,105; 5,525,465; 5,541,313; 5,545,730;  
5,552,538; 5,578,717, 5,580,731; 5,580, 731; 5,591,584; 5,109, 124; 5, 118,802;  
5, 138,045; 5,414,077; 5,486,603; 5,512,439; 5,578,718; 5,608,046;  
30 4,587,044; 4,605,735; 4,667,025; 4,762,779; 4,789,737; 4,824,941;

4,835,263; 4,876,335; 4,904,582; 4,958,013; 5,082,830; 5,112,963;  
5,214,136; 5,082,830; 5,112,963; 5,214,136; 5,245,022; 5,254,469;  
5,258,506; 5,262,536; 5,272,250; 5,292,873; 5,317,098; 5,371,241,  
5,391,723; 5,416,203, 5,451,463; 5,510,475; 5,512,667; 5,514,785;  
5 5,565,552; 5,567,810; 5,574,142; 5,585,481; 5,587,371; 5,595,726;  
5,597,696; 5,599,923; 5,599,928, 7,335,764 ja 5,688,941, milles on kirjeldatud  
nimetatud ühendite valmistamist ja kasutamist.

[0081] Iseenesest mõistetavalt ei osutu alati vajalikuks ega ka soovitavaks kõikide  
positsioonide ühesugune modifitseerimine antud ühendis. Ühte ühendisse või  
10 isegi üksikusse nukleotiidi oligonukleotiidi siseselt võivad olla  
inkorporeeritavad rohkem kui üks ülalnimetatud modifikatsiooni. Käesolev leiutus  
hõlmab ühtlasi ka kimäärsetes ühendites seisnevaid oligomeere. „Kimäärsete“  
oligomeerühendid või siis oligomeersed „kimäärid“ kannavad käesoleva leiutise  
kontekstis oligonukleotiidide tähendust, nii nagu nendeks on näiteks antisenss  
15 üendid, mis sisaldavad kahte või rohkemat keemiliselt eraldiseisvat piirkonda, mis  
mõlemad moodustuvad vähemalt ühest monomeerüksusest, milleks  
oligonukleotiidühendi korral on näiteks nukleotiid või selle analoog. Nimetatud  
oligonukleotiidid sisaldavad tüüpiliselt vähemalt ühte piirkonda, milles  
oligonukleotiid on modifitseeritud nii, et see tooks kaasa oligonukleotiidi  
20 suurenenud vastupidavuse nukleaaasi lagunemisele, parema omastatavuse  
rakkude poolt ning/või tõhusama sidumise afiinsuse sihtmärk nukleiinhappe osas.  
Veel ühte täiendavat oligonukleotiidi piirkonda võidakse kasutada substraadina  
ensüümide jaoks, mis on võimeline lõhustama RNA DNA või RNA;RNA  
hübriide. Näiteks olgu siinkohal nimetatud raku, RNA DNA dupleks RNA haru  
25 lõhustamise võimega endonukleasina RNase H. RNase H aktiveerimine toob  
seega kaasa RNA sihtmärgi lõhustamise, lisades seeläbi oluliselt  
oligonukleotiidi, geeniekspressiooni inhibeerimistõhusust. Järelikult on sageli  
saavutatavad võrreldavad tulemused lühemate oligonukleotiidide abil  
kimäärsete oligonukleotiidide kasutamisel võrreldes fosforotioaat deoksüoligo-  
30 nukleotiidide hübridiseerimisega samas sihtmärkpiirkonnas. RNA sihtmärgi



lõhustumine on väga lihtsalt teostatav geelelektroforeesi teel ja vajadusel asjaomaste nukleiinhappe hübriidiseerimise tehnikate abil tuvastatav, mis on asjatundjale hästi teada.

[0082] Termin „vähemalt üks“ kannab siinkasutatuna täisarvu tähendust, mis on suurem või võrdne 1-ga, milleks on näiteks 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 ja nii edasi.

[0083] Leiutisekohased kimäärsed antisenss ühendid võivad olla moodustatud komposiitstruktuuridena kahest või rohkemast oliginukleotiidist, modifitseeritud oligonukleotiididest, oligonukleosiididest ja/või oligonukleotiidide mimeetikumidest nagu eespool kirjeldatud. Selliseid ühendeid nimetatakse valdkonnas hübriidideks, wingmeriteks või gapmeriteks. Vt nt U.S. Pat. Nr-d 5,013,830; 5,149,797; 5,220,007; 5,256,775; 5,366,878; 5,403,711; 5,491,133; 5,565,350; 5,623,065; 5,652,355; 5,652,356; 5,700,922, 7,335,764 ning U.S. Pat. Publ. 2007/0191294.

[0084] Käesoleva leiutise kohaselt kasutatavad oligomeerid on väga lihtsalt ja korratavalt valmistatavad tahke faasi sünteesi tehnikale tuginedes, mis on valdkonnas laialdaselt levinud praktika. Nimetatud sünteesimise jaoks vajalik inventar on turustatav mitmete ettevõtete poolt nagu näiteks Applied Biosystems (Foster City, Calif.). Lisaks või paralleelselt võidakse nimetatud sünteesimiseks kasutada mis tahes, valdkonnas kasutatavat inventari. Sarnased tehnikad oligonukleotiidide, nagu nendeks on näiteks fosfortioaadid ja alküülitud derivaadid, valmistamiseks on valdkonnas hästi teada. Eelistatavalt sünteesitakse leiutisekohased oligomeerid *in vitro* ja need ei sisalda bioloogilist päritolu koostisi ega geneetilise vektori konstrukte, mis on väljatöötatud selliste koostiste *in vivo* sünteesimise juhtimiseks. Mitmete leiutise rakenduste korral on eelistatavad ühe-ahelalised oligomeerid.

[0085] Nagu öeldud, osutub mõnede leiutisekohaste teostuste korral kasulikuks oligomeeri afiinsuse parandamine oma sihtmärgi osas. See võidakse saavutada ühe ja ainsa meetodi teel või meetodite kombineerimisel, nii nagu seda on käesolevaga

kirjeldatud. Ühe lähenemise kohaselt hõlmab külgnev nukleiinaluse järjestus vähemalt ühte afiinsust tõstvat nukleotiidi analoogi, nagu nendeks on käesolevaga avaldatud analoogid, mis sisaldavad 2'-MOE ja LNA monomeere. Oligomeeri, mis sisaldab vähemalt ühte afiinsust tõstvat nukleotiidi analoogi, ühe teostusviisi kohaselt sisaldab külgnev nukleiinaluse järjestus kokku ligikaudu 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 või ligikaudu 10 afiinsust tõstvat nukleotiidi analoogi, milleks on näiteks vahemikus 5 kuni 8 afiinsust tõstvat nukleotiidi analoogi. Teise teostusviisi kohaselt sisaldab leiutisekohane oligomeer vähemalt ühte afiinsust tõstvat nukleotiidi analoogi, milles olevad järelejäänud nukleiinalused on valitud rühmast, mis hõlmab järgmist: DNA nukleotiidid või RNA nukleotiidid või atsüklilised nukleotiidid, nii nagu neid on käesolevaga kirjeldatud.

[0086] Ülalkirjeldatud oligomeeri ühe spetsiifilise teostusviisi kohaselt sisaldab oligomeer nukleiinaluste järjestust vastavalt valemile, positsioonidel 5' - 3' suunas A-B-C, ning valikuliselt vastavalt valemile A-B-C-D milles;

15

„A“ seisneb nukleotiidi analoogis või sisaldab vähemalt ühte nukleotiidi analoogi, milleks on näiteks 1, 2, 3, 4, 5 või 6 nukleotiidi analoogi, näiteks vahemikus 2 kuni 5 nukleotiidi analoogi, milleks on näiteks 2, 3 või 4 nukleotiidi analoogi või 2, 3 või 4 järjestikust nukleotiidi analoogi ning;

20

„B“ seisneb nukleiinaluses või sisaldab vähemalt viite järjestikust nukleiinalust, mis on RNase H värbamise võimega (dupleksmoodustumise korral koos imetaja C6 sihtmärgiga, milleks on näiteks inimese C6 nukleiinhape tähisega SEQ ID NR 1. Ühe teostusviisi kohaselt on oligomeeri DNA nukleiinalusel näiteks 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 või 12 järjestikust nukleiinalust, mis on RNase H värbamise võimega, või vahemikus 6 kuni 10 või vahemikus 7 kuni 9, milleks on näiteks 8 järjestikust nukleiinalust, mis on RNase H värbamise võimega ning;

25

„C“ seisneb nukleotiidi analoogis või sisaldab vähemalt ühte nukleotiidi analoogi, milleks on näiteks 1, 2, 3, 4, 5 või 6 nukleotiidi analoogi, eelistatavalt vahemikus 2 kuni 5 nukleotiidi analoogi, milleks on näiteks 2, 3 või 4 nukleotiidi analoogi, kõige eelistatavamalt 2, 3 või 4 järjestikkust nukleotiidi analoogi ning;

„D“ seisneb DNA nukleotiidis või eelistatavalt sisaldab, selle olemasolu korral, ühte või rohkemat DNA nukleotiidi nagu näiteks vahemikus 1 kuni 3 või 1 kuni 2 DNA nukleotiidi.

10 [0087] Eelneva koostise ühe, leiutisekohase teostusviisi korral sisaldab oligomeer lisaks vähemalt ühte atsüklilist nukleotiidi vähemalt ühes A, B, C või D-s, eelistatavalt 1, 2, 3 või 4 ühesugust piirkonnas B, näiteks ligikaudu 1 või ligikaudu 2 atsüklilist nukleotiidi. Eelistatavalt on atsükliline nukleotiid valitud rühmast, mis hõlmab järgmist: 3',4'-sekotümidiin (seko-RNA-tümidiin), 3',4'-sekotsütosiin  
15 (seko-RNA-tsütosiin), 3',4'-sekoadeniin (seko-RNA-adeniin) ning 3'-4'-sekoguaaniin (seko-RNA-guaaniin), nagu eespool kirjeldatud.

[0088] Ühe teostusviisi kohaselt seisneb piirkond A nukleotiidi analoogis või hõlmab 2, 3 või 4 järjestikkust nukleotiidi analoogi. Lisaks võib B koosneda DNA nukleotiidist või sisaldada ligikaudu 7, 8, 9 või ligikaudu 10 järjestikkust  
20 DNA nukleotiidi või nendega võrdväärseid nukleiinaluseid, mis on RNase H värbamise võimega moodustatuna dupleksina koos imetaja C6 nukleiinhappe sihtmärgiga. Muuhulgas võib C ülalnimetatud oligomeer seisneda nukleotiidi analoogis või sisaldada ligikaudu 2, 3 või ligikaudu 4 järjestikkust nukleotiidi analoogi. Piirkond D võib seisneda, nii nagu seda on käesolevaga kirjeldatud, ühes  
25 või kahes DNA nukleotiidis nende olemasolu korral. Samal moel, ning ühe teostusviisi kohaselt seisneb piirkond A külgnevas nukleotiidi analoogis või sisaldab 3 külgnevat nukleotiidi analoogi, nagu käesolevaga kirjeldatud; B, nagu eespool määratletud, koosneb külgnevast DNA nukleotiidist või sisaldab ligikaudu 7, 8, 9 või ligikaudu 10 külgnevat DNA nukleotiidi või nendega

võrdväärseid nukleiinaluseid, mis on RNase H värbamise võimega moodustatuna  
dupleksina koos imetaja C6 sihtmärgiga; ja C, nii nagu seda on eespool määratletud,  
koosneb külgnevast nukleotiidi analoogist või sisaldab ligikaudu 3 külgnevat  
nukleotiidi analoogi; ja piirkond D, selle olemasolu korral, moodustub ühest või  
5 kahest DNA nukleotiidist.

[0089] Ülalkirjeldatud oligomeeri ühe eriteostusviisi kohaselt koosneb külgnev  
nukleiinaluse järjestus ligikaudu 10, 11, 12, 13 või ligikaudu 14 nukleiinalusest  
ning sellisel juhul; piirkond A koosneb ligikaudu 1, 2 või ligikaudu 3 külgnevast  
nukleotiidi analoogist; piirkond B koosneb ligikaudu 7, 8 või ligikaudu 9  
10 järjestikkusest DNA nukleotiidist või samaväärsetest nukleiinalustest, mis on  
RNase H värbamise võimega moodustatuna dupleksina koos imetaja C6  
nukleiinahappe sihtmärgiga; piirkond C koosneb ligikaudu 1, 2 või ligikaudu 3  
külgnevast nukleotiidi analoogist; ja piirkond D koosneb, selle olemasolu  
korral, ühest DNA nukleotiidist.

15 [0090] Mitmete leiutisekohaste rakenduste korral on tavaliselt eelistatud oligomeeri  
kasutamine, milles piirkond B sisaldab vähemalt ühte LNA monomeeri  
(nukleiinalus). Näiteks võib selline LNA olla alfa-L konfiguratsioonis, milleks  
on näiteks alfa-L-oksü LNA. Lisaks on sobivad nukleotiidi analoogid (ükskõik  
kas ühes või kõikides piirkondades A, B, C ja D, nii nagu seda on eespool  
20 kirjeldatud) sõltumatult või üheskoos valitud rühmast, mis hõlmab järgmist:  
Lukustatud Nukleiinahappe (LNA) üksused; 2'-O-alküül-RNA üksused, 2'-OMe-  
RNA üksused, 2'-amino-DNA üksused, 2'-fluoro-DNA üksused, PNA üksused,  
HNA üksused ning INA üksused. Leiutise eelisteostuse kohaselt sisaldab  
nukleotiidi analoog LNA monomeeri ja veelgi eelistatavamalt seisneb LNA  
25 monomeeris.

[0091] Leiutisekohaste teostusviiside korral, milles konkreetne oligomeer hõlmab  
vähemalt ühte LNA monomeeri (mida kutsutakse vahest ka üksuseks), osutub  
tavaliselt kasulikuks ligikaudu 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 või 10 LNA üksust nagu  
näiteks vahemikus 2 kuni 8 nukleotiidi LNA üksust. Muud LNA monomeerid on

kasulikud teatavates leiutisekohastes rakendustes, sealhulgas need, mis on valitud järgmiste hulgast: oksü-LNA, tio-LNA, [beta]-D-oksü-LNA ning amino-LNA, ükskõik kas beta-D ja alfa-L konfiguratsioonis või nendega kombineerituna. Ühe teostusviisi kohaselt on kõikideks oligomeerideks LNA mono-  
5 meerid [beta]-D-oksü-LNA'd. Konkreetse leiutisekohase teostusviisi kohaselt on nukleotiidi analoogid või Nukleiinalused piirkondades A ja C [beta]-D-oksü-LNA'd.

[0092] Nagu öeldud, on olemas vajadus oligomeeride järele, mis sisaldavad vähemalt ühte modifitseeritud nukleiinalust. Ühe teostusviisi kohaselt on  
10 modifitseeritud nukleiinalus valitud rühmast, mis hõlmab järgmist: 5-metüültsütosiin, isotsütosiin, pseudoisotsütosiin, 5-bromouratsiil, 5-propüüüratsiil, 6-aminopuriin, 2-aminopuriin, inosiin, diaminopuriin ning 2-kloro-6-aminopuriin.

[0093] Leiutisekohane lahendus on ühilduv oligomeeride erinevate kasutamisega eraldi või kombinatsioonis, nii nagu seda on käesolevaga kirjeldatud. Näiteks, seda leiutise ühe teostusviisi kohaselt, hübridiseerub leiutis vastava, imetaja C6 nukleiinhappega (nt mRNA), mille  $aT_m$  on vähemalt 40 °C, milleks on näiteks vähemalt 50 °C. Ühe konkreetse teostusviisi kohaselt hübridiseerub oligomeer vastava, imetaja C6 nukleiinhappega (nt mRNA), mille  $aT_m$  on mitte üle 90 °C,  
20 milleks on näiteks mitte üle 80 °C.

[0094] Enamikes leiutisekohastes teostusviisides on tavaliselt eelistatavad modifitseeritud karkassidega oligomeerid, nii nagu seda on eespool kirjeldatud, seda eriti *in vivo* kasutuses. Ühe teostusviisi kohaselt on internukleosiidlingid sõltumatult valitud rühmast, mis hõlmab järgmist: fosfodiester, fosforotioaat ning Boranofosfaat. Ühes konkreetsetes näites sisaldab oligomeer vähemalt ühte  
25 fosforotioaadi internukleosiidlinki. Internukleosiidlingid, mis võivad olla DNA või RNA üksustega külgnevad või asuda nende vahel või siis piirkonnas B (nagu eespool kirjeldatud) on fosforotioaatlingid. Leiutisekohase oligomeeri ühe teostusviisi korral on vähemalt üheks järjestikkuse nukleotiidi analoogi paariks

fosfodiesterlink. Mõnedes teostusviisides on kõikideks linkideks järjestikuste nukleotiidi analoogide vahel eelistatavalt fosfodiesterlingid, näiteks võivad kõikideks internukleosiidlinkideks olla fosforotioaatlingid.

**[0095]** Leiutisekohaste oligomeeride veelgi spetsiifilisem kasutamine hõlmab selliste oligomeeride kasutamist, mis on sihitud eelistatud sihtmärksaitidle, mis on esitatud Tabelites 4A kuni 4E ja Tabelites 5A kuni 5F ja millele on eespool viidatud. Sellised oligomeerid sisaldavad tavaliselt vahemikus alates ligikaudu 10 kuni ligikaudu 20 nukleotiidi nagu näiteks ligikaudu 12 kuni ligikaudu 18 nukleotiidi, mille karkass on täielikult või osaliselt fosfortioolitud. Lisaks võivad eelisligomeerid sisaldada edasiselt vahemikus alates ligikaudu üks kuni ligikaudu kuus (6) LNA monomeeri, eelistatavalt positsioonidel oligomeeride otstes 3' ja 5'. Veelgi spetsiifilisemalt sisaldavad oligomeerid ligikaudu 2 või 3 sellist LNA monomeeri, positsioonidel igal otsal (nt wingmerid või gapmerid).

**[0096]** Samuti hõlmab leiutis kõiki eelnevaid oligomeere, milles vähemalt üks mitte-nukleotiid või mitte-polünukleotiid molekuliosa on kovalentselt nimetatud ühendiga kinnitunud. Näited hõlmavad ülalmainitud rühmasid.

**[0097]** Alljärgnevas Näidetes ja Tabelites on esitatud rohkem leiutisekohaseid oligomeere.

## 20 Kaheahelalised ühendid

**[0098]** Nagu öeldud, hõlmab leiutis ka kahe-ahelalisi ühendeid, mis sisaldavad reisija ahelat ja antisenss ahelat, mis on sihitud nukleiinhape molekulile, mis kodeerib imetaja komplement koostisosa 6 (C6) valgu, milleks on näiteks inimese, roti ja hiire, käesolevaga kirjeldatud järjestused. Ühe teostusviisi kohaselt sisaldab iga haru alates ligikaudu 12 kuni ligikaudu 35 nukleiinalust, eelistatavalt ligikaudu 12 kuni ligikaudu 30 nukleotiidi, veelgi eelistavamalt ligikaudu 14 kuni ligikaudu 25 nukleotiidi, hõlmates ligikaudu 15 kuni ligikaudu 20 nukleotiidi (nt 18 või 19 nukleotiidi), mis on eelistatavad mis tahes rakenduste korral. Eelistatavalt

sisaldab antisenss ahel katkematut nukleiinaluse järjestust, mis on vähemalt ligikaudu 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% kuni ligikaudu 100% järjestuse identsusega nukleiinhappe vastava piirkonnaga, mis kodeerib KOMPLEMENT KOOSTISOSA 6 (C6) järjestuse, mis kannab tähistust SEQ ID Nr-d: 1 (inim), 402 (rott) või 403  
5 (hiir) või nende looduslikult esinevad alleelivariandid. Oligomeer sisaldab vähemalt ühte oligonukleotiidi analoogi, nagu selleks on näiteks LNA monomeer.

**[0099]** Eelistatud kahe-ahelalised ühendid leiutisekohaseks kasutamiseks võidakse valmistada nimetatud, käesolevaga kirjeldatud oligomeerist või oligomeeride kombinatsioonist. Veelgi eelistatavamad oligomeerid on välja töötatud nende,  
10 eelistatud sihtmärksaitide sihtimiseks, millest on eespool räägitud seonduvalt näiteks Tabelitega 4A kuni 4E ja Tabetitega 5A kuni 5F. Lisaks on eelisoligomeerid kasutamiseks kahe-ahelalise ühendiga sisuliselt mittetoksilised, nii nagu see on käesolevaga kirjeldatud loomkatsega otstarbekohaselt kindlaks tehtud ja nagu see nähtub Näidete jaotisest. Sellised oligomeerid võivad lisaks näidata häid C6mRNA  
15 ekspresseerimist vähendavaid omadusi, nii nagu see nähtub teostatud katse tulemustest.

**[0100]** Üks või mõlemad reisija ahelad ning antisenss ahel sisaldavad vähemalt ühte modifitseeritud internukleosiid linki, nii nagu seda on eespool kirjeldatud (oligonukleotiidkarkass), milleks on näiteks fosforotioaatlink. Ühe konkreetse  
20 näite korral on kõikideks reisija ahela ning antisenss haru internukleosiidlinkideks fosforotioaatlingid. Tüüpiliselt sisaldab reisija ahel lisaks vähemalt ühte LNA monomeeri, seda näiteks vahemikus alates ligikaudu 1 kuni ligikaudu 10 LNA monomeeri (nt 2, 3, 4, 5, 6, 7 või 9 LNA monomeeri). Ühe näite kohaselt asub vähemalt üks LNA monomeer reisija ahela otsal 5', näiteks paiknevad vähemalt  
25 kaks LNA monomeeri reisija ahela otsal 5'. Teise võimalusena või lisaks sellele paikneb vähemalt üks LNA monomeer reisija ahela otsa 3', näiteks paiknevad vähemalt kaks LNA monomeeri reisija ahela otsal 3'. Täiendavad kahe-ahelalise ühendi näited hõlmavad konstrukte, milles antisenss ahel sisaldab vähemalt ühte LNA monomeeri, näiteks vahemikus alates ligikaudu 1 kuni ligikaudu 10 LNA

monomeeri (nt 2, 3, 4, 5, 6, 7, või 9 LNA monomeeri). Ühe, leiutisekohase näite korral paikneb vähemalt üks ühendi LNA monomeer antisenssahela otsal 3', nii nagu see on teostusviiside korral, milles vähemalt kaks LNA monomeeri paiknevad antisenssahela otsal 3', näiteks paiknevad vähemalt kolm LNA monomeeri antisenssahela otsal 3'. Samas võib teiste näidete korral osutada otstarbekaks 1 või null (0) LNA monomeeri asukohaga antisenss ahela otsal 5'. Kahe-ahelalised ühendid leiutisekohaseks kasutamiseks hõlmavad selliseid konstrukte, milles reisija ahel sisaldab vähemalt ühte LNA-d ning antisenss ahel sisaldab vähemalt ühte LNA monomeeri, näiteks ligikaudu 1 kuni ligikaudu 10 LNA monomeeri (nt 2, 3, 4, 5, 6, 7 või 9 LNA monomeeri) ning antisenss ahel sisaldab ligikaudu 1 kuni ligikaudu 10 LNA monomeeri (nt 2, 3, 4, 5, 6, 7, või 9 LNA monomeeri).

**[0101]** Ühe, eelnevalt kirjeldatud kahe-ahelalise ühendi näite korral, mis hõlmab esimest oligomeeri (reisija ahel) ning teist oligomeeri (antisenss ahel), sisaldab reisija ahel vähemalt ühte LNA monomeeri otsal 5' (nt 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 või 10 LNA monomeeri) ja vähemalt ühte LNA monomeeri otsal 3' (nt 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 või 10 LNA monomeeri), nii nagu see on näite korral, milles antisenss ahel sisaldab vähemalt ühte LNA monomeeri otsal 3'. Näitlikustavalt esitatuna sisaldab reisija ahel vähemalt ühte LNA monomeeri otsal 5' (nt 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 või 10 LNA monomeeri) ja vähemalt ühte LNA monomeeri otsal 3' (nt 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 või 10 LNA monomeeri). Ühes konkreetses näites sisaldab antisenss ahel vähemalt kahte LNA monomeeri otsal 3'. Konkreetsetes näidetes sisaldab reisija ahel vähemalt kahte LNA monomeeri otsal 5' ja vähemalt kahte LNA monomeeri otsal 3', näiteks võib antisenss ahel sisaldada vähemalt kahte LNA monomeeri otsal 3'. Seega sisaldab reisija ahel konkreetses leiutisekohases näites vähemalt kahte LNA monomeeri otsal 5' ja vähemalt kahte LNA monomeeri otsal 3' ning antisenss ahel sisaldab näiteks vähemalt kolme LNA monomeeri otsal 3'. Samas osutuvad kindlates leiutisekohastes näidetes vajalikuks 1 või null (0) LNA monomeeri asukohaga antisenss ahela otsal 5'.



[0102] Eelistatud näidisteostuses on T koostises asendatud U-ga ( $T \Rightarrow U$ ). Samas on T mõne või eelistatavalt kõikide LNA monomeeride korral asendatud näiteks U-ga,  $T=T$ .

[0103] Käesolev leiutis seisneb samas veelgi spetsiifilisemates kahe-ahelalistes  
5 koostistes, nagu näiteks need, milles reisija ahel sisaldab vähemalt ühte LNA monomeeri vähemalt ühes positsioonidest 9 kuni 13, mida loendakse järjestikku algusega otsast 5'. Näiteks võib reisija ahel sisaldada LNA monomeeri positsioonil 10 loetuna järjestikku algusega otsast 5'. Teise võimalusena või lisavõimalusena võib reisija ahel sisaldada LNA monomeeri sisemisel positsioonil 11 ja/või  
10 positsioonil 12.

[0104] Konkreetsete, kahe-ahelalise ühendi näidete korral võivad esimene ja teine sisemine oligomeer (reisija ja antisenss ahelad) mõlemad sisaldada vahemikus alates ligikaudu 17 kuni ligikaudu 25 nukleotiidi nagu näiteks 18 kuni ligikaudu 24 nukleotiidi, ligikaudu 19 kuni ligikaudu 23 nukleotiidi ning ligikaudu 20 kuni  
15 ligikaudu 22 nukleotiidi.

[0105] Leiutisekohase eesmärgi saavutamise soovi korral sisaldavad kõik reisija- ja antisenssahelad sõltumatult ülendit 3'. Teise võimalusena või lisavõimalusena võib ühend sisaldada endas vähemalt ühte (nt 1, 2, 3, 4 või 5) atsüklilist nukleosiidi nagu näiteks seko-RNA-tümidiini, seko-RNA-tsütosiini, seko-RNA-adeniini või  
20 seko-RNA-guaaniini). Ühe näite kohaselt paikneb atsüülitud nukleotiid reisija ahelal. Teise näite kohaselt paikneb atsüülitud nukleotiid ühendi antisenss ahelal.

[0106] Ühes leiutisekohases näites on esimese oligomeeri, teise oligomeeri või nende mõlema nukleiinalused välja töötatud sihtmärgiks hübriidimiseks, mida on tähistatud SEQ 10 Nr-d: 222, 225, 228, 231, 234, 237, 240, 243, 246 ning 249 (vt  
25 Tabelid 4A kuni 4E) ja nende RNA ning ümberpööratud komplemendiversioonid, mis on esitatud vahetult iga sihtmärgi all. Roti ja hiire C6 on oodatavalt identsete või siis vähemalt väga sarnaste sihtmärksaitidega. Selliste, spetsiifiliste oligomeeride rühm kasutamiseks osistena kahe-ahelaliste ühendite moodustamiseks hõlmab nende järjestuste derivaate, milles näiteks üks või rohkem suhkrurühma, nukleiinalust või

internukleosiidlinki on modifitseeritud, nii nagu seda on käesolevaga kirjeldatud. Konkreetset modifitseerimised hõlmavad järjestuse modifitseerimist peamiselt fosforotiaatlinkide ja vähemalt ühe LNA monomeeri sisaldamiseks või selles seisnemises.

- 5 [0107] Vastavalt, ning ühe näite kohaselt, ühendab kahe-ahelaline ühend kõiki fosforotioaatlinke ja ligikaudu ühte, kahte või kolme LNA monomeeri antisenss ahela otsal 3', näiteks kahte samasugust. Ühe näite kohaselt sisaldab reisija või reisija ahel ühte, kahte või kolme LNA monomeeri reisija ahela otsal 5', näiteks kahte samasugust.
- 10 [0108] Mõnede leiutisekohaste näidete kohaselt võib osutada otstarbekaks tugine mine rohkematele asendustele LNA monomeeriga, mis tähendab, et soovituslik on tugevam hübridiseerimine kahe haru vahel. Seega ühednab ühe näite kohaselt kahe-ahelaline ühend kõiki fosforotioaadi linke ja ligikaudu ühte, kahte või kolme LNA monomeeri antisenss ahela otsal 3', näiteks kahte samasugust. Reisija  
15 ahel hõlmab ühte, kahte või kolme LNA monomeeri reisija ahela otsal 5', näiteks kahte samasugust. Samas hõlmab reisija ahel ühe näite kohaselt täiendavalt ühte, kahte, kolme, nelja või viite LNA monomeeri reisija ahela 3' ja 5' otsa vahel, nii nagu nendeks on positsioon 3, 9, 13 ning 15 sõltuvalt 5' otsa (positsioon 1) 3'ülendi positsioonist.
- 20 [0109] Soovitud tulemuste saavutamiseks on võimalik ette näha ka teisi, käesolevaga kirjeldatud kahe-ahelalise ühendi näiteid. Näiteks võivad kahe-ahelalise ühendi nii reisija ahel kui ka antisenss ahel sisaldada või seisneda peaaesjalikult fosfodiester internukliidsetes linkides. Samas võib teiste näidete korral osutada vajalikuks tugine mine vähemalt ühele fosforotioaat  
25 internukleotiidlingile ükskõik kas reisija ahelas või antisenss ahelas või mõlemas harus, näiteks vahemikus alates ligikaudu 1 kuni ligikaudu 19 fosforotioaat internukleotiidlinki (nt 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 või 19 fosforotioaat internukleotiidlinki). Selles leiutisekohases näites ei ole reisija ahela positsioon 9-10-11 loendatuna alates 5' otsast modifitseeritud. Täienda-

vateks kahe-ahelalise ühendi näideteks on konstruktid, milles reisija ahel hõlmab vähemalt kahte ja kuni seitset LNA monomeeri, näiteks vähemalt kaks LNA monomeeri paiknevad reisija ahela otsal 3'. Teise võimalusena või lisavõimalusena paikneb vähemalt üks LNA monomeer reisija ahela otsal 5'. Teise võimalusena või lisavõimalusena paikneb vähemalt üks või kuni neli LNA monomeeri reisija ahela positsioonil 3, 9, 13 või 15 loendatuna alates 5' otsast. Täiendavad, kahe-ahelalise ühendi näited hõlmavad konstrukte, milles antisenss ahel sisaldab vähemalt ühte LNA monomeeri, näiteks vahemikus alates ligikaudu 1 kuni ligikaudu 3 LNA monomeeri (nt 2, 3, LNA monomeeri). Ühes leiutisekohases näites paikneb ühendi vähemalt üks LNA monomeer antisenss ahela otsal 3', nagu selleks on näited, milles vähemalt kaks LNA monomeeri paiknevad antisenss ahela otsal 3', näiteks paiknevad vähemalt kolm LNA monomeeri antisenss ahela otsal 3'. Samas võib teiste näidete korral osutada otstarbekaks 1 või null (0) LNA monomeeri asukohaga antisenss ahela otsal 5'.

15 **[0110]** Näiteks on võimalikud järgmised struktuurid (L jämedas kirjas, allajoonitud =LNA, r-RNA):

5' rrrrrrrrrrrrrrrrrLL 3' reisija  
3' LLrrrrrrrrrrrrrrrr 5' antisenss

20 5' LrrrrrrrrrrrrrrrrLL 3' reisija  
3' LLrrrrrrrrrrrrrrrr 5' antisenss

5' rrLrrrrrLrrrLrLrrrrLL 3' reisija  
3' LLrrrrrrrrrrrrrrrr 5' antisenss

25 milles ühendid võivad olenevalt struktuuridest sisaldada vähemalt ühte valikulist fosforotioaati, näiteks võivad need olla täies mahus fosforotioolitud. Täiendavad ühendid võivad C jäägi olemasolul sisaldada valikulist metüül C-d immuunvastuse vähendamiseks või kõrvaldamiseks kasutamisel *in vivo* rakendustes. Võimalikud on ka muud modifikatsioonid, nii nagu seda on käesolevaga kirjeldatud.

30 **[0111]** Ühe, konkreetse leiutisekohase näite kohaselt osutuvad võimalikuks järgmised struktuurid, milles LNA on esile tõstetud jämedas kirjas ja allajoonituna:

5' CUGCAUUGCCAGAAAGUUAGA 3' reisija

3' **GCGACGUAACGGUCUUUCAAU** 5' antisenss

**5' CUGCAUTGCCAGAAAGTUAGA** 3' reisija  
3' **GCGACGUAACGGUCUUUCAAU** 5' antisenss

5

**[0112]** Vastavalt otstarbekohasele kasutusele on võimalik ette näha ka muid näiteid.

**[0113]** Soovimata piirduda teooriaga, on alust arvata, et teatavatel juhtudel osutub võimalikuks konkreetsete kahe-ahelaliste ühendite täiustamine leiutisekohaseks kasutamiseks vähemalt ühe atsüklilise nukleotiidanalooigiga nende sees, eelistatavalt üks, kaks, kolm või neli samal positsioonil ühel või mõlemal antisenss ja reisija ahelal. Eelistatult on atsükliliseks nukleotiidiks 3', 4'-sekonukleotiid, nii nagu seda on käesolevaga kirjeldatud, veelgi eelistatavamalt 3',4'-sekotümidin (seko-RNA-tümidin), 3'4'-sekotsütosiin (seko-RNA-tsütosiin), 3',4'-sekoadeniin (seko-RNA-adeniin) ning 3'-4'-sekoguaaniin (seko-RNA-guaaniin). Ühe näite kohaselt sisaldab antisenss ahel 1 atsüklilist nukleotiidi, eelistatavalt positsioonil 3' ja 5' otsa vahel, näiteks vahemikus alates ligikaudu 3 kuni ligikaudu 20 nukleotiidi alates 3' otsast, eelistatavalt vahemikus alates ligikaudu 5 kuni ligikaudu 19 nukleotiidi 3' otsast alates. Ühe näite kohaselt sisaldab antisenss haru lisaks ühte, kahte või kolme LNA monomeeri, näiteks kahte samasugust, asukohaga positsioonil 3'' otsal. Reisija ahel sisaldab ühe näite kohaselt ühte, kahte või kolme atsüklilist nukleotiidi otsal 3', eelistatavalt ühte ja sedasama.

15

20

**[0114]** Ühe näite kohaselt osutuvad võimalikuks järgmised ühendid (L jämedas kirjas, allajoonitud =LNA, r=RNA, S allajoonitud *kaldkirjas*= seko):

**5'** rrrrrrrrrrrrrrrrrS **3'** reisija  
**3'** LLrrimrrmrSrrrrr **5'** antisenss,

25

milles ühend võib sisaldada vähemalt ühte valikulist fosforotioaati, võides näiteks olla täies mahus fosforotioolid. Täiendavad ühendid võivad C jäägi olemasolu korral sisaldada valikulist metüül C-d immuunvastuse piiramiseks või kõrvaldamiseks kasutamisel *in vivo* rakendustes. Võimalikud on ka muud modifikatsioonid, nii nagu seda on käesolevaga kirjeldatud.

30

[0115] Seega seisneb leiutis ühe näite kohaselt järgmises ühendis, milles allajoonitud/kaldkirjas tekst tähistab seko derivaati ning jämedas kirja ja allajoonitud tekstiosa tähistab LNA-d:

5                                   5' CUGCAUUGCCAGAAAGUUAGA 3' reisija  
                                  3' GCGACGUAACGGUCUUCAAU 5' antisenss

[0116] Konkreetseid leiutisekohaseid ühendeid on käesolevas dokumendis paiguti nimetatud „siLNA“, mis tähendab üldiselt ühendit, millel on vähemalt üks LNA monomeer. Käesolevas kontekstis kannab termin „siRNA“ kaheaahelalise RNA lõigu või modifitseeritud RNA monomeeride tähendust. Tüüpilise siRNA ühendi 10 korral on kaks haru tavaliselt ligikaudu 19 nukleotiidiga, mis on omavahel komplementaarsed, luues seeläbi kaks ahelat, mis on ligikaudu 19 nukleotiidi pikkune ja igal harul on kahe, ülendiga nukleotiidi ots 3'. On arusaadav, et leiutisekohane siRNA võib olla pisut pikem või lühem ning ülendiga või ilma ülendita. Konkreetse siRNA konstrukti valik sõltub kindlatest parameetritest nagu 15 näiteks kasutusotstarbest. siRNA-s on üks oligomeeri haru juhtiv ja komplementaarne sihtmärk RNA-ga (antisenss ahel), samas kui teine oligomeeri haru (reisija ahel) on sama järjestusega kui sihtmärk RNA, olles seega komplementaarne juhtiva/antisenss ahelaga. Käesolevas kasutatakse reguleerivat RNAs nagu näiteks „mikro RNA“ („miRNA“) ja „lühike RNA“ 20 („shRNA“) ning erinevaid struktuuralseid RNAs nagu näiteks tRNA, snRNA, scRNA, rRNA samas tähenduses terminiga „siRNA“. Termin „mRNA“ tähendab seni teadaolevat sihtmärkgeeni mRNA transkripti/-skripte ning mis tahes edasist transkripti, mis võidakse määratleda.

[0117] Sellised kahe-ahelalised ühendid leiutisekohaseks kasutamiseks võivad olla 25 konjugeeritud (nt kovalentse sidemega) vähemalt ühe mitte-nukleotiidi või mitte-polünukleotiidi molekuliosaga. Näited sellest sisalduvad juba eelnevalt kirjeldatud näidetes.

[0118] Arusaadavalt ei pea siLNA või siRNA ühendi järjestus selleks, et olla *in vitro* või *in vivo* stabiilne, olema tingimata 100% komplementaarne oma sihtmärk 30 nukleiinhappega. Terminid „komplementaarne“ ja „spetsiifiliselt hübridiseeritav“

tähendavad seega, et siLNA või siRNA ühend seob piisava tugevusega ja spetsiifilisusega sihtmärk molekuliga et saavutada soovitud interferents sihtmärgi tavapärase funktsioneerimisega, mitte-sihtmärk mRNAs funktsiooni samas mõjutamata.

5

### Katkendlikud RNA kompleksid

[0119] Teisest aspektist seisneb käesolev leiutis koostises, mis sisaldab nukleiinhappe kompleksi, mis tüüpiliselt sisaldab RNA-d või seisneb RNA-s või selle ühes või rohkemas oligonukleotiidanaloogis, ning eelistatavalt farmatseutiliselt vastuvõetavat lahjendit, kandjat või adjuvanti. Ühe näite kohaselt hõlmab kompleks kahe-ahelalist tuumikpiirkonda, mis sisaldab antisenss ahelat, mis koosneb katkematust nukleiinaluse järjestusest järjestuse identsusega vähemalt ligikaudu 80%, vähemalt ligikaudu 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, kuni ligikaudu 100% nukleiinhappe vastava piirkonnaga, mis kodeerib komplement koostisosa 6 (C6) järjestuse, mis kannab tähistust SEQ ID Nr-d: 1 (inim), 402 (rott) või 403 (hiir), või nende looduslikult esinevate alleelivariantidega. Eelistatud kompleksid sisaldavad vähemalt ühte oligonukleotiidi analoogi, RNA kompleks hõlmab lisaks katkematut reisija ahelat, mis on tüüpiliselt hübridiseeritud antisenss ahelaks. Enamuste rakenduste korral sisaldab katkematu reisija ahel katkendust, nagu näiteks lõiget või vahet või linkerit või mõnda muud sellist katkestust, nagu neid on käesolevaga kirjeldatud.

[0120] Ühe, eelnevaga kirjeldatud näite kohaselt on RNA kompleks tavaliselt vastava sihtmärknukleiinhappe nukleiinhappe modifikatsioonide vahendamise suutlikkusega. Eelistatavalt on nukleiinhappe modifikatsioon valitud ühest või rohkemast rühmast, mis hõlmab RNA interferentsi, geenivaigistamist, geenisupressiooni, translatsiooni peatamist, translatsiooni inhibeerimist, RNA degradeerimist, RNA lõhustamist ja DNA metüülimist. Tüüpilised RNA

kompleksid vahendavad sihtmärk RNA degradeerimist või vahendavad sihtmärk RNA translatsioonilist inhibeerimist või nende kombinatsiooni.

[0121] Konkreetsetes RNA kompleksis leiutisekohaseks kasutamiseks sisaldab kaheahelaline tuumikpiirkond vahemikus ligikaudu 15 kuni ligikaudu 40 aluspaari nagu näiteks 18 aluspaari, 19 aluspaari, 20 aluspaari, 21 aluspaari, 22 aluspaari ja 23 aluspaari. Ühe näite kohaselt sisaldab RNA kompleks ühte või rohkemat ülendit, näiteks ühte või kahte ülendit. Ülendiks on näiteks 3'-ülend. Ühe näite kohaselt sisaldab RNA kompleksi reisija 3'-ülendit.

[0122] Samas on leiutisekohaseks kasutamiseks ühilduvad ülendi erinevad pikkused, kusjuures ülendi pikkus jääb tavaliselt vahemikku ligikaudu 1 kuni ligikaudu 8 nukleotiidi nagu näiteks 1 nukleotiidi, 2 nukleotiidi ja 3 nukleotiidi. RNA kompleksid võivad sellele vastavalt sisaldada vähemalt ühte tõmpi otsa, kusjuures tõmbid võivad olla ka mõlemad otsad. RNA kompleksi pikkuseks võib olla sisuliselt mis tahes, eesmärgipäraste tulemuste saavutamiseks piisav pikkus, sealhulgas pikkused vahemikus ligikaudu 18 kuni ligikaudu 22 aluspaari. Antud näites on eelistatav, et antisenss haru ja reisija ahel sisaldaksid mõlemad 3'-ülendit pikkusega vahemikus ligikaudu 1 kuni ligikaudu 3 nukleotiidi.

[0123] Nagu öeldud, sisaldavad konkreetsed RNA kompleksid leiutisekohaseks kasutamiseks katkematu reisija ahelat. Ühe näite kohaselt sisaldab kompleks vähemalt esimest ja teist RNA-molekuli, mis üheskoos, seda valikuliselt koos ühe või rohkema edasise RNA molekuliga, moodustavad katkematu reisija ahela. Eelistatavalt on esimene RNA molekul hübridiseeritud antisenss haru alamjooksu osas ja teine RNA molekul on hübridiseeritud antisenss ahela ülemjooksu osas. Ühe näite kohaselt sisaldab reisija haru vahemikus ligikaudu 1 kuni ligikaudu 4 edasist RNA molekuli, mis üheskoos, seda valikuliselt koos ühe või rohkema edasise RNA molekuliga, moodustavad eelistatavalt katkematu reisija ahela. Teise näite kohaselt sisaldab reisija ahel üksnes esimest ja teist RNA molekuli ning näiteks rohkem mitte ühtegi edasist RNA molekuli.

[0124] Katkestus reisija ahelas võib olla moodustatud näiteks sisselõike või sisselõigete teel, mille korral vähemalt esimene ja teine RNA molekul ning

valikuliselt edasised reisija ahela RNA molekulid on selle toimet eraldatud. Samas on soovi korral võimalik vähemalt esimese ja teise RNA molekuli ning valikuliselt nimetatud esimese reisija ahela RNA molekulide eraldamine vahega või valikuliselt vahedega, mis on seejuures valitud näiteks rühmast, mille moodustavad nukleotiidi vahe kohal 1 nukleotiidi vahe, 2 nukleotiidi vahe, 3 nukleotiidi vahe, 4 nukleotiidi vahe, 5 nukleotiidi vahe, 6 nukleotiidi vahe, 7 nukleotiidi vahe, 8 nukleotiidi vahe, 9 nukleotiidi vahe, 10 nukleotiidi vahe, 11 nukleotiidi vahe. Näidetes, mille korral on katkestus seotud linkeriga, võib reisija ahela esimene RNA molekul olla linkeriga ühendatud antisenss ahelaks. Ühe näite kohaselt ühendab linker reisija ahela esimese RNA molekuli 5' otsa antisenss ahela 3' otsaga. Teise näite kohaselt võib teine reisija ahela RNA molekul olla linkeriga ühendatud antisenss ahelaks. Soovi korral võib linker ühendada reisija ahela teist RNA molekuli 3' otsa antisenss ahela 5' otsaga. Vähemalt esimene ning teine reisija ahela RNA molekul ning valikuliselt nimetatud esimene, reisija ahela RNA molekul võib olla linkeriga või valikulistelt hulga linkeritega ühendatud. Leiutisega ühildub hulk erinevaid linkereid, nagu nendeks on näiteks mitte üheaahelalised RNA linkerid.

**[0125]** Mõnedes leiutisekohastes RNA kompleksi näidetes ei ole antisenss ahel kovalentselt reisija ahelaga lingitud. Soovi korral võivad RNA molekulid, mis moodustavad katkematud reisija ahelad, olla mitte kovalentselt lingitud ükskõik millise muu, RNA molekuliga, mis moodustavad katkematud reisija ahelad.

**[0126)** Kindlad RNA kompleksid leiutisekohaseks kasutamiseks hõlmavad kolme mitte-lingitud RNA molekuli, eeskätt antisenss ahelat ning esimest ja teist RNA molekuli, mis üheskoos moodustavad katendliku reisija ahela. Ühe näite kohaselt on katkestatud reisija ahelal katkestus positsioonil, mis on valitud rühmast, kuhu kuuluvad: positsioon 3, positsioon 4, positsioon 5, positsioon 6, positsioon, positsioon 7, positsioon 8, positsioon 9, positsioon 10, positsioon 11, positsioon 12, positsioon 13, positsioon 14, positsioon 15 positsioon 16, positsioon 17, positsioon 18, positsioon 19, positsioon 20, positsioon 21, positsioon 22, positsioon 23, positsioon 24, positsioon 25. Eelistatavalt on positsioon arvestatud



suunas 5' kuni 3' alates reisija ahela aluse esimesest nukleotiidist, mis on paarunud reisija ahela antisenss ahelaga.

[0127] Mõnede leiutisekohaste näidete korral osutub vajalikuks tuginemine RNA kompleksile, milles RNA kompleksi 5-otsad on kas fosforüülitud või fosforüülimiseks avatud. Ühe näite kohaselt sisaldab esimene RNA molekul 5'-otsa fosfaatrühma ja 3'-otsa hüdroksürühma. Teise näite kohaselt sisaldab teine RNA molekul 5'-otsa fosfaatrühma ja 3'-otsa hüdroksürühma. Konkreetsetes näidetes sisaldavad kõik RNA molekulid, mis moodustavad katkematu reisija ahela, igäüks 5'-otsa fosfaatrühma ja 3'-otsa hüdroksürühma.

10 [0128] Sageli võib osutada otstarbekaks tuginemine RNA kompleksidele, mis sisaldavad või mis mõnedele juhtudel seisnevad vähemalt ühes nukleotiidi analoogis, milleks on näiteks käesolevaga kirjeldatud analoogid. Ühe näite kohaselt sisaldab RNA kompleksi reisija ahel vähemalt ühte nukleotiidi analoogi, seda näiteks vahemikus 2 kuni 10 nukleotiidi analoogi. Teise võimalusena või lisavõimalusena sisaldab reisija ahela esimene RNA molekul ühte või rohkemat nukleotiidi analoogi, milleks on näiteks vähemalt 2 nukleotiidi analoogi. Veel ühe võimalusena või lisavõimalusena sisaldab reisija ahela teine RNA molekul ühte või rohkemat nukleotiidi analoogi nagu näiteks vähemalt 2 nukleotiidi analoogi.

[0129] Näidetes, milles RNA kompleks hõlmab nukleotiidi analoogi, paikneb 20 analoog eelistatavalt esimese ja/või teise RNA molekuli vaba terminali (vastavalt 5' või 3') nukleiinialuse üksuses. Teise võimalusena või lisavõimalusena sisaldab vähemalt üks edasistest reisija ahela RNA molekulidest vähemalt ühte nukleotiidi analoogi. Näiteks sisaldab iga edasine RNA molekul, mis moodustab osa katkematust reisija ahelast, vähemalt ühte nukleotiidi analoogi, seda näiteks 25 positsioonidel 10 ja 12 alates 5' reisija ahela otsast. Ühe näite kohaselt sisaldab iga RNA molekul, mis moodustab katkematu reisija ahela osa, vähemalt ühte nukleotiidi analoogi, milleks on näiteks vähemalt kaks nukleotiidi analoogi.

[0130] Ühe näite kohaselt sisaldab reisija ahel täiendavalt ühte, kahte, kolme, nelja või viite LNA monomeeri reisija ahela 3' ja 5' otsa vahel nagu näiteks positsioonil 3, 30 9, 13 ning 15 olenevalt 5' otsa (positsioon 1) ning 3'ülendi positsioonidest. Selles

leiutisekohases näites on reisija ahel samas kaheks osas lahutatud, seda näiteks positsioonide 10 ja 11 vahel. Seega sisaldab ühe näite kohaselt iga reisija ahela portsjon näiteks vähemalt ühte LNA monomeeri, ühte, kahte, kolme, nelja, viite, kuute või seitset samasugust, veelgi eelistatavamalt viite või kuute samasugust, mille

5 korral üks, kaks või kolm või neli LNA monomeeri asuvad reisija ahelate positsioonidel üks ning ülejäänud monomeerid paiknevad teisel harul.

**[0131]** Sageli võib osutada vajalikuks valmistada ja kasutada RNA kompleksi, mis on soovitavate sulamistemperatuuri omadustega. Seega on ühe näite kohaselt sulamistemperatuur ( $T_m$ ) iga esimese, teise ja valikuliselt edasiste RNA molekulide

10 osas, mis moodustavad katkematu reisija ahela moodustatuna dupleksina komplementaarse RNA molekuliga fosfodiesterlinkide toimel, vähemalt 40 °C.

**[0132]** Leiutisekohaste RNA komplekside eelistatud pikkused valitakse vastavalt kasutusotstarbele. Seega on ühe näite kohaselt iga esimese, teise ja valikuliselt edasiste RNA molekulide, mis moodustavad katkematu reisija ahela, pikkuseks

15 vähemalt kolm nukleiinaluse üksust. Ühe näite kohaselt sisaldab antisenss ahel vähemalt 1 nukleotiidi analoogi, nii nagu see on näites, mille korral antisenss ahel sisaldab vähemalt 1 nukleotiidi analoogi duplexi piirkonna siseselt, mis on moodustatud katkematu reisija ahelaga. Teise võimalusena või lisavõimalusena sisaldab antisenss ahel vähemalt ühte nukleotiidi analoogi positsioonil, mis jääb 4

20 nukleiinaluse sisse loendamisel antisenss ahela otsast 3'. Ühe näite kohaselt on vähemalt üks nukleiinalustest asukohaga ligikaudu antisenss ahela 9 5' äärmisel nukleiinaluse üksusel nukleotiidi analoog. Teise näite kohaselt on vähemalt üks nukleiinalustest asukohaga 4 - 10 nukleiinaluse piirkonnas loendatuna antisenss ahela 3' otsast 10 nukleotiidi analoog. Veel ühe näite kohaselt on antisenss ahelas

25 nukleotiidi analoog positsioonil 11 loendatuna antisenss ahela otsast 5'. Veel ühe näite kohaselt on antisenss ahelal RNA nukleotiidid positsioonil 10 kuni 12 loendatuna antisenss ahela otsast 5'. Veel ühe näite kohaselt on antisenss ahela äärmised 5' nukleiinaluse üksust RNA nukleotiidüksused. Teise võimalusena või lisavõimalusena sisaldab antisenss ahel vähemalt 2 nukleotiidi analoogi.

[0133] Leiutisekohaseks kasutamiseks ühildub laias valikus erinevaid nukleotiidi analooge. Tüüpiliselt on sobivateks analoogideks need, mille osas on alust arvata, et need ühilduvad A-vormi või A/B moodustamisega RNA kompleksi konformatsiooniks. Näitlikud analoogid hõlmavad rühma, mis sisaldab järgmist: 2'-O-alküül-RNA monomeerid, 2'-amino-DNA monomeerid, 2'-fluoro-DNA monomeerid, LNA monomeerid, arabino nukleinhape (ANA) monomeerid, 2'-fluoro-ANA monomeerid, HNA monomeerid, INA monomeerid. Eelistatud nukleotiidi analoog asub katkematus reisija ja/või antisenss harudes ja seisneb vähemalt ühes LNA monomeeris, nii nagu neid on näiteks käesolevas juba kirjeldatud. Teise võimalusena või lisavõimalusena sisaldavad nukleotiidi analoogid, mis on katkestusega reisija ja/või antisenss ahelas, vähemalt ühte 2'-MOE-RNA (2'-O-metoksüetüül-RNA) üksust või 2'-fluoro DNA üksust, milleks on näiteks üksused vahemikus ligikaudu 1 kuni ligikaudu 25, mis on sõltumatult valitud kas 2'-MOE-RNA (2'-O-metoksüetüül-RNA) üksustest või 2'-fluoro DNA üksustest.

[0134] Nagu öeldud, osutub sageli otstarbekaks tugineda RNA kompleksile, milles vähemalt üks nukleotiid on asendatud vähemalt ühe LNA üksusega. Ühe näite kohaselt on LNA üksus või üksused sõltumatult valitud rühmast, mis hõlmab järgmist: oksü-LNA, tio-LNA ning amino-LNA, ükskõik kas D- $\beta$  või L- $\alpha$  konfiguratsioonides või nende kombinatsioone. Soovi korral sisaldavad antisenss ahelas olemasolevad nukleotiidi analoogid vähemalt ühte LNA üksust ja/või reisija ahelas olemasolevad nukleotiidi analoogid sisaldavad vähemalt ühte LNA üksust. Ühe näite kohaselt on antisenss harus olemasolevateks nukleotiidi analoogideks LNA üksused. Teise võimalusena või lisavõimalusena on kõikideks reisija ahelas olemasolevateks nukleotiidi analoogideks LNA üksused. Erinevaid eelistatud LNA monomeere on eespool juba kirjeldatud.

[0135] Paljude, käesolevaga kirjeldatud RNA kompleksi näidete korral moodustab vähemalt üks katkematus reisija ahelas olemasolevatest nukleotiidi analoogidest aluspaari antisenss ahelas olemasoleva komplementaarse nukleotiidi analoogiga. Ühe näite kohaselt ei sisalda reisija ahel ühtegi nukleotiidi analoogi ja/või teise

näite kohaselt ei sisalda antisenss ahel ühtegi nukleotiidi analoogi. Veel ühe näite kohaselt moodustavad antisenss haru ja katkestatud haru komplementaarse dupleksi vahemikus ligikaudu 18 kuni ligikaudu 22 aluspaari. Ühe näite kohaselt võib dupleks sisaldada mittevastavust.

5 **[0136]** Ühes näites on antisenss ahelas või reisija ahelas (või mõlemas, seda kas eraldavate üksustena või kombineerituna nukleotiidi analoogide tervikuga RNA kompleksi siseselt) olemasolevate nukleotiidi analoogide hulk valitud rühmast, mis hõlmab järgmist: vähemalt üks nukleotiidi analoog, milleks on näiteks vähemalt 2, vähemalt 3, vähemalt 4, vähemalt 5, vähemalt 6, vähemalt 7, vähemalt  
10 8, vähemalt 9, vähemalt 10, vähemalt 11, vähemalt 12, vähemalt 13, vähemalt 14, vähemalt 15, vähemalt 16, vähemalt 17, vähemalt 18, vähemalt 19 või vähemalt 20, vähemalt 21, vähemalt 22, vähemalt 23, vähemalt 24 ja vähemalt 25 nukleotiidi analoogi. Sobivuse korral võib nukleotiidi analoogide hulk olla väiksem kui 20, milleks on näiteks vähem kui 18, milleks on näiteks vähem kui 16, milleks on näiteks  
15 vähem kui 14, milleks on näiteks vähem kui 12, milleks on näiteks vähem kui 10.

**[0137]** Ühes näites sisaldavad katkematus reisija ahelas (või antisenss ahelas või mõlemas, seda ükskõik kas eraldi üksustena või kombineerituna nukleotiide analoogide tervikuga RNA kompleksi siseselt) olemasolevad nukleotiidi analoogid vähemalt ühte 2'-O-alküül-RNA monomeeri (nagu näiteks 2'OME),  
20 milleks on näiteks 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 või 25 2'-O-alküül-RNA monomeeri (nagu näiteks 2'OME). Ühtlasi on võimalik ette näha komplekse, mis sisaldavad või mis seisnevad 2'OME ja LNA-s.

**[0138]** Ühe näite kohaselt, mis võib olla sama või erinev, sisaldavad katkematus  
25 reisija ahelas (või antisenss ahelas või mõlemas, ükskõik kas eraldi üksustena või kombineerituna nukleotiide analoogide tervikuga RNA kompleksi siseselt) olemasolevad nukleotiidi analoogid vähemalt ühte 2'-fluoro-DNA monomeeri, milleks on näiteks 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 või 25 2'-fluoro-DNA monomeeri.

[0139] Mitmete leiutisekohaste rakenduste korral on tavaliselt eelistatav tuginemine vähemalt ühele katkematus reisija ahelas olemasolevale LNA monomeerile. Ühe näite kohaselt, mis võib olla sama või erinev, sisaldavad katkematus reisija ahelas (või antisenss ahelas või mõlemad, ükskõik kas eraldi üksustena või 5 kombineerituna nukleotiidi analoogide tervikuga RNA kompleksi siseselt) olemasolevad nukleotiidi analoogid vähemalt ühte LNA monomeeri, milleks on näiteks 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23,24 või 25 LNA monomeeri.

[0140] Ühes näites on LNA üksus või üksused valitud sõltumatult rühmast, mis 10 hõlmab järgmist: oksü-LNA, tio- LNA ning amino-LNA, nii D-β kui ka L-α konfiguratsioonis või omavahel kombineerituna. Ühes näites sisaldavad antisenss ahelas olemasolevad nukleotiidi analoogid vähemalt ühte Lukustatud Nukleiinhappe (LNA) üksust, milleks on näiteks vähemalt 2, vähemalt 3, vähemalt 4, vähemalt 5, vähemalt 6, vähemalt 7, vähemalt 8, vähemalt 9, vähemalt 10, 15 vähemalt 11, vähemalt 12, vähemalt 13, vähemalt 14, vähemalt 15, vähemalt 16, vähemalt 17, vähemalt 18, vähemalt 19 või vähemalt 20 LNA üksust. Vastavalt vajadusele võib LNA üksuste hulk olla vähem kui 20, milleks on näiteks vähem kui 18, milleks on näiteks vähem kui 16, milleks on näiteks vähem kui 14, milleks on näiteks vähem kui 12, milleks on näiteks vähem kui 10. Ühes näites on kõikideks 20 antisenss harudes olemasolevateks nukleotiidi analoogideks Lukustatud Nukleiinhappe (LNA) üksused.

[0141] Teise näite kohaselt sisaldab antisenss ahel üksnes mõnda nukleotiidi analoogi üksust, milleks on näiteks LNA üksused. Tüüpiliselt on eelistatavad antisenss harus olemasolevad nukleotiidi üksused positsioonidel vahemikus 3' 25 poolel antisenss ahelast nagu näiteks antisenss ahela positsioonidel vahemikus 1 kuni 9, milleks on näiteks antisenss ahela positsioon 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 või 9, asukohaga näiteks 3 ülendi piirkonnas või esimese 3 piirkonnas, kusjuures nimetatud esimest, teist või kolmandat dupleksi nukleiiniluse positsiooni mõõdetakse algusega antisenss ahela otsast 3'.

**[0142]** Ühes näites sisaldavad reisija ahelad (või antisenss ahelad või mõlemad, ükskõik kas eraldi üksustena või siis kombineerituna nukletottide analoogide tervikuga RNA kompleksi siseselt) olemasolevad nukleotiidi analoogid vähemalt ühte LNA üksust nagu näiteks vähemalt 2, vähemalt 3, vähemalt 4, 5 vähemalt 5, vähemalt 6, vähemalt 7, vähemalt 8, vähemalt 9, vähemalt 10, vähemalt 11, vähemalt 12, vähemalt 13, vähemalt 14, vähemalt 15, vähemalt 16, vähemalt 17, vähemalt 18, vähemalt 19 või vähemalt 20 LNA üksust. Vastavalt vajadusele võib LNA üksuste hulk jääda sobivuse korral alla 20, milleks on näiteks vähem kui 18, milleks on näiteks vähem kui 16, milleks on näiteks vähem kui 14, 10 milleks on näiteks vähem kui 12, milleks on näiteks vähem kui 10. Ühes näites on kõikideks reisija ahelas olemasolevateks nukleotiidi analoogideks Lukustatud Nukleiinhappe (LNA) monomeerid (üksused).

**[0143]** Ühes näites moodustab vähemalt üks katkematus reisija ahelas olemasolev nukleotiidi analoog aluspaari komplementaarse, antisenss ahelas olemasoleva 15 nukleotiidi analoogiga.

**[0144]** Ühes näites moodustavad kõik katkematus reisija ahelas olemasolevad nukleotiidi analoogid aluspaari koos antisenss ahelas olemasoleva komplementaarse nukleotiidi analoogiga, milleks ei ole need nukleotiidi analoogid, mis on olemas ülendil 3' (selle olemasolu korral).

20 **[0145]** Ühes näites moodustavad kõik antisenss ahelas olemasolevad nukleotiidi analoogid aluspaari komplementaarse, katkematus reisija ahelas olemasoleva nukleotiidi analoogiga, milleks ei ole need nukleotiidi analoogid, mis on olemas ülendil 3' (selle olemasolu korral). Ühes näites seisneb või sisaldab reisija ahel 9 kuni 11 nukleotiid (nukleiinalus) RNA molekuli, milleks on näiteks 10 25 nukleotiid RNA molekuli, koos vahemikus 1 kuni viie nukleotiidi analoogiga, milleks on näiteks LNA üksused nagu kaks LNA üksust ja 11 kuni 13 nukleotiid RNA molekuli, milleks on näiteks 12 nukleotiid RNA molekuli, hõlmates vahemikus 1 kuni 5 nukleotiidi analoogi üksust, milleks on näiteks LNA üksused nagu kolm LNA jääki.

[0146] Näitlikustavalt ning leiutist mitte piiravana on alljärgnevalt esitatud järgmised, konkreetsed leiutisekohased, järgnevaid struktuure omavad kompleksid, milles jämedas kirjas ja allajoonitud tekst tähistab LNA-d:

5                                   **5' CUGCAUTGCC 3' 5'AGAAAGTUAGA 3' reisija**  
                                      **3' GCGACGUAACGGUCUUCAAU 5' antisenss**

[0147] Leiutisekohaste RNA komplekside (mida vahest nimetatakse sisiRNA) valmistamist on avaldatud järgmistes dokumentides: W02007/107162 (PCT/DK2007/000146), PA 2006 00433 (OK) ning PA 2006 01254 (OK), milles on kirjeldatud selliste komplekside valmistamist ja kasutamist.

[0148] Käesoleva leiutise teostus on saavutatav ühe, käesolevaga kirjeldatud RNA kompleksi abil või siis nimetatud RNA komplekside kombinatsioonidena. Ühe näite kohaselt vähendas RNA kompleks sihtmärgist mööda mõjusid võrrelduna sünnipärase, mitte-modulaarset reisija ahelat sisaldava RNA kompleksiga. Ühe näite kohaselt toob RNA kompleks kaasa piiratud immuunvastuse võrrelduna sünnipärase, mitte-modulaarset reisija ahelat sisaldava RNA kompleksiga. Teise näite kohaselt annab RNA kompleks pikemaajalise toime sihtmärk Nukleiinhapete osas võrrelduna mitte-modulaarset reisija ahelat sisaldava RNA kompleksiga. Seega omab RNA kompleks ühe näite korral suurenenud mõju oma sihtmärk nukleiinhappele võrrelduna mitte modulaarset reisija ahelat sisaldava RNA kompleksiga. Eelistatud sihtmärk nukleiinhappeks on C6 järjestus, avaldatud märgistusega SEQ 10 NO: 1 (inim), SEQ 10 NO:402 (rott) või SEQ ID NO: 403 (hiir).

[0149] RNA kompleksid leiutisekohaseks kasutamiseks võidakse valmistada üheainsa strateegia või strateegiate kombinatsiooni alusel. Ühe lähenemise kohaselt hõlmab meetod antisenss ahela inkubeerimist koos vähemalt kahe RNA molekuliga, mis moodustavad katkematu reisija ahela, ning valikuliselt edasiste reisija ahela RNA molekulidega tingimustes, milles toimub kahe-ahelalist tuumpiirkona sisaldava RNA kompleksi moodustamine. Eelistatavalt on RNA kompleks suuteline vahendama vastavat, rakulise RNA RNA-interferetsi, mille korral mõlemad nimetatud inkubeerimised toimuvad farmatseutiliselt vastuvõetavas

lahjendis, kandjas või adjuvandis, või nimetatud RNA kompleks on edasiselt kokku segatud farmatseutiliselt vastuvõetava lahjendi, kandja või adjuvandiga.

**[0150]** Ülalkirjeldatud RNA kompleksidel on hulgaliselt kasutusi. Ühe näite kohaselt seisneb leiutis RNA kompleksi kasutamises käesolevaga määratletud moel ravimite valmistamiseks membraanirühmade kompleksi (MAC) soovimatu moodustumisega seonduvate haiguste ravimiseks, nii nagu see tuleb näiteks alljärgnevalt kirjeldamisele.

**[0151]** Leiutis on kasulik meetodis, mis on mõeldud haiguse sümptomite kogumiku ravimiseks, ennetamiseks või piiramiseks patsiendil, kusjuures meetod hõlmab ühe või rohkema, käesoleva leiutise kohase RNA kompleksi manustamist eelistatavalt kombineerituna farmatseutiliselt vastuvõetava puhvri, adjuvandi või vehiikliga, nii nagu seda on käesolevaga kirjeldatud.

**[0152]** Käesolev leiutis on ühtviisi kasulik meetodis sihtmärk RNA (või geeniekspressiooni) taseme piiramiseks rakus või organismis, mis seisneb raku või organismi kontaktiviimises vähemalt ühe RNA kompleksiga, nii nagu seda on käesolevaga määratletud, millest piisab selle geeniekspressiooni moduleerimiseks. Eelistatavalt on RNA kompleksi antisenss ahel sisuliselt komplementaarne sihtmärk RNA piirkonnaga.

**[0153]** Nagu öeldud, võib leiutisekohaseks kasutamiseks mõeldud RNA kompleks sisaldada vähemalt ühte nukleotiidi analoogi. Ühe näite kohaselt ei sisalda reisija ahela esimene RNA molekul 2'-O-metüülriboosi positsioonil 9 loendamisel alates otsast 5'. Teise näite kohaselt ei sisalda reisija ahela esimene RNA molekul 2'-O-metüülriboosi positsioonil 9 loendamisel alates otsast 5'.

**[0154]** Leiutise kasutamisega kaasneb olulisi eeliseid otstarbekohaselt teostustes, mille kohaselt sisaldab leiutisekohane ühend (nt antisenss, siRNA) LNA monomeeri.

**[0155]** Näiteks kaasneb leiutisekohaste teostustega, milles leiutisekohane ühend hõlmab LNA monomeeri (nt antisenss ühend, siLNA, sisiLNA), eelis, mis seisneb nende paremas stabiilsuses bioloogilistes vedelikes, milleks on näiteks seerum. Sellisel moel hõlmab üks leiutisekohane teostus LNA monomeeride inkorporeerimist



standard DNA või RNA oligonukleotiidi eesmärgiga tõsta saadud siLNA ühendi või antisens oligomeeri stabiilsust bioloogilistes vedelikes, seda nt resistentsuse tõstmise läbi nukleaase puudutavas osas (endonukleaasid ja eksonukleaasid). Sellele vastavalt evivad leiutisekohased ühendid LNA monomeeride

5 inkorporeerimise toimet paremat poolestusaega vereringes, mis on saavutatud tänu selle kõrgemale sulamistemperatuurile ja/või selle kõrgemale resistentsusele nukleaase puudutavas osas. Stabiilsuse ulatus sõltub kasutatavate LNA monomeeride hulgast, nende positsioonist oligonukleotiidides ning kasutatava LNA monomeeri tüübist. Võrreldes DNA ja fosfortioaatidega osutub võimalikuks

10 järgmise, oligonukleotiidide nukleolüütilise degradeerumise vastu stabiliseeriva olukorra loomine: DNA<<fosfortioaadid, LNA-fosfordiester<LNA-fosfortioaadid.

**[0156]** Väga paljude rakenduste korral sisaldab leiutisekohane eelisühend ühendeid, mis inkubeerimisel seerumisse (nt inimese, veise või hiire seerum),

15 milleks on näiteks 10% veiselooteseerum füsioloogilises soolalahuses temperatuuril 37 kraadi viie tunni jooksul, degradeeruvad vähemale tasemele kui see on vastava ssDNA, ssRNA või dsRNA ühendi korral. Eelistatavalt vähem kui 25% leiutisekohase ühendi algsest kogusest on 5 tunni möödumisel degradeerunud, veelgi eelistatavamalt vähem kui 50% leiutisekohase ühendi algsest kogusest on 5 tunni

20 möödumisel degradeerunud, ja veelgi eelistatavamalt vähem kui 75% leiutisekohase ühendi algsest kogusest on 5 tunni möödumisel degradeerunud. Teise teosutsviisi kohaselt on eelistatav, et vähem kui 25% leiutisekohase ühendi algsest kogusest on 10 tunni möödumisel degradeerunud ning veelgi eelistatavamalt on vähem kui 50% leiutisekohase ühendi algsest kogusest 10 tunni möödumisel degradeerunud.

25 **[0157]** Nii nagu see selgub ülaltoodust, võivad leiutisekohased ühendid sisaldada ühte või rohkemat LNA monomeeri eraldi või kombinatsioonis nukleotiididega, mis on kas looduslikult esinevad või seisnevad Nukleotiidi analoogides. Sellisteks muudeks jääkideks võivad olla mis tahes käeolevaga kirjeldatud jäägid ja need võivad sisaldada näiteks sünnipäraseid RNA monomeere, sünnipäraseid DNA

30 monomeere, samuti nukleotiidi variante ja analooge nagu näiteks neid, mida on

kirjeldatud seonduvalt ülaltoodud, „nukleotiidi“ määratlusega. Selliste nukleotiidide variantide ja analoogide spetsiifilised näited hõlmavad järgmist; 2'-F, 2'-O-Me, 2'-O-metoksüetüül (MOE), 2'-O-(3-aminopropüül) (AP), heksitool nukleinhape (HNA), 2'-F-arabino nukleinhape (2'-F-ANA) ja 0-tsükloheksenüül nukleosiid (CeNA). Lisaks võib internukleosiidlingiks olla fosforodiester, fosforotioaat või N3'-P5' fosforoamidaat internukleosiidlingid, nagu eespool kirjeldatud.

**[0158]** Reeglina sisaldavad leiutisekohaste ühendite eraldiseisvad harud, mis hõlmavad ühte või rohkemat LNA monomeeri, vähemalt ligikaudu 5%, vähemalt ligikaudu 10%, vähemalt ligikaudu 15% või vähemalt ligikaudu 20% LNA monomeeri, seda olenevalt nukleotiidide koguhulgast harus. Teatavates teostusviisides sisaldavad leiutisekohased ühendid vähemalt ligikaudu 25%, vähemalt ligikaudu 30%, vähemalt ligikaudu 40%, vähemalt ligikaudu 50%, vähemalt ligikaudu 60%, vähemalt ligikaudu 70%, vähemalt ligikaudu 80% või vähemalt ligikaudu 90% LNA monomeeri, seda olenevalt nukleotiidide koguhulgast harus.

**[0159]** Leiutisekohased ühendid võidakse valmistada tuginedes käesolevaga kirjeldatud tehnikatele, mis hõlmavad sünteese, mida on kirjeldatud dokumendis U.S. Pat. Publication Nr 2007/0191294 ja W02007/107162.

### Ravimkoostised ja nende manustamine

20

**[0160]** Leiutisekohaste ühendite eeliskasutus seisneb ravimites kasutamiseks akuutse või kroonilise neuripaatiaga seonduvate sümptomite ravimiseks, ennetamiseks ning/või leevendamiseks. Tõhusa ja ohutu ravimi väljatöötamine eeldab sageli erinevate parameetrite nagu näiteks afiinsuse/spetsiifilisuse, stabiilsuse bioloogilistes vedelikes, omastatavuse rakkude poolt, toimeviisi, farmakokineetiliste omaduste ja toksilisuse väga täpset peenhäälestust. Need nagu ka muud parameetrid on asjatundjale hästi teada.

25

[0161] Samuti seisneb käesolev leiutis teise aspekti kohaselt ravimkoostises, mis sisaldab leiutisekohaseid ühendeid ja farmatseutiliselt vastuvõetavat lahjendit, kandjat või adjuvanti.

[0162] Veel ühest aspektist seisneb käesolev leiutis leiutisekohaste ühendite  
5 kasutamiseks ravimina.

[0163] Arusaadavaks loetakse seda, et annustamine sõltub ravitava neuropaatia tõsidusest ja ravialluvusest ning ravi käik võib kesta mõnest päevast kuni mitme kuuni või kuni ravikuuri lõpetamiseni või haigusseisundi raugemise saavutamiseni. Optimaalsed doseerimisgraafikud kalkuleeritakse lähtuvalt ravimi akumulatsioonise  
10 mõõtmise tulemustest patsiendi kehas. Optimaalsed annused võivad varieeruda olenevalt iga leiutisekohase ühendi suhtelisest tõhususest ja/või ravitavast näidustusest (vt alljärgnev). Tavaliselt hinnatakse seda EC<sub>50</sub>s alusel, mis on teadaolevalt tõhus *in vitro* ja *in vivo* loomudelitel. Reeglina jäävad annused vahemikku alates 0,01 mikrogrammi kuni 1 g kehakaalu kg kohta ning võivad olla manustatavad üks  
15 kord või sagedamini päevas, nädalas, kuus või aastas või isegi iga 2 kuni 10 aasta tagant või siis katkematu infusioonina alates tundidest kuni mitme kuuni välja. Annustamise kordumäärad määratakse tuginevalt ravimi, mõõdetud resistentsus-  
aegadele ja kontsentratsioonidele kehavedelikes või kudedes. Pärast edukat ravi võib osutada soovitatavaks patsiendi suunamine püsiravile eesmärgiga hoida ära  
20 haigusseisundi kordumine.

[0164] Käesolev leiutis seisneb arusaadavalt ka ravimkoostises, mis sisaldab toimeainena vähemalt ühte leiutisekohast ühendit (nt antisenss ühend, siLNA, siRNA, sisiLNA). Iseenesest mõistetavalt sisaldavad leiutisekohased ravimkoostised valikuliselt farmatseutilist kandjat ning ravimkoostis sisaldab valikuliselt edasisi  
25 ühendeid, nagu selleks on näiteks anti-inflammatoorsed ühendid (nt mitte-steroid ja steroid põletikuvastased ained) ja/või immuunmoduleerivad ühendid.

[0165] Leiutisekohane ühend on kasutatav suurel hulgal erinevates farmatseutiliselt vastuvõetavates soolades. Käesolevas kontekstis kannab see termin soolade tähendust, mis evivad käesolevaga määratletud ühendite soovitud bioloogilist

aktiivsust ja millega kaasneb üksnes minimaalselt soovimatuid toksilisi toimeid. Nimetatud soolad võivad mittepiirava näitena olla moodustatud orgaanilise aminohappega ning aluse liitsooladega, mis on moodustatud metalli katioonidega nagu näiteks tsink, kaltsium, vismut, baarium, magneesium, alumiinium, vask, koobalt, 5 nikkell, kaadmium, naatrium, kaalium vms või katioonidega, mis on moodustatud ammoniaagist, N,N-dibensüületüleendiamiinist, 0-glükoosamiinist, tetraetüülammoniumist või etüleendiamiinist.

**[0166]** Ühes leiutisekohases teostuses võib leiutise ühend olla eellasravimi kujul. Oligonukleotiidid on iseeneses negatiivse laenguga ioonid. Tänu rakumembraanide 10 lipofiilsele iseloomule on oligonukleotiidide omastamine rakkude poolt piiratud võrreldes neutraalsete või lipofiilsete ekvivalentidega. Nimetatud polaarsuse „takistus“ on välditav eellasravimite lähenemisega (vt nt Crooke, R. M. (1998) väljaandes Crooke, S. T. Antisense Research and application. Springer-Verlag, Berlin, Saksamaa, val. 131, lk-d 103 kuni 140). Selle lähenemise korral valmistatakse 15 oligonukleotiidid kaitstud viisil, nii et oligo on manustamisel neutraalne. Need kaitsvad rühmad on välja töötatud sellisel moel, et osutuks võimalikuks nende eemaldamine oligo omastamisel rakkude poolt. Selliste kaitsvate rühmade näideteks on S-atsetüültoetüül (SATE) või S-pivaloüültoetüül (t-butüül-SATE). Nimetatud kaitsvad rühmad on vastupidavad nukleaasile ja selektiivselt rakusiseselt eemaldatud.

20 **[0167]** Moodustatud ravimi osa võib sisaldada farmatseutiliselt vastuvõetavates sideainetes ja adjuvantides. Kapslid, tabletid ja pillid jne võivad sisaldada näiteks järgmisi ühendeid: mikrokristalne tselluloos, kummi või želatiin sideainetena; tärklis või laktoos abiainetena; stearaadid lubrikantidena; magusained või maitseained. Kapslite korral võivad doseerimisühikud sisaldada vedelat kandjat nagu rasvõlised. 25 Samal moel võivad doseerimisühiku osaks olla ka suhkrukattes või enteraaelses vormis olevad ained. Leiutisekohased ühendid võivad muuhugas olla ka ravimite toimeainete emulsioonid ja lipiidid, mis moodustavad mitsellaarse emulsiooni. Leiutisekohane ühend võib olla segatud kokku materjaliga, mis ei kahjusta soovitud toimet, või materjaliga, mis täiendab soovitud toimet. Need võivad seisneda näiteks muudes, teisi 30 oligonukleotiidühendeid sisaldavates ravimites. Parenteraalseks, subkutaanseks,

intradermaalseks või paikseks manustamiseks võib ravimvorm sisaldada steriilset lahjendit, puhvreid, toonuse regulaatoreid ja antibakteriaalseid aineid. Toimeühend võidakse valmistada kandjatega, mis kaitsevad lagunemise või kehast kohese väljaviimise eest, milleks on näiteks implantaadid või mikrokapslid kontrollitud vabanemist võimaldavate omadustega. Veenisiseseks manustamiseks on eelistatud kandjateks füsioloogiline soolalahus või fosfaatpuhverdatud soolalahus.

**[0168]** Eelistatavalt sisaldub leiutisekohane ühend ravimvormi üksuses nagu näiteks farmatseutiliselt vastuvõetavas kandjas või lahjendis piisavas koguses, et tagada patsiendile terapeutiliselt efektiivse koguse saamine ilma sellega ravitava patsiendi juures tõsiseid kõrvaltoimeid põhjustamata.

**[0169]** Käesoleva leiutise kohased ravimkoostised on manustatavad erinevatel viisidel olenevalt sellest, kas soovitud on paikne või süsteemne ravitoime ja sõltuvalt ravitavast piirkonnast. Manustamine võib olla (a) suukaudne (b) pulmonaane, nt pulbrite või aerosoolide inhalatsioon või insuflatsioon, sealhulgas manustamine nebulisaatoriga, intratrahheaalne, intranasaalne manustamine, (c) paikne, hõlmates epidermaalset, transdermaalset, silma- ja limaskestakaudset manustamist, sealhulgas vaginaalne ja rektaalne manustamine; või (d) parenteraalne, hõlmates veenisisesest, arterisisesest, subkutaanset, intraperitoneaalset ning lihasesisesest süstimist või infusiooni; või koljusisene, nt intratekaalne või intraventikulaarne manustamine. Ühe näite korral toimub ravimkoostise manustamine IV, IP, suukaudselt, paiksest või boolussüstina või siis manustamisel otse sihtmärkorganisse. Ravimkoostised ja ravimvormid paikseks manustamiseks võivad seisneda transdermaalsetes plaastrites, salvides, losjoonides, kreemides, geelides, tilkades, spreides, ravimküünaldes vedelikes ja pulbrites. Vajalikuks või soovitatavaks võib osutada tuginemine tavapäraselt kasutatavatele farmatseutilistele kandjatele, vesilahustele, pulbrilistele või õlilistele põhjadele, paksendajatele ja muule sellisele. Ühtlasi võib otstarbekaks osutada tuginemine kaetud kondoomide, kummikinnaste ja muu sarnase kasutamisele. Eelistatud paikse kasutusega ravimvormid hõlmavad neid ravimvorme, milles leiutisekohased ühendid on kokkusegatuna paiksest kohaletoimetavate ainetega, nii nagu nendeks on näiteks lipiidid, liposoomid,

rasvhapped, rasvhappe estrid, steroidid, kelaativad ained ja pindaktiivsed ained. Koostised ning ravimvormid suukaudseks manustamiseks hõlmavad, kuid mitte ainult, pulbreid või graanuleid, mikrogranulaarseid vorme, nanogranulaarseid vorme, suspensioone või lahuseid vees või mittevesikeskkonnas, kapsleid, geelkapsleid, 5 kotikesi, tablette või minitablette. Koostised ja ravimvormid parenteraalseks, intratekaalseks või intraventikulaarseks manustamiseks võivad hõlmata steriilseid vesilahuseid, mis muuhulgas võivad sisaldada puhvreid, lahjendeid ja muid sobivaid lisandeid nagu näiteks, kuid mitte ainult, läbistamistugevdajaid, kandjähendeid ja muid farmatseutiliselt vastuvõetavaid kandjaid või abiaineid.

- 10 **[0170]** Käesoleva leiutise kohased ravimkoostised hõlmavad, kuid mitte ainult, lahuseid, emulsioone ning liposoomi sisaldavaid ravimvorme. Need koostised võivad olla valmistatud erinevatest koostisainetest, milleks on näiteks, kuid mitte ainult, eelmoodustunud vedelikud, iseemulgeeruvad tahked ained ja iseemulgeeruvad pooltahked ained. Ravimi kohaletoimetamist tuumori koe sisse võidakse tõhustada 15 kandja poolt vahendatud kohaletoimetamise teel, milleks on näiteks, kuid mitte ainult, katioonsed liposoomid, tsüklodekstriinid, porfüriini derivaadid, hargnenud ahelaga dendrimeerid, polüetüülenimiinpolümeerid, nanoosakesed ja mikrokuulikesed (Dass C R. J Pharm Pharmacol 2002; 54(1):3-27). Käesoleva leiutise kohased ravimkoostised, mis võidakse vajadusel lisada ühikdoosivormis, valmistatakse 20 vastavalt tavapärastele tehnikatele, mis on ravimitööstuses laialdaselt kasutusel. Sellisteks tehnikateks on näiteks toimeainete kokkusobitamise etapp farmatseutilis(t)e kandja(te) või abiaine(te)ga. Tavaliselt valmistatakse ravimvormid toimeainete ühtlase ja vahetu kokkuviiamise teel vedelate kandjatega või peenestatud tahkete kandjatega või nende mõlemiga, millele järgneb vajadusel tootele lõpliku kuju andmine. Käesoleva 25 leiutise kohased koostised võidakse valmistada ükskõik millises paljudest ravimvormidest, milleks on näiteks, kuid mitte ainult, tabletid, kapslid, geelkapslid, vedelsiirupid, pehmed geelid ja ravimküünlad. Käesoleva leiutise kohased koostised võivad muuhulgas olla valmistatud ka suspensioonidena vesikeskkonnas, mittevesikeskkonnas või segatehnika alusel. Vesisuspensioonid võivad edasiselt sisaldada 30 aineid, mis suurendavad suspensiooni viskoossust, milleks on näiteks naatrium

karboksümetüülselluloos, sorbitool ja/või dekstraan. Suspensioon võib muuhulgas sisaldada stabilisaatoreid. Leiutisekohased ühendid võivad muuhugas olla konjugeeritud ka ravimi toimeaineteks, milleks on näiteks aspiriin, ibuprofeen, sulfaatravim, antidiabeetikum, antibakteriaalne aine või antibiootikum. Eespoolt on kirjeldatud ka muid, otstarbekohaseid konjugaate.

**[0171]** Käesolev leiutis hõlmab lahjendeid, kandjaid ning puhvreid, mis muudavad oligonukleotiidi imetajale nagu näiteks närilisele või inimesest patsiendile suukaudselt omastatavaks. Konkreetseks näiteks sellisest kandjast on kapraatsool, näiteks naatriumkapraat. vt Tillman, LG *et al* (2008) *J. of Pharmaceutical Sciences*, Jan. 97(1) 225; Gonzalez, FM *et al* (2003) *Eur. J. Pharm. Biopharm*, Jan: 55( 1): 19-26; Aouadi, M *et al* (2009) *Nature* 458: 1180; ja selles esitatud viited, milles on kirjeldatud oligonukleotiidi oralselt manustatavate ravimvormide valmistamist.

**[0172]** On arusaadav, et leiutise konkreetne ravimvorm või manustamisviis võib sisaldada vaid ühe, leiutisekohase ühendi ühendit ainsa toimeainena. Samas sisaldab ravimvorm või manustamisviis leiutise teiste teostusviiside kohaselt kahte või rohkemat leiutisekohast ühendit nagu näiteks 2, 3, 4, 5, 6 7, 8, 9 või 10 nimetatud ühendit. Tavaliselt ei ületa kasutatavate leiutisekohaste ühendite hulk 5 ühendit, milleks on näiteks üks, kaks või kolm ühendit. Näiteks võivad sellised ravimvormid või manustamisviisid hõlmata ühe või rohkema siLNA või sisiLNA ühendi manustamist, mis on sihitud esimesele nukleiinhappele ja ühte või rohkemat täiendavat siLNA või sisiLNA ühendit, mis on sihitud teisele nukleiinhappe sihtmärgile. Võimalik on kahe või rohkema kombineeritud ühendi kasutamine üheskoos või teineteise järel.

**[0173]** Leiutisekohased ühendid on kasulikud paljudeks terapeutilisteks rakendusteks, nii nagu seda on eespool kirjeldatud. Tavaliselt hõlmavad terapeutilised meetodid leiutisekohaseks kasutamiseks terapeutiliselt efektiivse koguse soovitud ühendi (või ühe või rohkema ühendi nagu näiteks 1, 2, 3 või 4 sama) manustamist imetajale, otstarbekohaselt inimesele. Konkreetsete teostusviiside kohaselt seisneb käesolev leiutis ravimkoostistes, mis sisaldavad (a) ühte või rohkemat leiutisekohast ühendit ning (b) ühte või rohkemat muud ainet, nagu selleks on

näiteks põletikuvastased ained või täiendagonistid, nii nagu neid on näiteks käesolevaga kirjeldatud. Kasutamisel koos leiutisekohaste ühenditega võidakse neid koostisi ja aineid kasutada eraldi, järgemisi või kombineerituna ühe või rohkema, muu sellise koostise ja ainega, sealhulgas teiste ravimitega, kaasa arvatud sellised ravimid, mis on leidnud kinnitust kasutamisel akuutsete või krooniliste neruopaatiate ennetamiseks või ravimiseks.

**[0174]** Käesoleva leiutise kohaseid ühendeid võidakse kasutada uuringu reagentidena diagnoosimiseks, ravimiseks ja profülaktilistel eesmärkidel. Uuringutega seondult võidakse ühendit kasutada sihtmärkgeenide sünteesimise spetsiifiliseks inhibeerimiseks rakkudes ja katseloomadel, hõlbustades seeläbi sihtmärgi funktsionaalset analüüsi või selle kasulikkuse hindamist sihtmärgina ravisekkumisega seondult. Ühe teostusviisi kohaselt võidakse oligomeere, siRNA ja sisiRNA koostisi kasutada sihtmärgi tuvastamiseks ja kvantifitseerimiseks, ekspresseerimiseks rakus ja kudedes Northern blottingu meetodil, *in-situ* hübridiseerimise või mõne muu sarnase tehnika toimet. Terapeutilises aspektis toimub looma või inimese, kelle juures kahtlustatakse haigust või häiret, mis on ravitav sihtmärgi ekspresseerimise moduleerimise teel, ravimine ühendite manustamise teel vastavalt käesolevale leiutisele.

## 20 Närvi regenereerimine

**[0175]** Nagu öeldud, on käesolev leiutis kasulik meetodis, mis on mõeldud komplementisüsteemi soovimatust aktiivsusest vahendatud häire sümptomite ravimiseks, ennetamiseks või pärssimiseks. Ühe rakenduse kohaselt seisneb meetod vähemalt ühe leiutisekohase ühendi, otstarbekohaselt vähemalt ühe, käesolevaga kirjeldatud ravimkoostise manustamises seda vajavale imetajale (nt primaadist või mitteprimaadist imetaja, otstarbekohaselt inimesest patsient). Lause „komplementisüsteemi soovimatust aktiivsusest vahendatud häire“ kannab neuronaaalse häire tähendust, mis väljendub täies mahus või osaliselt võimetuses või



puudulikkuses närvi regenererimisel. Nimetatud häireteks on näiteks sellised häired, mis väljenduvad võimetuses või puudulikkuses närvi regenererimisel pärast akuutseid või kroonilisi närvikahjustusi perifeerses närvisüsteemis (PNS) või kesknärvisüsteemis (CNS). Võimetus või puudulikkus närvi regenererimisel (või

5 kahjustatud närvide funktsiooni parandamine) on tuvastatav ja teatavatel juhtudel kvantifitseeritav testidega, mis on valdkonna asjatundjale hästi teada, vt nt Ramaglia, V. *et al* (2007) *J. Neurosci.* 27:7663 (milles on muuhulgas kirjeldatud uuringuid närvi degeneratsiooni ja regeneratsiooni tuvastamiseks ja valikuliselt kvantifitseerimiseks rottidel); Wolf, SL (2001) *Stroke* 32:1635 (motoorse funktsiooni

10 test); S. Van Tuijl, *et al* (2002) *Spinal Cord* 40:51 (motoorse funktsiooni test); Sheikh, K *et al.* (1980) *Rheumatology* 19:83 (motoorse funktsiooni test); Chan A. We *et al* (2001) *J. Neural. Neurosurg. Psychology* 55:56 (sensoorse funktsiooni test); ning Mayuko. We *et al* (2005) *J. Jap. Soc. For Surgery of the Hand* (2005) 22:842 (mitmik sensoorse funktsiooni testid); ja seal toodud viited.

15 **[0176]** Meetodeid aksonaalse regeneratsiooni jälgimiseks ja parandamiseks on erialakirjanduses kirjeldatud ja need hõlmavad tavaliselt erinevaid, inimesest patsientide juures läbiviidavaid funktsionaalseid teste. Sellised testid võimaldavad tavaliselt sensorsete ja/või motorsete funktsioonide taastumise jälgimise ning nimetatud testideks on näiteks Weinstein Enhanced Sensory Test (WEST), Semmes-

20 Weinstein Monofilament Test (SWMT) ja muud sellised testid, vt W02008/044928 (PCT/NL2007/050490), Ristic S. *et al* (2000) *Clin Orthop Relat Res.* 370:138 ja seal toodud viited, milles on kirjeldatud meetodeid neuronaalse regeneratsiooni tuvastamiseks ja seireks ning meetodeid erinevate neuronaalsete insultide klassifitseerimiseks. Leiutisekohase ühendi sobiv annus on selline, mis

25 võimaldab aksonaalse regeneratsiooni tõendatud edendamise vastavalt nimetatud või mõnede muudele asjaomastele testidele, nii nagu neid on käesolevaga kirjeldatud. Mõisted „efektiivne doos“, „terapeutiline kogus“ või nendega seonduvad mõisted kannavad koguse tähendust, millest piisab soovitud terapeutilise väljundi saavutamiseks, nii nagu need on määratletavad nimetatud ja muude,

30 otstarbekohaselt heakskiidetud testidega.

[0177] Leiutisekohased koostised on kasutatavad akuutse või kroonilise närvikahjustuse ennetamiseks, ravimiseks või sümptomite leevendamiseks. Nii akuutse kui ka kroonilise aksonaalse regeneratsiooni tingimusi on dokumentides kirjeldatud, seda näiteks dokumendis W02007/044928 ja selles toodud viidetes. Perifeersete 5 närvide akuutne trauma on suhteliselt sagedasti esinev nähtus, hõlmates nii muljumistraumasid kui ka lävistustraumasid, mis on põhjustatud näiteks kuulitabamusest või muudest kehasse tungivatest esemetest. Levinud on väliskehadest (nt klaas, plekk) põhjustatud löikehaavadest vigastused, millega kaasnevad närvide puhtad rebendid, samuti närvide vigastamised, mis on põhjustatud luumurdudest ja 10 murdudega nihestustest, sealhulgas ulnaarnärvi neuropraksia ning radiaalnärvi kahjustused ja halvatus. Tavaliselt põhjustab akuutne närvivigastus pika kestuvsega neuropaatilise valu, mis väljendub allodüüniana, valuläve alanemises ja hüperplaasias ning suurenevas tundlikkuses valulistele ärritajatele, vt Calahan AR, *et al* (1996) Injury to the peripheral nerves. In: FeliCiano DV, Moore EE, Mattox 15 KL. Trauma. 3rd ed. Stamford, Conn: Appleton & Lange; 1996:853.

[0178] Muudeks käesoleva leiutisega hõlmatavateks akuutseteks närvivigastusteks on muuhulgas traumaatilised ajukahjustused (TBI) ja seljaaju ning perifeersete/sensorsete närvide akuutsed vigastused, erinevad sporditraumad sealhulgas närviinsult, vt ka W02007/044928 ja selles esitatud viited.

[0179] Teostuses, mille korral osutub soovitavaks aksonaalse regeneratsiooni edendamise vastuseks akuutsele närvikahjustusele, on tavaliselt eelistatav vähemalt ühe leiutisekohase ühendi (nt ühte, kahte või kolme sama) manustamine nii ruttu kui võimalik pärast insulti, seda näiteks vahemikus ligikaudu 24, 12, 6, 3, 2, 1 või vähema tunni, eelistatavalt enne 5, 10, 20, 30 või 40 minuti möödumist insuldist. 25 Lisaks on vähemalt üks leiutisekohane ühend manustatav profülaktilistel (ennetava meetmena) eesmärkidel enne meditsiinilist sekkumist (nt kirurgiline operatsioon), millega kaasneb teatav närvikahjustuse oht. Leiutise selle teostusviisiga kaasneb närvi regenereerimise muutumine paremuse suunas ja lühikesed taastumisaegad.

[0180] Nagu öeldud, on leitud kasulik närvisüsteemi krooniliste vigastustega seonduvate sümptomite ravimiseks, ennetamiseks või leevendamiseks. Mittepiiravateks näideteks on näiteks dokumendis W02007/044928 avaldatud näited koos paljude krooniliste demüeliniseerivate neuropaatiatega (CMT1 tüüp),  
5 HMSN (CMT) haiguse tüüp 1A ja 1B, HNPP ja muud rõhupõhised halvatused, Bethlem müopaatia, Limb-Geridle lihasdüstroofia, Miyoshi müopaatia, risomeelne kondrodüsplaasia punctata, HMSN-Lom, PXE (pseudoxanthomatosis elastica), CCFDN (kongeniaalne katarakt näo düsmorfism ja neuropaatia), Alzheimeri tõbi, Huntingtoni tõbi, Charcot-Marie-Tooth haigus, hulgiskleroos, amüotroofne  
10 lateraalskleroos (ALS), Guillain-Barre sündroom (GBS, mida tuntakse ka kui äge põletikuline demüeliniseeriv polüneuropaatia ehk AIDP), leukodüstroofia, Parkinsoni tõbi, motoneuroni haigus, diabeetilised neuropaatiad, distaalsed aksonopaatiaid nagu näiteks need, mis on põhjustatud neuronite metaboolsest või toksilisest häirumisest (nt diabeediga, neerutalitluse häirega, kokkupuutest ravimi või  
15 toksiiniga (nt vähivastane ravim), alatoitumuse või alkoholismiga seonduvalt), mononeuropaatiad, radikulopaatiaid (nt koljunärvide VII; näonärvid), Hanseni tõbi (pidalitõbi) ning pleksopaatiaid nagu näiteks brahhiaalne neuriit; ja fokuseerimishäire neuropaatiad (nt karpaalkanali sündroom).

[0181] Rakenduste korral, mille terapeutiliseks eesmärgiks on kroonilise insuldi  
20 ravimine, osutub tavaliselt eelistatavaks tuginemine pikemaajalise manustamise protokollidele. Seega toimub ühe rakenduse kohaselt vähemalt ühe leiutisekohase ühendi (nt ühe, kahe või kolme sama) manustamine mis tahes selleks sobival, käesolevaga nimetatud manustamisviisil vähemalt 24 tunni jooksul, eelistatavalt mitme päeva, nädala või kuu jooksul kuni, vajaduse korral, mitme aastani välja  
25 konkreetsete näidustustega seonduvate sümptomite ravimiseks.

[0182] Nagu öeldud, on leiutisekohased ühendid kasutatavad eraldi või  
kombineerituna muude ainetega komplemendisüsteemi soovimatust aktiivsusest vahendatud haiguse sümptomite ravimiseks, ennetamiseks või leevendamiseks. Ühes  
rakenduses, mille korral kaasneb häirega põletik või on alust arvata põletiku  
30 kaasnemist häirega seonduvalt, hõlmab meetod vähemalt ühe põletikuvastase aine

(nt 1, 2 või 3 sama) ja/või komplementinhibiitori manustamise etappi. Põletikuvastasteks aineteks on näiteks, kuid mitte ainult, steroidid (nt kortikosteroid) või mittesteroidsed põletikuvastased ravimid (NSAID). Muudeks sobivateks steroidideks on näiteks kortisoon, hüdrokortisoon, triamtsinoloon (kenakort),  
5 metüülprednisoloon (medrool), prednisoloon (preloon), prednisoon ja deksametasoon (dekadroon). NSAIDs on näiteks atsetüülidaliitsüülhape (aspiriin, ekotriin), koliini magneesiumsalitsülaat (trilisaat), Cox-2 inhibiitorid, diklofenak (voltareen, kataflaam, koltareen-XR), diflunisaal (dolobid), etodolak, (iodiin), fenoprofeen (nalfon), flurbiprofeen (ansaid), ibuprofeen, indometatsiin, (indotsiin,  
10 indotsiin-SR), ketoprofeen, meklofenamaat (meklomen), nabumetoon (relafen), naprokseen (naprosiin, naprelan, anaprox, aleve), oksaproosiin, (claypro), fenüülbutasoon (butasolidiin), piroksikaam, (feldeen), salsalaat, (disaltsiid, salflex), tolmetiin (tolektiin) ja valdekoksiib (bextra).

**[0183]** Rakenduste korral, milles leiutisekohast koostist kasutatakse hulgiskleroosiga seonduvate sümptomite ennetamiseks, ravimiseks või leevendamiseks, võidakse  
15 koostist kasutada eraldi või kombineerituna ühe või rohkema, heakskiidetud ravimiga nagu näiteks Rebif® (interferoon beeta-1a, Serono, Pfizer), Avonex® (interferoon beeta-1a, Biogen-Idec), Betaseron® (interferoon beeta 1b, Bayer Schering), Copaxone® (glatirameeratsetaat, Teva), Novantrone® (mitosantroon, Serono) ning  
20 Tysabn® (natalisumaab, Biogen-Idec). Nii nagu seda on eespool täpsemalt kirjeldatud, võimaldab leiutisekohase ühendi koosmanustamine patsiendile kokkupuute vähema, teadaoleva ravimi kogusega konkreetse ajaperioodi üleselt, vähendades seeläbi soovimatute kõrvaltoimete tekke võimalust.

## 25 Ravipuhkus

**[0184]** Nagu öeldud, osutub vähemalt ühe, leiutisekohase ühendi manustamise teel võimalikuks käesolevaga nimetatud häirete ennetamine, ravimine või tõsiduse leevendamine. Samas on kindlaks tehtud, et seejuures ei osutu soovitud mõju

saavutamiseks vajalikuks isikute pidev allutamine ühendile. See tähendab, et võimalik on manustatava ühendi, mõnedel juhtudel oluline koguse vähendamine teatava ajaperioodi üleselt, mida käesolevaga nimetatakse „ravipuhkuseks.“ Ravipuhkuse kestel on komplement mRNA madal (vähem kui ligikaudu 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, või enam, võrdluses kontrolliga ja qPCR kasutamisel) mitmete päevade jooksul, mõne nädala jooksul, kuni ligikaudu ühe kuu jooksul pärast leiutisekohase ühendi manustamist. On alust arvata, et nendes tingimustes saadud komplement mRNA kogus on piisav kodeeritud valgu normaaltasemete hoidmiseks. Leiutisekohase ühendi manustamine, ükskõik kas üksi või kombineerituna mõne muu ravimiga, ei osutu selle ajaperioodi kestel vajalikuks. Pärast ravipuhkust võidakse ühe või rohkema leiutisekohase ühendi manustamist üksi või kombineerituna mõne(de) muu(de) ravimi(te)ga jätkata.

**[0185]** Leiutise selle aspekti rakendamisega kaasnevad olulised eelised.

**[0186]** Näiteks võimaldab leiutise kasutamine säästa inimesest patsiente pärast soovitud tervenimist invasiivsetest, mõningatel juhtudel valulikest ning sageli ka korduvatest ja kallitest raviprotokollidest. Võimalikke tõsised kõrvaltoimed on võimalik vähendada, edasi lükata või teatavatel juhtudel neist vabaneda. Näiteks on mõnede patsientide juures, kes saavad hulgiskleroosi ravivaid ravimeid, täheldatud iiveldushoogude esinemise, gripilaadsete sümptomite, süstekoha reaktsioonide, alopeetsia, põletike, kopsupõletiku, menstruaatsioonihäirete, depressiooni, sapikivitõve ja/või progresseeruva multifokaalse leukoentsefalopaatia (PNL) väljakujunemise riski. Need ja muud kõrvaltoimed on teatavatel juhtudel leiutisekohase lahenduse abil vähendatavad või ärahoitavad.

**[0187]** Lisaks võimaldab leiutise kasutamine vähendada kulusid, mis kaasnevad korduvate ja sagedaste ravimite manustamisega. Näiteks vajavad nii Rebif®, Avonex®, Betaseron® kui ka Copaxone® teadaolevalt manustamist hulgiskleroosiga patsientidele iganädalaselt üks või mitu korda, seda sageli valuliku süstimise teel. On alust arvata, et leiutisekohase ühendi koosmanustamine toob kaasa ravimi manustamis põhiselt väiksema vajaliku koguse. Teise võimalusena või

lisavõimalusena osutub seeläbi vajalikuks ravimi harvem manustamisvajadus. Mõlemal juhul toob see kaasa patsiendi ravikulude langemise ja patsiendi mugavuse paranemise. Muud ravimid hulgiskleroosi ravimiseks vajavad teadaolevalt manustamist patsientidele iga paari kuu tagant (nt Novantrone® ning Tysabri®). Ka  
5 nende teostusviside korral võimaldab leiutisekohane lahendus vähendada ravimi vajalikku kogust või toob kaasa vähem sagedase manustamisvajaduse, vähendades seeläbi kõrvaltoimete ohtu ja piirates kaasnevaid kulusid.

**[0188]** Leiutise edasiseks eesmärgiks on käesolevaga viidatud häirete sümptomite ennetamine, ravimine või piiramine, mille korral on leiutisekohase ühendi  
10 manustamine üksi või kombineerituna mõne teise teadaoleva ravimiga ravipuhkuse perioodi kestel piiratud. Ühe rakenduse kohaselt puudub ravimi manustamise vajadus ravipuhkuse perioodi kestel täielikult. Pärast ravipuhkust või mõningatel juhtudel ravipuhkuse perioodi ajal toimub leiutisekohase ühendi, teadaoleva ravimi (või mõlema), taasmanustamine imetajale koguses, mis on sisuliselt sama eelnevalt  
15 manustatud kogusega või sellest erinev (nt madalam). Nimetatud teine ravimi manustamine on soovi korral kohaldatav seonduvalt järgmise ravipuhkusega. Seega seisneb leiutis lahenduses, mis võimaldab vähemalt ühe ravipuhkuse, mille korral järgneb igale ravipuhkusele eelistatavalt vähemalt ühe, leiutisekohase ühendi koguse manustamine, teadaoleva ravimi (või mõlema) soovitud terapeutilise väljundi  
20 saavutamise eesmärgil.

**[0189]** Seega toimub ühe konkreetse rakenduse korral leiutisekohase ühendi manustamine inimesest patsiendile, kes kannatab (või kelle juures on alust arvata, et kannatab) hulgiskleroosi all. Leiutisekohane ühend võidakse manustada eraldi või  
25 kombineerituna mõne teadaoleva, hulgiskleroosi ravimiga, nagu nendeks on näiteks Rebif ®, Avonex®, Betaseron®, Copaxone®, Novantrone® või Tysabri®, terapeutiliselt tõhusas koguses. Ravipuhkuse perioodi ajal osutub võimalikuks leiutisekohase ühendi ja/või hulgiskleroosi ravimi manustatava koguse oluline vähendamine või puudub vajadus selle järele täielikult. Meetod on teostatav ühekordselt, korratav kaks, kolm korda või siis vajalik arvu kordi eesmärgiga  
30 saavutada ravirežiim, mis ühildub ühe, kahe, kolme või rohkema ravipuhkusega.

Meetodid on vajadusel korratavad, seda näiteks iga paari nädala tagant, iganädalaselt, iga paari kuu tagant kuni patsiendi elupäevade lõpuni välja eesmärgiga ennetada, ravida või leevendada hulgiskleroosiga kaasnevaid sümptomeid.

**[0190]** Enne ravipuhkuse näidustamist on leiutisekohase ühendi või teadaoleva ravimi kogus eelistatavalt kuid mitte tingimata selline, et see oleks terapeutiliselt efektiivne. Ühe teostusviisi kohaselt on leiutisekohase ühendi kogus tavaliselt piisav, et piirata komplement mRNA olemasolu võrrelduna kontrolliga ja määratletuna näiteks pPCR-ga. Ravipuhkusega alustamiseks vähendatakse leiutisekohase ühendi või teadaoleva ravimi kogust või manustamine lõpetatakse täielikult. Ravipuhkuse 10 periood ei ole seotud mis tahes konkreetse, komplement mRNA tasemega *in vivo* nii kaua, kui tasemed püsivad alla kontrolli, nii nagu seda on eelnevalt märgitud. Pärast ravipuhkuse perioodi võidakse imetaja allutada täiendavale teraapiale, sealhulgas vähemalt ühe, leiutisekohase ühendi edasisele manustamisele ükskõik kas eraldi või kombineerituna teadaoleva ravimiga nagu nendeks on näiteks need, mida kasutatakse 15 hulgiskleroosi ravimiseks, nii nagu seda on käesolevaga kirjeldatud.

**[0191]** Tuginemine konkreetsele ravipuhkuse protokollile otsustatakse kindlate parameetrite alusel, nagu nendeks on näiteks patsiendi üldine tervislik seisund, sugu, häire tõsidus, manustatava, teadaoleva ravimi tüüp jne.

**[0192]** Lisaks on leiutis kasulik meetodis närvi regenereerimise edendamiseks imetajal, hõlmates vähemalt ühe, leiutisekohase ühendi manustamist imetajale (terapeutiliselt või profülaktiliselt) koguses, millest piisab C6 ekspresseerimise pärssimiseks või inhibeerimiseks imetajal ja imetaja närvi regenereerimise edendamiseks. Meetodeid närvi regenereerimise edendamise hindamiseks on käesolevas eespool kirjeldatud ning need seisnevad erinevates testides motoorse ja 25 sensoorse närvifunktsiooni tuvastamiseks ja valikuliselt kvantifitseerimiseks.

**[0193]** Käesolevas kontekstis kannavad mõisted „leiutisekohane ühend“ ja seda sisaldavad laused või „leiutisekohane koostis“ ja seda sisaldavad laused käesolevaga avaldatud koostise tähendust.

[0194] Käesolev leiutis hõlmab ka muid, veelgi spetsiifilisemaid teostusi. Näiteks seisneb leiutis leiutisekohastes oligomeerides pikkusega ligikaudu 10 kuni 50 nukleotiidi, mille külgnev nukleiinaluse järjestus on vähemalt 95%, 96%, 97%, 98%, 99% või 100% järjestuse identsusega nukleiinhappe vastava piirkonnaga, mis  
5 kodeerib KOMPLEMENT KOOSTISOSA 6 (C6) järjestuse, mis kannab tähistust SEQ 10 NO: 1, milles oligomeer hõlmab vähemalt ühte nukleotiidi analoogi. Oligomeer on C6 mRNA ekspresseerimise taseme piiramise võimega imetajal vähemalt 20% ulatuses, nii nagu see on qPCR katsega määratav. Ühe teostusviisi kohaselt sisaldab oligomeer edasiselt vähemalt ühte modifitseeritud  
10 internukleosiidlinki ja modifitseeritud nukleiinalust. Näited on käesolevas dokumendis esitatud ja need sisaldavad modifitseeritud suhkru molekuliosa, mis on valitud rühmast, mis hõlmab järgmist: 2'-O-metoksüetüül modifitseeritud suhkru molekuliosa, 2'-metoksü modifitseeritud suhkru molekuliosa, 2'-O-alküül modifitseeritud suhkru molekuliosa ning bitsükliline suhkru molekuliosa. Tüüpiliselt eelistatud bitsükliline suhkru molekuliosa kasutamiseks käesolevas teostuses on  
15 LNA monomeer. Veelgi konkreetsemas teostusviisis on oligomeeriks gapmer, mis sisaldab 2 või 3 LNA momomeeri oligomeeri igal otsal 3' ja 5'. Ühe näite kohaselt sisaldab oligomeer edasiselt ühte või rohkemat 2'-deoksünukleotiidi, mis paiknevad positsioonil 5' ja 3' tiiva segmendi vahel. Valikuliselt võib gapmer sisaldada  
20 täiendavat 2'-deoksünukleotiidi asukohaga positsioonil oligomeeri otsal 3', 5' või mõlemal otsal 3'- ja 5'. Tüüpiliselt on kasulikuks modifitseeritud internukleotiidlingiks kasutamiseks eelnevas leiutisekohases näites fosforotioaat internukleosiidlink. Modifitseeritud nukleiinaluseks võib olla 5-metüültsütosiin. Sageli võivad kasulikuks osutada väiksemad oligomeerid, seda näiteks pikkusega vahemikus ligikaudu 12 kuni ligikaudu 20 nukleotiidi, veelgi spetsiiflisemalt vahemikus ligikaudu 15 kuni ligikaudu 18 nukleotiidi, milleks on näiteks pikkus 15, 16, 17, 18 või 19 nukleotiidi.

[0195) Tüüpiliselt on kasulikeks oligomeerideks mitmeteks leiutisekohasteks teostusteks need, mis on sihitud nukleotiididele 112-152, 433-473, 546-586, 706-  
30 746, 1015-1055; näiteks on spetsiifilised sihtmärksaidid esitatud alljärgnevas



Tabelites 1 ja 2. Arusaadavalt võivad need oligomeerid olla soovitud tulemuste saavutamiseks ka vähem kui 100% ulatuses identse järjestusega võrreldes järjestusega tähisega SEQ 10 NO: 1. Seega sisaldab oligomeer ühe teostusviisi kohaselt ühte, kahte, kolme, nelja või viite mittevastavust võrreldes Komplement 5 koostisosa C6 järjestusega, mis on tähistusega SEQ 10 NO: 1. Tavaliselt on kasuliku oligomeeri näol tegemist antisens oligonukleotiidiga.

**[0196]** Samuti hõlmab leiutis ravimkoostist, mis sisaldab vähemalt ühte oligomeeri, nii nagu seda on käesolevaga kirjeldatud, ja farmatseutiliselt vastuvõetavat lahendit, kandjat, soola või adjuvanti. Paljude leiutisekohaste teostusviiside korral on kasulik 10 oraalset manustamist võimaldavas vormingus olev oligomeer.

**[0197]** Leiutis on kasulik meetodis KOMPLEMENT KOOSTISOSA 6 (C6) ekspresseerimise piiramiseks või inhibeerimiseks rakus või koes *in vivo*, kusjuures meetod hõlmab nimetatud koe või raku kontaktiviimise etappi patendinõudluse 1 kohase oligomeeriga nii, et KOMPLEMENT KOOSTISOSA 6 (C6) 15 ekspresseerimine oleks piiratud või inhibeeritud. Meetod võib hõlmata edasisi etappe vähemalt ühe Komplement koostisosa 6 (C6) (nt immuuntuvastuse määramise meetoditel), valku kodeeriva mRNA (nt pPCR-ga) ja membraaniründe kompleksi (MAC, nt CH50 katse teel) mõõtmiseks pärast oligomeeri manustamist.

**[0198]** Käesolev leiutis on ühtviisi kasulik meetodis membraaniründe kompleksi 20 (MAC) tootmise piiramiseks või inhibeerimiseks rakus või koes *in vivo*, kusjuures meetod hõlmab nimetatud koe või raku kontaktiviimise etappi patendinõudluse 1 kohase oligomeeriga nii, et MAC ekspresseerimine oleks piiratud või inhibeeritud. Meetod võib hõlmata edasisi etappe vähemalt ühe Komplement koostisosa 6 (C6) (nt immuuntuvastuse määramise meetoditel), valku kodeeriva mRNA (nt pPCR-ga) 25 ja membraaniründe kompleksi (MAC, nt CH50 katse teel) mõõtmiseks pärast oligomeeri manustamist.

**[0199]** Leiutis on ühtviisi kasulik meetodis, mis on mõeldud komplemendisüsteemi soovimatust aktiivsusest vahendatud häire sümptomite ravimiseks, ennetamiseks või pärssimiseks. Eelistatavalt hõlmab meetod vähemalt ühe, käesolevaga käsitletava 30 ravimkoostise manustamist seda vajavale imetajale. Ühe teostusviisi kohaselt on

häireks krooniline demüeliniseeriv neuropaatia nagu näiteks hulgiskleroos (nt RRMS tüüp). Meetod on paindlik ja on kasutatav nii, et ravimkoostis sisaldaks ühte või rohkemat leiutisekohast ühendit. Teise võimalusena võib ravimkoostis edasiselt sisaldada juba teadaolevat ravimit nagu näiteks vähemalt ühte järgmistest: Rebif®  
5 (interferoon beeta-1a), Avonex® (interferoon beeta 1a), Betaseron® (interferoon beeta-1b), Copaxone® (glatirameeratsetaat), Novantrone® (mitosantroon) ning Tysabri® (natalisumaab) (mis kõik on mõeldud hulgiskleroosi ravimiseks).

**[0200]** Leiutis on ühtviisi kasulik meetodis, mis on mõeldud komplemendisüsteemi soovimatust aktiivsusest vahendatud häire sümptomite ravimiseks, ennetamiseks või  
10 pärssimiseks. Eelistatavalt hõlmab meetod vähemalt ühe, käesolevaga käsitletava ravimkoostise manustamist seda vajavale imetajale ja see hõlmab edasiselt ühe või rohkema põletikuvastase aine ja komplementinhibiitori manustamist.

**[0201]** Konkreetseteks häireteks, mille korral osutuvad leiutisekohased meetodid kasulikuks, on neuronaalne trauma, mis võib olla akuutne või krooniline. Akuutseks  
15 neuronaalseks traumaks on näiteks traumaatiline ajukahjustus (TBI).

**[0202]** Lisaks seisneb leiutis vähemalt ühe leiutisekohase koostise (nt 1, 2 või 3) kasutamises ravimi valmistamiseks seisundi ravimiseks, mis eeldab aksonaalse regeneratsiooni toimumist.

**[0203]** Lisaks seisneb leiutis vähemalt ühe leiutisekohase koostise (nt 1, 2 või 3)  
20 kasutamises ravimi valmistamiseks kasutamiseks kroonilise demüeliniseeriva seisundi nagu näiteks hulgiskleroosi ravimiseks.

**[0204]** Alljärgnevalt esitatud illustreerivad näited on esitatud üksnes käesolevat leiutist täpselt mõista võimaldaval eesmärgil. Need näited ei ole mitte mingil moel käsitletavad lõplike leiutisekohaste teostusviisidena, välja arvatud juhul, kui seda pole  
25 selgesõnaliselt teisiti väljendatud.

#### NÄIDE 1: Komplementsüsteesi antisenss inhibiitorid maksas

[0205] Komplement koostisosa C6 on peaausjalikult ekspresseeritud maksas ja sekreteeritud vereringesse just selle elundi poolt. C6 ekspressiooni allareguleerimine maksas vähendab olulisel määral MAC komplekside moodustamise võimet vähendades seeläbi Komplementisüsteemi tõhusust. Mitmed uuringud on

5 kinnitanud, et antisenss oligonukleotiidide süsteemne manustamine on maksas tõhus.

### Antisenss oligonukleotiidid

[0206] Antisenss oligomeerid komplement koostisosa C6 vastu töötati välja

10 suunatuna järjestuste vastu, mis on kõrge homoloogiaga näriliste ja inimese vahel (Vt Tabelid 5A kuni 5F. 3A kuni 3F). Antisenss oligonukleotiidide (15-18mers) modifitseeriti keemiliselt Lukustatud Nukleiinhapetega (LNA). LNA kaitseb oligot nukleaasi eest ja suurendab afiinsust ( $T_m$ ) komplementaarse mRNA järjestuste osas võimaldades lühikese 15-18mer oligonukleotiidide kasutamise suure tõhususega.

15 Oligomeerid, mis on lühemad kui 18 nukleotiidi, on vähem alid sünnipäraste immuunvastuste aktiveerimisele võrreldes pikemate oligomeeridega. Oligonukleotiid töötati välja gapmerina. See tähendab, et kolm äärmist positsiooni oligo otsal 5' ning eelviimased 3 positsiooni oligo otsal 3' sisaldavad LNA fragmente, samas kui keskosa ning 3' äärmist positsiooni moodustuvad DNA analoogidest.

20 Alljärgnevalt on kujutatud tüüpilise gapmeri näidet:

L=LNA, d=DNA

5'-LLLdddddddddLLLd-3' või  
5'- LLLdddddddddLLL -3',

25 milles L= LNA ja d=DNA. Kogu oligo on fosforotioolitud eesmärgiga piirata neerukliirensit ja suurendada ringlusaega *in vivo*. Kõik C jäägid muundati metüül-Cks immuunstimulatsiooni piiramiseks.

[0207] Alljärgnevas Tabelis 1 on esitatud LNA modifitseeritud antisenss oligonukleotiidide struktuur, mis on valmistatud hiire C6 vastu (sihtmärkjärjestus

30

ja oligo järjestus on hiir). (Paksendatud kirjas ja suurte tähtedega tekst=LNA, kirjatähtedega tekst=DNA):

**Tabel 1**

Oligomeer	SEQIDNO:	LNA modifitseeritud oligomeer	SEQIDNO:
Sihtmärgi positsioon 132 GAGCAGACAGAGACAA	404	Oligo5'3' <b>TTG</b> t c t c t g t c t g <b>CTC</b> Partii nr 1008	405
Sihtmärgi positsioon 453 TATCCCAGCAAGTTA	406	Oligo5'3' <b>TAA</b> c t t g c t g g g a <b>ATA</b> Partii nr 1009	407
Sihtmärgi positsioon 566 GTGTGCAGCTGATGGG	408	Oligo5'3' <b>CCC</b> a t c a g c t . g c a <b>CAC</b> Partii nr 1010	409
Sihtmärgi positsioon 726 GGTACAAACTATAGAA	410	Oligo5'3' <b>TTC</b> t a t a g t t t g t <b>ACC</b> Partii nr 1011	411
Sihtmärgi positsioon 1035 GCCTTTAGAATACAAC	412	Oligo5'3' <b>GTT</b> g t a t t c t a a a <b>GGC</b> Partii nr 1012	413

20

[0208] Kõik Tabelis 1 esitatud LNA modifitseeritud oligomeerid on täies mahus fosforotiolitud. Kõik oligomeerid (ODN'd) on sünteesitud fosforamidiit meetodil AKTA Oligopilot toimel (GE Healthcare) 130-185  $\mu$ mole skaaladel kasutades selleks polüstüreen praimer suportit. ODN'd puhastatiioonvahetuse teel (IEX) ja magestati, kasutades selleks Millipore-membraani. ODN-d iseloomustati LC/MS (Agilent) abil. ODNs molaarmassi kontrolliti Matrix-toega laserdesorptsioonionisatsiooni lennuaja massispektromeetria meetodil (MALOI-TOF) Biflex III MALD I toimel (Brucker instruments, Leipzig, Saksamaa).

25

**Tabel 2**

Oligo target		oligo start						
batch		Seq ID	relative	ATG		seq ID		
GAGCAGACAGAGACAA	mouse	404	132	<b>TTG</b> t c t c t g t c t g <b>CTC</b>	405	<b>1008</b>		
GAGCAGACAGACAAATA	human	414		<b>TTG</b> t c t g t g t c t g <b>CTC</b>	415			
TATCCCAGCAAGTTA		408	453	<b>TAA</b> c t t g c t g g g a <b>ATA</b>	409	<b>1009</b>		
CTGCATTGCCAGAAAGTTA		416		<b>TAA</b> c t t t c t g g c a <b>ATG</b>	417			
GTGTGCAGCTGATGGG		412	566	<b>CCC</b> a t c a g c t g c a <b>CAC</b>	413	<b>1010</b>		
GTGTACAGTTGATGGCAA		418		<b>CCC</b> a t c a a c t g t a <b>CAC</b>	419			
GGTACAAACTATAGAA		416	726	<b>TTC</b> t a t a g t t t g t <b>ACC</b>	417	<b>1011</b>		
GGTACAAACTGCAGAAGAT		420		<b>TTC</b> t g c a g t t t g t <b>ACC</b>	421			
GCCTTTAGAATACAAC		420	1035	<b>GTT</b> g t a t t c t a a a <b>GGC</b>	421	<b>1012</b>		
CATCTGCCTCTAGAATACTCTG		422		<b>GTT</b> g t . a t t c t a g a <b>GGC</b>	423			

30

[0209] Tabelist 2 nähtuvad hiire oligomeerid, mis on esitatud Tabelis 1, koos eelistatud, vastavate inimese oligomeeridega ilma LNA monomeerideta (SEQ ID Nr-d: 414,416,418,420 ning 422) ning LNA monomeeridega (SEQ ID Nr-d 415,417,419.421 ning 423). LNA asendustega oligomeeride osas on LNA monomeerid tähistatud paksus kirjas ja suurte tähtedega tekstivormingus, samas kui DNA on tavalises kirjas ja kirjatähtedega tekstivormingus.

#### In vivo oligo tõhususe test

10 [0210] Põhjused, et rakuliinid kultuuris komplementvalkusid ei ekspresseeri (või teevad seda üksnes väga madalatel tasemetel), on oligonukleotiidide tõhusust võimalik testida vahetult *in vivo*. Esimese sõeluuringu eesmärgiks oli identifitseerida algsete mudelite loendis potentsiaalsete, *in vivo* tõhususega oligote kogum. Kaheksa kuni kümne nädala vanuste hiirte NMRI tüve (Charles River, Madalmaad) süstiti 15 (intraperitoneaalselt IP või veeniselt (IV)) üks kord päevas koos 5mg/kg PBS-s lahustatud oligoga. Kontrollrühmaks võeti PBS süsted üksnes esimesest sõeluuringust. Igaks raviks kasutati viite hiirt rühma kohta. Kolme päeva möödumisel ravist hiired hukati neljandal päeval. Välja lõigati maksaproovid ja neid kasutati valgukontsentraadi allareguleerimise taseme kindlaksmääramiseks, Western blotting meetodil valgutasemete ja mRNA kvantitatiivsete qPCR tasemete 20 kindlaksmääramiseks.

[0211] Westem-immunoblotid tehakse pärast akrüülamiid elektroforeesi denatureerimist tavatingimustes, kasutades selleks Mini-Protean süsteemi (Biorad). Komplementvalgud tuvastatakse, kasutades selleks kaubanduslikult saadavaid 25 monokonaalseid ja polükloonseid antikehi. Valkude immunodetekterimine tehakse Lumi-Light tõhustatud kemoluminestsentskomplektiga (Roche) ning LAS-3000 darkbox pildikujutise süsteemiga (FujiFilm, Tokyo, Jaapan). qPCR teostati universaalsondidega (Roche) Lightcycler 480 system (Roche) abil.

[0212] Pärast potentsiaalsete juhtivkandidaatide väljavalmimist töötati kontrolliks välja spetsiifilise mittevastavuse versioonid (vähemalt 3 mittevastavust).

[0213] Oligonukleotiidide pikendatud manustamine (>4 päeva) teostati osmootiliste minipumpade (Aizet, DurectCo., Cupertino, Ca, USA) toimetel. Need pumbad implanteeriti dorsaalselt vastavalt tootja juhistele. Osmootilised minipumbad inkubeeriti PBS-s 20 tunniks temperatuuril 37 kraadi enne implanteerimist pumba käivitamiseks, eesmärgiga saavutada kiirelt ühtlane etteandemäär pärast implanteerimist. Selliste pumpade kasutamine vähendab loomadel stressi, mis tavaliselt tekib pikemaajalistel katsetel, ning igapäevaste süstide tegemiseks see vajalikuks ei osutu. *In vitro* katsed näitasid, et Alzet minipumbad saavutasid ühtlase pumpamismäära enne 24 tunni möödumist. Osmootilised minipumbad täideti PBS-s lahustatud oligonukleotiididega.

#### Mini tax skriinimine

15

[0214] Aspartaadi aminotransferaas (ASAT) jaalaniini aminotransferaasi (ALAT) tasemete mõõtmiseks seerumis võeti vereproovid. ASAT ja ALAT tasemed seerumis määrati kindlaks tuginevalt standardsetele diagnostikaprotseduuridele H747 (Hitachi/Roche) abil koos selleks sobivate komplektidega (Roche Diagnostics). Kõikide hiirte kehakaalu ning kehatemperatuuri jälgiti igapäevaselt, kasutades selleks IPTT-200 transponderkiipe ja DAS 5002 kiibilugejat (Biomedic Data Systems, Seaford, Delaware, USA).

20

#### NÄIDE 2: *In Vivo* Komplement mRNA tasemed pärast 3 päeva möödumist ravist Oligonukleotiididega

25

[0215] LNA oligonukleotiide, mis on esitatud ülalolevas Tabelis 1, kasutati C6 mRNA tasemete piiramiseks NMRI-s nu/nu hiires. Kasutati nelja looma igast ravirühmast kaasaarvatud üks PBS kontrollhiir (kokku 15 hiirt). Hiired said IP süstid iga oligoga päeval 1, 2 ja 3 (5mg/kg looma kohta). Hiired hukati päeval 4 ja maksad

30

eemaldati. RNA valmistati tavapärasel meetoditel. C6 mRNA kvantifitseeriti, kasutades selleks qPCR koos Roche lightcycler 480-ga ja universaalsonde vastavalt tootja juhistele.

**[0216]** Joonisel 1 on kujutatud *in vivo* komplement mRNA tasemed pärast 3  
5 ravipäeva möödumist koos komplement antisenss LNA oligonukleotiididega. Oligo 1008 (SEQ ID NO: 405) osutus toksiliseks, sest kaks looma surid päeval 3 ja üks loom näis haiglane päeval 4.

### NÄIDE 3: CHSO Balb/C Hiirkatse

10

**[0217]** Antisenss oligomeerid komplement koostisosade vastu töötati välja suunatuna järjestuste vastu, mis on kõrge homoloogiaga näriliste ja inimese vahel. Antisenss oligonukleotiide modifitseeriti keemiliselt Lukustatud Nukleinhapetega (LNA). LNA kaitseb oligot nukleaasi eest ja suurendab afiinsust ( $T_m$ ) komplementaarse  
15 mRNA järjestuste osas. Oligonukleotiid töötati välja gapmeritena. See tähendab, et kolm äärmist positsiooni oligo otsal 5' ning eelviimased 3 positsiooni oligo otsal 3' sisaldavad LNA fragmente, samas kui keskosa ning 3' äärmist positsiooni moodustuvad DNA analoogidest. Alljärgnevalt on kujutatud tüüpilise gamperi näidet:

20 **[0218]** Kõik antisenss oligonukleotiidid (ODNs) sünteesiti täis-fosforotioaatderivaatidena automatiseeritud DNA sünteesimise seadmel, kasutades selleks kaubanduslikult saadavalolevaid DNA ja LNA fosforamidiite (Exiqon A/S, Taani). Kõikide ODNs korral kasutati 5-metüül-C. DMT-ON ODNs puhastati pöördfaasilise HPLC-ga (RP-HPLC) (>95% puhtusega). Pärast DMT-rühma eemaldamist  
25 iseloomustati ODNs AE-HPLC-ga ning oodatav molaarmass kinnitati ESI- MS-ga ja Matrix-toega laserdesorptsioonionisatsiooni lennuaja massispektromeetriaga (MALDI-TOF) Biflex III MALDI abil (Brucker instruments, Leipzig, Saksamaa).

[0219] Hiir. Kõik loomi puudutavad katsed olid kooskõlastatud piirkondliku, asjaomase asutusega ja need vastavad täies mahus kõikidele, Madalmaades antud valdkonnas rakenduvatele eeskirjadele. 7 kuni 8 nädala vanusele emasele Balb/C hiirele (Harlan) anti oligonukleotiide, kasutades selleks ALZET 1002 osmootilisi 5 minipumpasid (Durect Corporation, Cupertino, CA, USA), mis implanteeriti subkutaanselt. ODNs ja siRNA lahustati PBS-s. Annused on näidatud joonistel.

[0220] CH50 hemolüütiline analüüs. Komplementi allareguleerimise mõju kindlaksmääramiseks maksas membraaniründe kompleksi (MAC) aktiivsusele vereringes tugineti hemolüütilisele CH50 analüüsile. See analüüs mõõdab MAC 10 hemolüütilist aktiivsust seerumis. Hiirte seerumile lisati sensibiliseeritud erütrotsüüdid ning see muudab võimalikuks MAC aktiivsuse mõõtmise erütrotsüüt lüüsi kogusena spektrofotomeetri toimet. Hiirtelt võeti vereproovid ja need koaguleeriti jääl 1 tunni jooksul. Seejärel seerum isoleeriti, alikvooditi 20µl proovideks ja külmutati koheselt vedelas lämmastikus. Seejärel tehti CH50 analüüs, kasutades selleks küüliku 15 erütrotsüüte, mis on sensibiliseeritud hiire anti-küülik erütrotsüüdi polükloonaalse antiseerumi (Paul Morgan, Cardiff University) toimet. Küüliku erütrotsüüdid olid vähemalt 1 kuu vanused (kuid mitte üle 3 kuu) enne nende kasutamist, mis on vajalik analüüsi tundlikkuse tõstmiseks. Küüliku sensibiliseeritud erütrotsüüdid (SOul) inkubeeriti Veronal puhverdatud soolalahuses (40 µl) 10 µl hiire seerumi osalusel 20 temperatuuril 37 °C. 100% lüüsi väärtuse saamiseks lisati 100 µl vett. 30 kuni 60 minuti möödumisel ülejäänud erütrotsüüdid tsentrifugeeriti ning spektromeetri abil mõõdeti OD405 nm.

[0221] Jooniselt 2 nähtub, et oligo 1009 (SEQ ID NR 409), Oligo 1010 (SEQ ID NR 413), Oligo 1014 (C8a rakendus, SEQ ID NR 327), Oligo 1018 (C8b rakendus, 25 SEQ ID NR 336), Oligo 1019 (C8b rakendus, SEQ ID NR 338) näitasid võimet inhibeerida MAC moodustumist võrdluses kahe kontrolliga. Kõik oligonukleotiidid vahendasid allareguleerimist oma asjaomase sihtmärgi osas maksas vähemalt 70% ulatuses, nii nagu on qPCR-ga mõõdetav. Doseerimine 5 mg/kg/päevas kahe nädala jooksul. Oligo 1614 on skrambleeritud oligonukleotiidi kontroll, millel mõju 30 komplementi tasemetele puudub. MAC aktiivsust mõõdeti CH50 hemolüütilise



analüüsi abil, mida on eelnevalt kirjeldatud. Andmed on esitatud keskmistatuna 5 hiirega rühmas:±SEM

#### NÄIDE 4: siRNA Konstrukt vähendab C6 mRNA-d

5

[0222] Ülalkirjeldatud protseduure järgides valmistati Oligo 1010 (SEQ 10 NR 413). Hiirtele süstisti eespool kirjeldatud moel kogused alates 0,5mg/kg kuni 5mg/kg. qPCR kasutati C6 ekspresseerimise mõõtmiseks järgneval viisil: Loomad ohverdati ja maksaproovid eemaldati hiljem RNA-ga (Ambion) hoiustamiseks. Maksad 10 homogeeniti trisoolis, kasutades selleks Magnalyzerit ja Magnalyzeri helmeid (Roche). RNA isoleeriti, kasutades selleks Trizoli vastavalt tootja juhistele (Invitrogen). Valmistati eDNA, kasutades selleks oligodT praimerit ja SuperSkriptII ensüümi (Invitrogen). qPCR tehti Universal sondi praimerite (Roche) ja Lightcycler 480-ga (Roche). Kõik andmed korrigeeriti Hprt1 abil 15 (hüpoksantiin guaniin fosforibosüül transferaas 1) geeni/laadimise kontrollina. Kõik reaktsioonid teostati kolmes korduskatses ja qPCR tingimused vastasid tootjapoolselt (Roche) soovitatud standardsetele tingimustele. Lisaks tehti LNA modifitseeritud siRNA, mis on homoloogne järjestusega, millele on sihitud antisenss oligo Oligo 1010 (SEQ ID NR 413).

20 [0223] Ühtlasi töötati välja LNA modifitseeritud siRNA, mis on homoloogne järjestusega, millele on sihitud antisenss oligo Oligo 1010 (SEQ ID NR 413). See siRNA kannab LNA modifikatsioone mõlema haru ülendil 3's ja ühte LNA sens (reisija) haru otsal 5'.

[0224] LNA modifitseeritud siRNA sünteesiti automatiseeritud DNA/RNA 25 sünteesimisseadmega RNA sünteesimistsüklil ( 1-5 µmol skaala). Kasutati 02'-TBDMS kaitstud RNA fosforamidiide ja tavalisi reagente ning astmeline sidestatuse saagis oli kõikide monomeeride korral >99%. Modifitseeritud nukleotiidide inkorporeerimiseks lähtuti sidestamisajast 10 min. Pärast standardset kaitse eemaldamist, puhastamist ja järeltöötlust kinnitati saadud siRNA

koostis ja puhtus (>80%), tuginedes selleks MALDI-MS analüüsile ja ioonvahetuse HPLC'le.

[0225] Jooniselt 3 nähtub, et olemas oli lineaarne korrelatsioon Balb/C hiirele manustatud Oligo 1010 koguse ning C6 mRNA korrigeeritud taseme vahel. Ühtlasi  
5 nähtub sellelt jooniselt, et siRNA konstrukt vähendas C6 mRNA võrreldes kontrolliga. Otstarbekohaselt näitas Oligo 1010 annusest sõltuvat mõju C6 mRNA ekspresseerimisel, mdia mõõdeti qPCR-ga Balb/C hiire maksal *in vivo* võrreldes ravi mõjuga, mis saavutati homoloogse LNA modifitseeritud siRNA järjestusega. Andmed on esitatud keskmistatuna 5 hiirega rühmas  $\pm$ SEM.

10

#### NÄIDE 5: Närvi pitsumise analüüs

[0226] Närvi pitsumise analüüs mõõdab komplement inhibeerimise mõju perifeersete närvide taastumisele pärast pitsumise kaasa toonud traumat. Üldiselt  
15 on analüüsi kirjeldanud Ramaglia, V. *et al* (2007) 18 juuli: 27(29) 7663 koos selles esitatud viidetega. Kokkuvõtvalt raviti loomi 14 päeva jooksul antisens oligonukleotiidide või PBS-ga kontrolliga, misjärel tehti hiirtele närvioperatsioon. Kõik kirurgilised protseduurid teostati aseptilistes tingimustes sügava isofluraanesteesia all (1,5 v/l isofluraani ja 1,0 v/l O<sub>2</sub>). Vasak istmikunärv  
20 paljastati sisselõike teel reie ülaossa. Närvi pitsitati siletangidega 3 x 10 s intervallidega istmiku soone tasandil. Paremat käppa kasutati kontrollina: teostati fiktiivne operatsioon, millega paljastati istmikunärv, ilma seda ärritamata. Seejärel suleti lihas ning nahk õmblustega. Operatsioonijärgsete taastumisperiodide vältel olid hiired analgeesia all. Hiiri raviti ühe annuse (0,05 mg/kg) Buprenorfiiniga  
25 (Temgesic®, Schering-Plough, Madalmaad) vahetult enne vigastust ja teine valuvaigisti annus anti 1 päev pärast vigastust. Sensorset funktsiooni mõõdeti jalatõmbluse katse meetodil. See katse seisneb erineva tugevusega elektrilöövide (0,1 kuni 0,5 mA) andmises talla alla kahe stimulatsioonielektroodi toimel. Vastust hinnati positiivseks, kui loom painutas käppa. Kokkutõmbes seisneva vastuse toimumiseks

vajaliku vähima voolu (mA) määr registreeriti. Väärtused kajastati normaalfunktsiooni (parem kontrolljalg) protsendimäärana. Selle katse tulemusena selgus, et vähemalt üks leiutiisekohane oligomeer näitas jalatõmbluse katsel olulise aktiivsuse olemasolu. Otstarbekohaselt näitasid sobivas kandjas oligomeeri saanud  
5 hiired 50% taastumist jalatõmbluse katsel umbes 7ndal päeval. Loomad, kes ravi ei saanud, näitasid sama taastumist umbest 11ndal päeval.

**[0227]** Kõik käesolevas nimetatud viited (sealhulgas kõik patendid ja teadusalased dokumendid) on käesolevale viitena lisatud. Leiutise detailne kirjeldus vastab käesoleva leiutise kohasele eelisteostusele. Samas on arusaadav, et asjatundjal on  
10 pärast käesoleva dokumendiga tutvumist võimalik teha erinevaid muudatusi ja täiendusi teostuses, mis kõik on käesoleva leiutisega hõlmatud.

**Tabel 3:** Nukleiinhappe järjestus, mis kodeerib inimese komplement koostisosa 6 (C6) mRNA (SEQ ID NO:1). ATG lähtesait tähistatud. (Genbank  
15 Ref.NM\_000065.2)

SEQ ID No: 1

20

25

30

AACATTTATTTTGACAACCCCTCTAGGTGTTGCTAGGCTTCTGGGATATGACAGCATTGCCTTGTGTTAGC  
TAGCAATAAGAAAAGAAGCTTTGTTTGGATTAACATATATACCCTCTTCATTCTGCATACCTATTTTTTC  
CCCAATAATTTGCAGCTTAGGTCCGAGGACACCACAAACTCTGCTTAAAGGGCCTGGAGGCTCTCAAGGC  
ATGGCCAGACGCTCTGTCTTGTACTTTCATCTGCTGAATGCTCTGATCAACAAGGGCCAAGCCTGCTTCT  
GTGATCACTATGCATGGACTCAGTGGACCAGCTGCTCAAAAACCTTGCAATTCTGGAACCCAGAGCAGACA  
CAGACAAATAGTAGTAGATAAGTACTACCAGGAAAACCTTTTGTGAACAGATTTGCAGCAAGCAGGAGACT  
AGAGAATGTAACCTGGCAAAGATGCCCCATCAACTGCCTCCTGGGAGATTTTGGACCATGGTCAGACTGTG  
ACCCITGTATTGAAAAACAGTCTAAAGTTAGATCTGTCTTGGCITCCAGTCAGTTTGGGGGACAGCCATG  
CACTGCGCCTCTGGTAGCCTTTCAACCATGCATTCCATCTAAGCTCTGCAAAAATTGAAGAGGCTGACTGC  
AAGAAATAAATTCGCTGTGACAGTGGCCGCTGCATTGCCAGAAAGTTAGAATGCAATGGAGAAAATGACT  
GTGGAGACAATTCAGATGAAAGGGACTGTGGGAGGACAAAGGCAGTATGCACACGGAAGTATAATCCCAT  
CCCTAGTGTACAGTTGATGGGCAATGGGTTTTCATTTTTCTGGCAGGAGAGCCAGAGGAGAAGTCCTTGAT  
AACTCTTTCACITGGAGGAATATGTAAAACCTGTCAAAAAGCAGTAGGACAAGTAATCCATACCCTGTTCCGG  
CCAATCTGGAAAATGTCCGCTTTGAGGTACAAACTGCAGAAGATGACTTGAAAACAGATTTCTACAAGGA  
TTTAACTTCTCTGGACACAATGAAAATCAACAAGGCTCATTCTCAAGTCAGGGGGGAGCTCTTTCAGT  
GTACCAATTTTTTATTCCTCAAAGAGAAAGTGA AAAATATCAACCATAATTCTGCCTTCAAACAAGCCATT  
AAGCCTCTCACAAAAGGATTCTAGTTTTATTAGGATCCATAAAGTGATGAAAGTCTTAAACTTCACAAC  
GAAAGCTAAAGATCTGCACCTTCTGTATGCTTTTTGAAAGCACCTAACCATCTGCCTCTAGAATACAAC  
TCTGCTTTGTACAGCCGAATATTCGATGACTTTGGGACTCATTACTTCACTCTGGCTCCCTGGGAGGG  
TGTAIGACCTTCTCTATCAGTTTAGCAGTGAGGAACTAAAGAACTCAGGTTTAAACCGAGGAAGAAGCCAA  
ACACITGTCAGGATTGAAACAAAGAAACGCGTTTTATTGCTAAGAAAACAAAAGTGGAAACATAGGTGC  
ACCACCAACAAGCTGTGAGAGAAACATGAAGGTTTCAATTTATACAGGGAGCAGAGAAATCCATATCCCTGA  
TTCGAGGTGGAAGGAGTGAATATGGAGCAGCTTTGGCATGGGAGAAAGGGAGCTCTGGTCTGGAGGAGAA  
GACATTTCTGAGTGGTTAGAATCAGTGAAGGAAAATCCTGCTGTGATTGACTTTGAGCTTGGCCCCATC  
GTGGACTTGGTAAGAAACATCCCCTGTGACAGTGACAAAACGGAACAACCTCAGGAAAGCTTTGCAAGAGT  
ATGCAGCCAAGTTCGATCCTTGCCAGTGTGCTCCATGCCCTAATAATGGCCGACCCACCCTCTCAGGGAC  
TGAATGTCGTGTGTGTGTGTCAGAGTGGCACCTATGGTGAGAACTGTGAGAAACAGTCTCCAGATTATAAA  
TCCAATGCAGTAGACGGACAGTGGGGTTGTTGGTCTTCTGGAGTACCTGTGATGCTACTTATAAGAGAT  
CGAGAACCCGAGAAATGCAATAATCCTGCCCCCAACGAGGAGGGAAACGCTGTGAGGGGGGAGAAGCGACA  
AGAGGAAGACTGCACATTTCAATCATGGAAAACAATGGACAACCATGTATCAATGATGATGAAGAAATG  
AAAGAGTTCGATCTTCTGAGATAGAAGCAGATTCCGGGTGTCCTCAGCCAGTTTCTCCAGAAAATGGAT  
TTATCCGGAAATGAAAAGCAACTATACTTGGTGGGAGAGATGTTGAAATTTTCATGCCTTACTGGCTTTGA  
AACTGTTGGATACCAGTACTTCAGATGCTTACCAGACGGGACCTGGAGACAAGGGGATGTGGAATGCCAA  
CGGACGGAGTGCATCAAGCCAGTTGTGCAGGAAGTCTGACAATTACACCATTTTCAGAGATTGTATAGAA  
TTGGTGAATCCATTGAGCTAACTTGCCCCAAAGGCTTTGTTGTTGCTGGGCCATCAAGGTACACATGCCA  
GGGAATTCCTGGACACCACCAATTTCAAACCTCTCACCTGTGAAAAGATACTCTAACAAAATTA AAA

GGCCATTGTCAGCTGGGACAGAAACAATCAGGATCTGAATGCATTTGTATGTCTCCAGAAGAAGACTGTA  
 GCCATCAITTCAGAAGATCTCTGTGTGTTTGACACAGACTCCAACGATTACTTTACTTCACCCGCTTGTA  
 GTTTTGGCTGAGAAATGTTTAAATAATCAGCAACTCCATTTTCTACATATTGGTTCCTGCCAAGACGGC  
 CGCCAGTTAGAATGGGGTCTTGAAAGGACAAGACTTTCATCCAACAGCACAAAGAAAGAATCCTGTGGCT  
 ATGACACCTGCTATGACTGGGAAAAATGTTTACGCTCCACTTCCAATGTGTCTGCCTATTGCCCCACA  
 GTGCTTCAAGGGTGGAAACCAACTCTACTGTGTCAAAATGGGATCATCAACAAGTGAGAAAACATTGAAC  
 ATCTGTGAAGTGGGAACATAAGATGTGCAAACAGGAAGATGGAAATACTGCATCCTGGAAAGTGTGG  
 CCTAGCACAATTACTGCTAGGCCAGCACAATGAACAGATTTACCATCCCGAAGAACCAACTCCTACAAA  
 TGAGAATICTTGCACAAACAGCAGACTGGCATGCTCAAAGTTACTGACAAAAATTATTTCTGTTAGTTT  
 GAGATCATTATTCTCCCCTGACTCTCCTGTTTGGGCATGTCTTATTCAGTTCAGCTCATGACGCCCTGT  
 AGCATACCCCTAGGTACCAACTTCCACAGCAGTCTCGTAAATCTCCTGTTTACATTGTACAAAAATAAT  
 GTGACTTCTGAGGCCCTTATGTAGCCTGTGACATTAAGCATTCTCGCAATTAGAAATAAGAATAAAACCC  
 ATAATTTCTTCAATGAGTTAATAAACAGAAATCTCCAGAACCTCTGAAACACATTCTTGAAGCCCAGCT  
 TTCATATCTTCAATCAACAAATAATTTCTGAGTGTGTATACAGGATGTCAAGTACTGACCAAAGTCTGA  
 GAACTCGGCAGATAATAAAACAGACAAAAGCCTTTCGCTTCATGAAGCATACATTCATTACGGGGTAGAC  
 ACACAAAAAATGAAATAAACAGGTAAAATATGTAGC

**Tabel 4A:** Väljavalitud C6 nukleotiidid, SEQ ID nr: 2-67

5 1030 CATCTGCCTCTAGAATACAACCTCTG SEQ. ID nr: 2

DNA järjestus	SEQ ID nr	RNA järjestus	SEQ ID nr	Pöördkomplement	SEQ ID nr
ATCTGCCTCTAGAATACAA	3	AUCUGCCUCUAGAAUACAA	10	UUGUAUUCUAGAGGCAGAU	17
CATCTGCCTCTAGAATACA	4	CAUCUGCCUCUAGAAUACA	11	UGUAUUCUAGAGGCAGAU	18
CTGCCTCTAGAATACAAC	5	CUGCCUCUAGAAUACAACU	12	AGUUGUAUUCUAGAGGCAG	19
GCCTCTAGAATACAACCT	6	GCCUCUAGAAUACAACUCU	13	AGAGUUGUAUUCUAGAGGC	20
TCTGCCTCTAGAATACAAC	7	UCUGCCUCUAGAAUACAAC	14	GUUGUAUUCUAGAGGCAGA	21
TGCCTCTAGAATACAACCT	8	UGCCUCUAGAAUACAACUC	15	GAGUUGUAUUCUAGAGGCA	22
CCTCTAGAATACAACCTCTG	9	CCUCUAGAAUACAACUCUG	16	CAGAGUUGUAUUCUAGAGG	23

1112 TGGGAGGCGTGTATGACCTTCTCTA SEQ. ID nr: 24

DNA järjestus	SEQ ID nr	RNA järjestus	SEQ ID nr	Pöördkomplement	SEQ ID nr
GCGTGTATGACCTTCTCTA	25	GCGUGUAUGACCUUCUCUA	32	UAGAGAAGGUCAUACACGC	39
GAGGCGTGTATGACCTTCT	26	GAGGCGUGUAUGACCUUCU	33	AGAAGGUCAUACACGCCUC	40
AGGCGTGTATGACCTTCTC	27	AGGCGUGUAUGACCUUCUC	34	AGAAGGUCAUACACGCCU	41
GGCGTGTATGACCTTCTCT	28	GGCGUGUAUGACCUUCUCU	35	AGAGAAGGUCAUACACGCC	42
TGGGAGGCGTGTATGACCT	29	UGGGAGGCGUGUAUGACCU	36	AGGUCUACACGCCUCCCA	43
GGGAGGCGTGTATGACCTT	30	GGGAGGCGUGUAUGACCUU	37	AAGGUCAUACACGCCUCCC	44
GGAGGCGTGTATGACCTTC	31	GGAGGCGUGUAUGACCUUC	38	GAAGGUCAUACACGCCUCC	45

1115 GAGGCGTGTATGACCTTCTCTATCA SEQ. ID nr: 46

DNA järjestus	SEQ ID nr	RNA järjestus	SEQ ID nr	Pöördkomplement	SEQ ID nr
TGTATGACCTTCTCTATCA	47	UGUAUGACCUUCUCUAUCA	54	UGUAUGAGAAGGUCAUACA	61
GCGTGTATGACCTTCTCTA	48	GCGUGUAUGACCUUCUCUA	55	UAGAGAAGGUCAUACACGC	62
CGTGTATGACCTTCTCTAT	49	CGUGUAUGACCUUCUCUAU	56	AUAGAGAAGGUCAUACACG	63
GAGGCGTGTATGACCTTCT	50	GAGGCGUGUAUGACCUUCU	57	AGAAGGUCAUACACGCCUC	64
AGGCGTGTATGACCTTCTC	51	AGGCGUGUAUGACCUUCUC	58	GAGAAGGUCAUACACGCCU	65
GGGCGTGTATGACCTTCTCT	52	GGCGUGUAUGACCUUCUCU	59	AGAGAAGGUCAUACACGCC	66
GTGTATGACCTTCTCTATC	53	GUGUAUGACCUUCUCUAUC	60	GAUAGAGAAGGUCAUACAC	67

**Tabel 4B:** Väljavalitused C6 nukleotiidid, SEQ ID nr: 68-133

1186 GCCAAACTGTGTCAGGATTGAAA (SEQ. ID nr: 68)

DNA järjestus	SEQ ID nr	RNA järjestus	SEQ ID nr	Pöördkomplement	SEQ ID nr
CAAACACTGTGTCAGGATT	69	CAAACACUGUGUCAGGAUU	76	AAUCCUGACACAGUGUUUG	83
AACACTGTGTCAGGATTGA	70	AACACUGUGUCAGGAUUGA	77	UCAAUCCUGACACAGUGUU	84
ACACTGTGTCAGGATTGAA	71	ACACUGUGUCAGGAUUGAA	78	UUCAAUCCUGACACAGUGU	85
CACTGTGTCAGGATTGAAA	72	CACUGUGUCAGGAUUGAAA	79	UUCAAUCCUGACACAGUGU	86
CCAAACACTGTGTCAGGAT	73	CCAAACACUGUGUCAGGAU	80	AUCCUGACACAGUGUUUGG	87
GCCAAACTGTGTCAGGA	74	GCCAAACACUGUGUCAGGA	81	UCCUGACACAGUGUUUGGC	88
AAACTGTGTCAGGATTG	75	AAACACUGUGUCAGGAU.UG	82	CAAUCCUGACACAGUGUUU	89

5

1259 GCACCACCAACAAGCTGTCAGAGAA (SEQ. ID nr: 90)

DNA järjestus	SEQ ID nr	RNA järjestus	SEQ ID nr	Pöördkomplement	SEQ ID nr
CCAACAAGCTGTCAGAGAA	91	CCAACAAGCUGUCAGAGAA	98	UUCUCUGACAGCUUGUUGG	105
CCACCAACAAGCTGTCAGA	92	CCACCAACAAGCUGUCAGA	99	UCUGACAGCUUGUUGGUG	106
ACCAACAAGCTGTCAGAGA	93	ACCAACAAGCUGUCAGAGA	100	UCUCUGACAGCUUGUUGGU	107
CACCACCAACAAGCTGTCA	94	CACCACCAACAAGCUGUCA	101	UGACAGCUUGUUGGUGGUG	108
ACCACCAACAAGCTGTCAG	95	ACCACCAACAAGCUGUCAG	102	CUGACAGCUUGUUGGUGGU	109
GCACCACCAACAAGCTGTC	96	GCACCACCAACAAGCUGUC	103	GACAGCUUGUUGGUGGUGC	110
CACCAACAAGCTGTCAGAG	97	CACCAACAAGCUGUCAGAG	104	CUCUGACAGCUUGUUGGUG	111

10 2325 GGGACAGAAACAATCAGGATCTGAA (SEQ. ID nr: 112)

DNA järjestus	SEQ ID nr	RNA järjestus	SEQ ID nr	Pöördkomplement	SEQ ID nr
GAACAATAGGATCTGAA	113	GAACAUAUCAGGAUCUGAA	120	UUCAGAUCCUGAUUGUUUC	127
GGACAGAAACAATCAGGAT	114	GGACAGAAACAUCAGGAU	121	AUCCUGAUUGUUUCUGUCC	128
ACAGAAACAATCAGGATCT	115	ACAGAAACAUCAGGAL1CU	122	AGAUCUGAUUGUUUCUGU	129
AGAAACAATCAGGATCTGA	116	AGAAACAUCAGGAUCUGA	123	UCAGAUCCUGAUUGUUUCU	130
GGGACAGAAACAATCAGGA	117	GGGACAGAAACAUCAGGA	124	UCCUGAUUGUUUCUGUCC	131
CAGAAACAATCAGGATCTG	118	CAGAAACAUCAGGAUCUG	125	CAGAUCCUGAUUGUUUCUG	132
GACAGAAACAATCAGGATC	119	GACAGAAACAUCAGGAUC	126	GAUCCUGAUUGUUUCUGUC	133

**Tabel 4C:** Väljavalitused C6 nukleotiidid, SEQ ID nr: 134-199

15 2331 GAAACAATCAGGATCTGAATGCATT (SEQ. ID nr: 134)

DNA järjestus	SEQ ID nr	RNA järjestus	SEQ ID nr	Pöördkomplement	SEQ ID nr
GAAACAATCAGGATCTGAA	135	GAAACAUAUCAGGAUCUGAA	142	UUCAGAUCCUGAUUGUUUC	149
AAACAATCAGGATCTGAAT	136	AAACAUCAGGAUCUGAAU	143	AUUCAGAUCCUGAUUGUUU	150
CAATCAGGATCTGAATGCA	137	CAAUCAGGAUCUGAAUGCA	144	UGCAUUCAGAUCCUGAUUG	151
ATCAGGATCTGAATGCATT	138	AUCAGGAUCUGAAUGCAU	145	AAUGCAUUCAGAUCCUGAU	152
ACAATCAGGATCTGAATGC	139	ACAUCAGGAUCUGAAUGC	146	GCAUUCAGAUCCUGAUUGU	153
AATCAGGATCTGAATGCAT	140	AAUCAGGAUCUGAAUGCAU	147	AUGCAUUCAGAUCCUGAUU	154
AACAATCAGGATCTGAATG	141	AACAUCAGGAUCUGAAUG	148	CAUUCAGAUCCUGAUUGUU	155

2335 CAATCAGGATCTGAATGCATTTGTA (SEQ. ID nr: 156)

DNA järjestus	SEQ ID nr	RNA järjestus	SEQ ID nr	Pöördkomplement	SEQ ID nr
GGATCTGAATGCATTTGTA	157	GGAUCUGAAUGCAUUUGUA	164	UACAAUGCAUUCAGAUCC	171
CAATCAGGATCTGAATGCA	158	CAAUCAGGAUCUGAAUGCA	165	UGCAUUCAGAUCCUGAUUG	172
TCAGGATCTGAATGCATTT	159	UCAGGAUCUGAAUGCAUUU	166	AAAUGCAUUCAGAUCCUGA	173
ATCAGGATCTGAATGCATT	160	AUCAGGAUCUGAAUGCAU	167	AAUGCAUUCAGAUCCUGAU	174
AGGATCTGAATGCATTTGT	161	AGGAUCUGAAUGCAUUUGU	168	ACAAUGCAUUCAGAUCCU	175
AATCAGGATCTGAATGCAT	162	AAUCAGGAUCUGAAUGCAU	169	AUGCAUUCAGAUCCUGAUU	176
CAGGATCTGAATGCATTTG	163	CAGGAUCUGAAUGCAUUUG	170	CAAUGCAUUCAGAUCCUG	177

2663 GCTTCAAGGGTGGAAACCAACTCTA (SEQ. ID nr: 178)

DNA järjestus	SEQ ID nr	RNA järjestus	SEQ ID nr	Pöördkomplement	SEQ ID nr
CTTCAAGGGTGGAAACCAA	179	CUUCAAGGGUGGAAACCAA	186	UUGGUUCCACCCUUGAAG	193
TCAAGGGTGGAAACCAACT	180	UCAAGGGUGGAAACCAACU	187	AGUUGGUUCCACCCUUGA	194
AGGGTGGAAACCAACTCTA	181	AGGUGGAAACCAACUCUA	188	UAGAGUUGGUUCCACCCU	195
GCTTCAAGGGTGGAAACCA	182	GCUUCAAGGGUGGAAACCA	189	UGGUUCCACCCUUGAAGC	196
CAAGGGTGGAAACCAACTC	183	CAAGGGUGGAAACCAACUC	190	GAGUUGGUUCCACCCUUG	197
AAGGGTGGAAACCAACTCT	184	AAGGGUGGAAACCAACUCU	191	AGAGUUGGUUCCACCCU	198
TTCAAGGGTGGAAACCAAC	185	UUCAAG.GGUGGAAACCAAC	192	GUUGGUUCCACCCUUGAA	199

5 **Tabel 4C:** Väljavalitud C6 nukleotiidid, SEQ ID nr: 134-199

2331 GAAACAATCAGGATCTGAATGCATT (SEQ. ID nr: 134)

DNA järjestus	SEQ ID nr	RNA järjestus	SEQ ID nr	Pöördkomplement	SEQ ID nr
GAACATCTGTGAAGTGGGA	201	GAACAUCUGUGAAGUGGGA	208	UCCCACUUCACAGAUGUUC	215
CTGTGAAGTGGGAACATA.	202	CUGUGAAGUGGGAACUUA	209	UAUAGUCCACUUCACAG	216
ATCTGTGAAGTGGGAACATA	203	AUCUGUGAAGUGGGAACUA	210	UAGUCCACUUCACAGAU	217
TCTGTGAAGTGGGAACAT	204	UCUGUGAAGUGGGAACUUA	211	AUAGUCCACUUCACAGA	218
AACATCTGTGAAGTGGGAA	205	AACAUCUGUGAAGUGGGA	212	UCCCACUUCACAGAUGU	219
ACATCTGTGAAGTGGGAAC	206	ACAUCUGUGAAGUGGGAAC	213	GUUCCACUUCACAGAUGU	220
CATCTGTGAAGTGGGAAC	207	CAUCUGUGAAGUGGGAACU	214	AGUCCACUUCACAGAUG	221

10 **Tabel 4E:** Väljavalitud C6 nukleotiidid, SEQ ID nr: 225-251

			SEQ ID nr
	2758	GCAAACAGGAAGATGGAAA	222
		GCAAACAGGAAGAUGGAAA	223
		UUUCAUCUCCUGUUUGC	224
15	132	GAGCAGACACAGACAAATA	225
		GAGCAGACACAGACAAUA	226
		UAUUUGUCUGUCUGCUG	227
	726	GGTACAAACTGCAGAAGAT	228
		GGUACAAACUGCAGAAGAU	229
20		AUCUUCUGCAGUUUGUACC	230
	1266	CAACAAGCTGTGAGAGAAA	231
		CAACAAGCUGUCAGAGAAA	232
		UUUCUCUGTCTGCUUGUUG	233
	1992	TGGAGAAGATGTTGAAATT	234
25		UGGAGAAGAUGUUGAAAUU	235
		AAUUUCTTCATCUUCUCCA	236
	450	CTGCATTGCCAGAAAAGTTA	237
		CUGCAUUGCCAGAAAGUUA	238
		UAACUUUCUGGCAAUGCAG	239
30	157	GATAAGTACTACCAGGAAA	240
		GAUAAGUACUACCAGGAAA	241
		UUUCCUGGUTGUACUUAUC	242
	1809	GGAGAAGCGACAAGAGGAA	243
		GGAGAAGCGACAAGAGGAA	244

		UUCCUCUUGUCGCUUCUCC	Pöördkomplement	245
566		GTGTACAGTTGATGGGCAA	Sihtmärk	246
		GUGUACAGUUGAUGGGCAA	RNA	247
		UUGCCCAUCAACUGUACAC	Pöördkomplement	248
5	1644	TGGTGAGAACTGTGAGAAA	Sihtmärk	249
		UGGUGAGAACUGUGAGAAA	RNA	250
		UUUCUCACAGUUCUCACCA	Pöördkomplement	251

- 10 **Tabel 5A-F:** Inimese (human) (DEQ ID NO:1), roti (rat) (SEQ ID NO: 402) ja hiire (mouse) (SEQ ID NO: 403) komplementkomponendi 6 (C6) järjestused. Samuti on näidatud (varjutatud kastid) inimeselt, rotilt ja hiirelt pärinevad väljavalitud oligomeeri järjestused (SEQ ID NO: 252-401).

15

20

25

30



Väljalitid C6 rist-liikide oligomeerid

SEQ ID NO: 252-401

```

human_c6      TTGCCTTGTGTTAGCTAGCAATAAGAAAAGAAGCTTTGTTGGATTAACATATATACCCCT
hu_c6_mrna    TTGCCTTGTGTTAGCTAGCAATAAGAAAAGAAGCTTTGTTGGATTAACATATATACCCCT
rat_C6        -----
mouse_c6      -----TAGTATGAAGGACGCTTTGGATGCTCACACAAACCCC

```

```

human_c6      C-TTCATTCTGCATACCTATTTTTCCCAATAATTTGCAGCTTAGGTCCGAGGACACCA
hu_c6_mrna    C-TTCATTCTGCATACCTATTTTTCCCAATAATTTGCAGCTTAGGTCCGAGGACACCA
rat_C6        -----
mouse_c6      TGCTTAGCGTGCCTGCTTTGGTTTCTACATCCATT--CAGGTT--CCTGAGCACAACT

```

SEQ ID N

```

human_c6      CAAACTCTGCTTAAAGGGCCTGGAGGCTCTC-AGGCGATGCGGACGCTCTGTCTTGTA
hu_c6_mrna    CAAACTCTGCTTAAAGGGCCTGGAGGCTCTC-AGGCGATGCGGACGCTCTGTCTTGTA
rat_C6        -----
mouse_c6      AAGGTCGATTTGAAAGGGCTCTGGAGATTGTGGA-----ATCTCACCTTGTG

```

252-253

```

human_c6      CTTCATCCTGCTGAATGCTCTGATCAACAAGGGCCAGGCGTCTGCTGCTGCTGCTGTC
hu_c6_mrna    CTTCATCCTGCTGAATGCTCTGATCAACAAGGGCCAGGCGTCTGCTGCTGCTGCTGTC
rat_C6        -----
mouse_c6      TTTCATTTTGTCTGATCATACTGATTGACAAGAGTG-----CC

```

254-255

```

human_c6      TGGGCTGCTGCTGAGGCGCTGCTCAAAAACCTGGGATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGTCAG
hu_c6_mrna    TGGGCTGCTGCTGAGGCGCTGCTCAAAAACCTGGGATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGTCAG
rat_C6        -----
mouse_c6      TTCTAAGTCC-----GAG

```

256-257  
258

```

human_c6      ACAATAGTAGTAGATAAGTACTACCAGGAAAACTTTGTGAACAGATTTGCAGCAAGCA
hu_c6_mrna    ACAATAGTAGTAGATAAGTACTACCAGGAAAACTTTGTGAACAGATTTGCAGCAAGCA
rat_C6        -----
mouse_c6      ACAAGTAGTAGTGAACGATTACTATTGAAAAACTTATGCGATAAGCTTTGTATCAAGCA

```

```

human_c6      GGAGACTAGAGAAATGTAAGTGGCAAGCTGGGCGATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGTCAG
hu_c6_mrna    GGAGACTAGAGAAATGTAAGTGGCAAGCTGGGCGATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGTCAG
rat_C6        -----
mouse_c6      GGAGACCAGACAGTGAACGTTGGAGAC-----GAG

```

259-260

```

human_c6      ACCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCG
hu_c6_mrna    ACCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCG
rat_C6        -----
mouse_c6      GATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCG

```

261  
262-264

```

human_c6      TCCCGTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
hu_c6_mrna    TCCCGTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
rat_C6        -----
mouse_c6      CCCA-----GAG-----GTGT

```

265-267  
268

```

human_c6      TCCATCTAGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
hu_c6_mrna    TCCATCTAGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
rat_C6        -----
mouse_c6      CCCCTCA-----GTTCTCTGTGACAG

```

269-271

Tabel 5B

human_c6	TGGC	[REDACTED]	272-273
hu_c6_mrna	TGGC	[REDACTED]	
rat_C6	TGGG	[REDACTED]	
mouse_c6	TGGG	[REDACTED]	274-275
*** **			
human_c6	AGAT	[REDACTED]	276-277
hu_c6_mrna	AGAT	[REDACTED]	
rat_C6	AGAC	[REDACTED]	278-280
mouse_c6	AGAT	[REDACTED]	
*** **			
246			
human_c6	T	[REDACTED]	290-291
hu_c6_mrna	T	[REDACTED]	
rat_C6	C	[REDACTED]	
mouse_c6	T	[REDACTED]	292
*****			
humah_c6	CCT	[REDACTED]	293-295
hu_c6_mrna	CCT	[REDACTED]	
rat_C6	CCG	[REDACTED]	
mouse_c6	TCT	[REDACTED]	
* **			
human_c6	[REDACTED]	GG	296-298
hu_c6_mrna	[REDACTED]	GC	
rat_C6	[REDACTED]	AA	299-301
mouse_c6	[REDACTED]	AA	
*****			
human_c6	[REDACTED]	GATTTAACTTCTCTTGGACACAATGAAATCAACA	302-303
hu_c6_mrna	[REDACTED]	GATTTAACTTCTCTTGGACACAATGAAATCAACA	
rat_C6	[REDACTED]	GATTTAGCCACTATTGAAAAAATAAAAATGAAGA	
mouse_c6	[REDACTED]	AATTTAATCTCTTTGAAAAAATAAAAATGAAGA	
*****			
human_c6	AGGCTCATTCTCAAGTCAGGGGGGAGCTCTTTCAGTG	[REDACTED]	304-306
hu_c6_mrna	AGGCTCATTCTCAAGTCAGGGGGGAGCTCTTTCAGTG	[REDACTED]	
rat_C6	CCGTTCAATGTCTGGTGAAGAAAGACTCTTCTACG	[REDACTED]	
mouse_c6	CAGTCTTTCAGTGGATGAAAGGACAAAATTTCCCTA	[REDACTED]	
* * * * *			
human_c6	GAGAAGTGAAAATATCAACCATAATTCTGCCTTCAAACAAGC	[REDACTED]	307-309
hu_c6_mrna	GAGAAGTGAAAATATCAACCATAATTCTGCCTTCAAACAAGC	[REDACTED]	
rat_C6	GAAAAGTGAAAATTTCCAACGTAACCTCAGGCTTCAAAAACGC	[REDACTED]	
mouse_c6	GAAAATGAACATTCCATTATAGCTCTGCCTTCAAACAAGT	[REDACTED]	
** * * * * *			
human_c6	AAAGGATTCTAGTTTATT	[REDACTED]	310-312
hu_c6_mrna	AAAGGATTCTAGTTTATT	[REDACTED]	
rat_C6	GAAGGATTCGAGCTTTGTT	[REDACTED]	
mouse_c6	GAAGGATTCTAGCTTTATC	[REDACTED]	
*****			
human_c6	AGCTAAAGATCTGCACCTTTCTGATGCTTTTTGAAAGCACTTAACCAT	[REDACTED]	313-314
hu_c6_mrna	AGCTAAAGATCTGCACCTTTCTGATGCTTTTTGAAAGCACTTAACCAT	[REDACTED]	
rat_C6	AACGACAGACCTGCAGCTCTCAGACGCTTCTTAAAGCCCTCATCCAC	[REDACTED]	
mouse_c6	AGCAACAGACCTACAGCTTTCAGATGCTTCTGAAAGCCCTTGTCCAC	[REDACTED]	
* * * * *			
human_c6	[REDACTED]	TCATTAATTCACCTC	315-317
hu_c6_mrna	[REDACTED]	TCATTAATTCACCTC	
rat_C6	[REDACTED]	CCACTATTTACCTC	318-320

Tabel 5C

mouse_c6	CCACTACTTCACCTC	
human_c6	CTCTATCAGTTTAGCAGT	321-322
hu_c6_mrna	CTCTATCAGTTTAGCAGT	
rat_C6	CTCTACCAATTCAGCCG	
mouse_c6.	ATCTACCAATTCAGCCG	
human_c6	GCCAAAC	323-324
hu_c6_mrna	GCCAAAC	
rat_C6	ACTCGAA	325-327
mouse_c6	GCTCAAA	
human_c6	TTTATTTGCTAAGAAA	
hu_c6_mrna	TTTATTTGCTAAGAAA	
rat_C6	CTTATTTTACGAAA	
mouse_c6	GTTTCTTTATATGGAA	
human_c6	ACATGATTCGAGGTGGAAG	328-330
hu_c6_mrna	ACATGATTCGAGGTGGAAG	
rat_C6	GTACAAATCCAGGGG	331-333
mouse_c6	ATATGATTCAGGGG	
human_c6	GAGTGAATATGGAGGGAG	337-338
hu_c6_mrna	GAGTGAATATGGAGGGAG	
rat_C6	GAGTCAGCAGGCAGGGCAG	339-341
mouse_c6	GAGTCAGCAGGCAGGGCAG	
human_c6	CTTTGAGCTTGC	342-344
hu_c6_mrna	CTTTGAGCTTGC	
rat_C6	CTTTGAGCTTGC	345-347
mouse_c6	CTTTGAGCTTGC	
human_c6	CCCCATCGTC	348-349
hu_c6_mrna	CCCCATCGTC	
rat_C6	TCCGATCATC	350
mouse_c6	CCCAATTACA	
human_c6	GAAAGCTTTGCGAT	351-352
hu_c6_mrna	GAAAGCTTTGCGAT	
rat_C6	GAAAGCCCTTTGAC	353-354
mouse_c6	GAGAGCGCTTTGAC	
human_c6	CC	355-356
hu_c6_mrna	CC	
rat_C6	GG	357-358
mouse_c6	GG	359-361
human_c6	GAAACAGTCTCCAGA	
hu_c6_mrna	GAAACAGTCTCCAGA	362
rat_C6	AAAACGGTCCCAGA	363-365
mouse_c6	GCGCAGGTCCCAGG	

Tabel 5D

human_c6	TACCTGT	ATCGAGAACCCGAGA	366-367
hu_c6_mrna	TACCTGT	ATCGAGAACCCGAGA	
rat_C6	CGCATGC	GTCAAGGAGCCGGGA	368-369
mouse_c6	TGCGTGC	ATCAAGAACCCGAGA	
*****			
243			
human_c6	ATGCAATAATCCTGCCCCCAA	AGGGGGGAGAAGCGACAAGA	370-372
hu_c6_mrna	ATGCAATAATCCTGCCCCCAA	AGGGGGGAGAAGCGACAAGA	
rat_C6	GTGTAATAACCCCTGAGCCACAG	AGGGCAAGCATTGGCAAGA	
mouse_c6	GTGTAATAACCCCTGAGCCACAG	GTGGCAAGGATCAGCAAGA	
*****			
human_c6	CATGGA AAAACA		373-375
hu_c6_mrna	CATGGA AAAACA		
rat_C6	AATGGA AAAAGT		
mouse_c6	AATGGA AAAATGT		376-377
*****			
human_c6	GAAAGAGGTCGATCTTCTGAGAT	CCTCAGCCAGT	378-380
hu_c6_mrna	GAAAGAGGTCGATCTTCTGAGAT	CCTCAGCCAGT	
rat_C6	AAAAGAAGTAGACCTTGCTGAGCC	CCTCAGCCACC	
mouse_c6	GACAGAGGTAGACCTTGCTGAGCC	TCTCAACCACC	
*****			
234			
human_c6	TCCTCCAGAAAATGGATTATCC	TGTTGGAGAAGATGT	381-383
hu_c6_mrna	TCCTCCAGAAAATGGATTATCC	TGTTGGAGAAGATGT	
rat_C6	TCTCCAGAAAATGCATTGTCT	CAGTCGGGGAGGAAGT	
mouse_c6	TCTCCAGAAAACGCATTACCT	CAGTTGGGGAGGAAGT	
*****			
human_c6	TGAAACTGTTGGATA		384-386
hu_c6_mrna	TGAAACTGTTGGATA		
rat_C6	CAAAGCTGTTGGATA		
mouse_c6	CACAGCTGTTGGATT		387-388
*****			
human_c6	AGACGGG	CGGACGGAGTGCATCAAGCCAGT	389-391
hu_c6_mrna	AGACGGG	CGGACGGAGTGCATCAAGCCAGT	
rat_C6	AGACAGA	CGGACCGAGTGCCTCAAACCAGT	
mouse_c6	AGACAGA	AGGACCTCGTGCCTCAAGCCCGT	
*****			
human_c6	TGTGCAGGAA	ATTGTATAGA	392-393
hu_c6_mrna	TGTGCAGGAA	ATTGTATAGA	
rat_C6	CGTTCAGGAT	TGTGTACAAG	394-395
mouse_c6	TGTTTCAGGAT	AGTGTATCAG	
*****			
human_c6	AACTTGCCCCAA	CAGGG	396-398
hu_c6_mrna	AACTTGCCCCAA	CAGGG	
rat_C6	GACCTGTCCCAG	AAGGG	
mouse_c6	GACATGCCCCAG	AAGGA	
*****			
human_c6	GAAT	CTCTCTCACCTGTGAAAAGATACTCTAACAAA	399-401
hu_c6_mrna	GAAT	CTCTCTCACCTGTGAAAAGATACTCTAACAAA	
rat_C6	AGAC	TTCACTGAGCTGTGAAAAGATATTCGACAAA	
mouse_c6	AGAC	TTCAATTGACCTGTGAAACAGGTCTCAGAGCCA	
*****			
111                      134                      156			
human_c6	ATTAAAAGGCCATTGTCAGCTGGGACAGAAACAATCAGGATCTGAATGCATTTGTATGTC		
hu_c6_mrna	ATTAAAAGGCCATTGTCAGCTGGGACAGAAACAATCAGGATCTGAATGCATTTGTATGTC		
rat_C6	GTCAAAGGGCCTTTGTCAACCAGGACAAAAGCAATCAGGATCCGAGTGTGTTTGTATGTC		

Tabel 5E

mouse_c6	TCCGTGAGAAAGTGATC--CCTTCACAATCTCCTTAACAAGTCAAAGGGCCCTTGAA----
	* * * * *
human_c6	TCCAGAAGAAGACTGTAGCCATCATTGAGAAGATCTCTGTGTGTTGACACAGACTCCAA
hu_c6_mrna	TCCAGAAGAAGACTGTAGCCATCATTGAGAAGATCTCTGTGTGTTGACACAGACTCCAA
rat_c6	CCCAGAAGAAGACTGTAGCAGTTATTCGGAAGATCTCTGTATATTTGATGAGGGATCCAG
mouse_c6	-CTAAGAGCTGGTTGCCACCCCTTCCCTTATTCCCTTCCCTAACACCTAAGACTGTAA
	* * * * *
human_c6	CGATTACTTTACTTCACCCGCTTGTAAGTTTTTGGCTGAGAAATGTTTAAATAATCAGCA
hu_c6_mrna	CGATTACTTTACTTCACCCGCTTGTAAGTTTTTGGCTGAGAAATGTTTAAATAATCAGCA
rat_c6	TCAGTACTTCACCTTCATCTGCTGCAAAATTTTGGCTGAAAAATGTTTAAACAGCAACCA
mouse_c6	AATTTGAATAACAGTCCCTCTTCCCTATCTCTTTCCGAGTCCCATGACATC-CAAGGA
	* * * * *
human_c6	ACTCCATTTCTACATATTGGTTCTGCAAGACGGCCGCGCAGTTAGAATGGGGTCTTGA
hu_c6_mrna	ACTCCATTTCTACATATTGGTTCTGCAAGACGGCCGCGCAGTTAGAATGGGGTCTTGA
rat_c6	GTTCCACTTTGTCCATGCTGTTCTGCAAGAAAGGCCACAGTTAGAATGGGGTCTTGA
mouse_c6	CATGAGCTGTGCTGAGCCAGCTTGACTCCCAAGGCTGTTGAGGAGGATCAAGGCTCTG
	* * * * *
human_c6	AAGGACAAGACTTTCAT--CCAACAGCACAAAGAAAGAATCCTGTGGCTATGACACCTGC
hu_c6_mrna	AAGGACAAGACTTTCAT--CCAACAGCACAAAGAAAGAATCCTGTGGCTATGACACCTGC
rat_c6	GAGGCTAAACTCGCAA--TGAAGAGCACAAAGAGAGTCCCTGTGGATATGATACTTGC
mouse_c6	GAG-ATAAGATGCAAAGTGCTGCTGCTTGGCGCCTGACTTCAGCCCCATGTCAGCAGT
	** * * * *
human_c6	TATGACTGGGAAAAATGTTGAGCCTCCACTTCCAAATGTGTCTGCCTATTGCCCCACAG
hu_c6_mrna	TATGACTGGGAAAAATGTTGAGCCTCCACTTCCAAATGTGTCTGCCTATTGCCCCACAG
rat_c6	TATGACTGGGAAAAATGTTGAGCCACACCTCCAAGTGTGTCTGCCTATTGCCCCACAA
mouse_c6	CGTCCCTTCCCTTGTCTTTGTACAACCTCCCTCGACCCCTCCCTATTTCGCGGATG
	* * * * *
	178
human_c6	TGCTTCAAGGGTGGAAACCAACTCTACTGTGTCAAATGGGATCATCAACAAGTGAGAAA
hu_c6_mrna	TGCTTCAAGGGTGGAAACCAACTCTACTGTGTCAAATGGGATCATCAACAAGTGAGAAA
rat_c6	TGCCCAAGGATGAAAACCAACTCCACTGTGTCAAATGGGATCATCAATGCCGTGGGAAA
mouse_c6	TATGCTTTATAAGGAAAGCACCTCAGCTTAAT--AAATGAGACC-TTGATAGGTTAATC
	* * * * *
	200
human_c6	ACATTGAACATCTGTGAAGTGGGAACATAAGATGTGCAAACAGGAAGATGGAATACTG
hu_c6_mrna	ACATTGAACATCTGTGAAGTGGGAACATAAGATGTGCAAACAGGAAGATGGAATACTG
rat_c6	ACAGTAAACATCTGTACACTGGGAGCCGTGAGGTGTGCAAACAGGAAGGTGGAATACTG
mouse_c6	T-----
	222
human_c6	CATCCTGGAAAGTGTTTGGCCTAGCACAACTTACTGCTAGGCCCCAGCACAAATGAACAGATT
hu_c6_mrna	CATCCTGGAAAGTGTTTGGCCTAGCACAACTTACTGCTAGGCCCCAGCACAAATGAACAGATT
rat_c6	AATCCTGGGAGGTGCTTGGATTAGCA-----CTGCTAG-----TGATGAATGAATT
mouse_c6	-----
human_c6	TACCATCCCGAAGAACCAACTCTACAAATGAGAATTCTTGACAAACAGCAGACTGGCA
hu_c6_mrna	TACCATCCCGAAGAACCAACTCTACAAATGAGAATTCTTGACAAACAGCAGACTGGCA
rat_c6	TATTATTC--AAAAACAACGGACAGGAAGTGAGGAAAGT-GAATGGATGGGAGCAAAGTA
mouse_c6	-----
human_c6	TGCTCAAAGTACTGACAAAAATATTTTCTGTAGTTGAGATCATTATTCTCCCTGA
hu_c6_mrna	TGCTCAAAGTACTGACAAAAATATTTTCTGTAGTTGAGATCATTATTCTCCCTGA
rat_c6	TGATAACACATATCTTCAGGAATG-----TAATGATAAAAACCCATTACTTTGTAT--A
mouse_c6	-----

Tabel 5F

human_c6	CTCTCCTGTTTGGGCATGTCTTATTCAGTTCAGCTCATGACGCCCTGTAGCATACCCCT
hu_c6 mrna	CTCTCCTGTTTGGGCATGTCTTATTCAGTTCAGCTCATGACGCCCTGTAGCATACCCCT
rat_C6	ATAACCTAAACAAAC---TCTTTTAAAAAAAACTCATTATA---TGTAACCTAACA-T
mouse_c6	-----
human_c6	AGGTACCAACTTCCACAGCAGTCTCGTAAATTCTCCTGTTACATTGTACAAAAATAATG
hu_c6 mrna	AGGTACCAACTTCCACAGCAGTCTCGTAAATTCTCCTGTTACATTGTACAAAAATAATG
rat_C6	AGCCATAAATTGCTG--GCAAAAAAAAAA-----AAAAAAAAAAAAAAAAAA--
mouse_c6	-----
human_c6	TGACTTCTGAGGCCCTTATGTAGCCTGTGACATTAAGCATTCTCGCAATTAGAAATAAGA
hu_c6 mrna	TGACTTCTGAGGCCCTTATGTAGCCTGTGACATTAAGCATTCTCACAATTAGAAATAAGA
rat_C6	-----
mouse_c6	-----
human_c6	ATAAAC-----
hu_c6 mrna	ATAAACCCATAATTTCTTCAATGAGTTAATAACAGAAATCTCCAGAACCTCTGAAAC
rat_C6	-----
mouse_c6	-----
human_c6	-----
hu_c6 mrna	ACATTCTGAAGCCCAGCTTTCATATCTTCATTCAACAAATAATTTCTGAGTGTGTATAC
rat_C6	-----
mouse_c6	-----
human_c6	-----
hu_c6 mrna	AGGATGTCAAGTACTGACCAAAGTCTGAGAACTCGGCAGATAATAAAACAGACAAAAGC
rat_C6	-----
mouse_c6	-----
human_c6	-----
hu_c6 mrna	CTTTGCCCTTCATGAAGCATACATTCATTGAGGGTAGACACACAAAAATGAAATAACA
rat_C6	-----
mouse_c6	-----
human_c6	-----
hu_c6 mrna	GGTAAATATGTAGC
rat_C6	-----
mouse_c6	-----

## Patendinõudlus

1. Üheaahelaline antisens oligomeer pikkusega 10 kuni 50 nukleotiidi külgneva  
5 nukleoaluse järjestusega, mille järjestus on vähemalt 80% ulatuses identne  
nukleiinhappe komplementaarse piirkonnaga, mis kodeerib KOMPLEMENT  
KOOSTISOSA 6 (C6) järjestuse, mis kannab tähistust SEQ ID NO 1; kusjuures  
oligomeer hõlmab vähemalt ühte nukleotiidi analoogi ja on võimeline vähendama C6  
mRNA ekspresseerimise taset imetajal vähemalt 20% võrra, nii nagu see on qPCR  
10 katsega määratav, kusjuures oligomeer on sihitud nukleotiididele 112-152, 433-473,  
546-586, 706-746 või 1015-1055 algusega SEQ 10 NO: 1 ATG lähtesaidist.
  
2. Oligomeer vastavalt nõudluspunktile 1, mille korral sisaldab oligomeer edasiselt  
vähemalt ühte modifitseeritud internukleosiid linki ja modifitseeritud nukleiinalust.  
15
  
3. Oligomeer vastavalt nõudluspunktile 1, mille korral nukleotiidi analoog on  
modifitseeritud suhkru molekuliosa, mis on valitud rühmast, mis hõlmab järgmist: 2'-0-  
metoksüetüül modifitseeritud suhkru molekuliosa, 2'-metoksü modifitseeritud suhkru  
molekuliosa, 2'-0-alküül modifitseeritud suhkru molekuliosa ning bitsükliline suhkru  
20 molekuliosa.
  
4. Oligomeer vastavalt nõudluspunktile 3, milles korral bitsükliline suhkru molekuliosa  
on lukustatud nukleiinhappe (LNA) monomeer.
  
5. Oligomeer vastavalt nõudluspunktile 2, mille korral modifitseeritud internuk--  
25 leosiidlingiks on fosforotioaat internukleosiidlink.
  
6. Oligomeer vastavalt nõudluspunktile 2, mille korral modifitseeritud nukleiinaluseks  
on 5-metüültsütosiin.

7. Patendinõudluse 1 kohane oligomeer, mille korral oligomeeri pikkus on vahemikus 12 kuni 45 nukleotiidi.
8. Patendinõudluse 1 kohane oligomeer, mille korral oligomeeri pikkus on vahemikus  
5 10 kuni 18 nukleotiidi.
9. Patendinõudluse 1 kohane oligomeer, mille korral on oligomeer sihitud nukleotiididele 132, 453, 566, 726 või 1035 algusega SEQ 10 NO: 1 ATG lähtesaidist.
- 10 10. Oligomeer vastavalt nõudluspunktile 1 või 9, mille korral oligomeer on vähemalt 90%, 96%, 97%, 98% või 99% järjestuse identsusega Komplement koostisosa C6 järjestusega, mis kannab tähistust SEQ 10 NO:1.
11. Ravimkoostis, mis sisaldab nõudluspunkti 1 või 2 kohast oligomeeri ja  
15 farmatseutiliselt vastuvõetavat lahjendit, kandjat, soola või adjuvanti.
12. Vähemalt ühe oligomeeri vastavalt nõudluspunktile 1 kasutamine ravimi valmistamiseks seisundi ravimiseks, mis eeldab aksonaalse regeneratsiooni toimumist.
- 20 13. Vähemalt ühe oligomeeri vastavalt nõudluspunktile 1 kasutamine ravimi valmistamiseks kroonilise demüeliniseeriva seisundi ravimiseks.
14. Kasutus vastavalt nõudluspunktile 13, mille korral on krooniliseks demüeliniseerivaks seisundiks hulgiskleroos, krooniline demüeliniseeriv neuropaatia, HMSN  
25 (CMT) haigus tüüp 1A ja 18, Alzheimeri tõbi, Huntingtoni tõbi, Charcot-Marie-Tooth haigus, amüotroofne lateraalskleroos (ALS), Guillain-Barre sündroom (GBS, mida tuntakse ka kui äge põletikuline demüeliniseeriv polüneuropaatia ehk AIOP), leukodüstroofia või Parkinsoni tõbi.