

(11) Número de Publicação: **PT 1857555 E**

(51) Classificação Internacional:

C12N 15/63 (2006.01) **A61K 48/00** (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01) **C12N 15/11** (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01) **A61K 38/00** (2006.01)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **2004.10.01**

(30) Prioridade(s): **2003.10.02 DE 10346487**

(43) Data de publicação do pedido: **2007.11.21**

(45) Data e BPI da concessão: **2008.12.31**
068/2009

(73) Titular(es):

STERNA BIOLOGICALS GMBH & CO. KG
BMFZ HANS-MEERWEIN-STRASSE 2 35043
MARBURG DE

(72) Inventor(es):

HARALD RENZ DE
SERDAR SEL DE

(74) Mandatário:

MARIA SILVINA VIEIRA PEREIRA FERREIRA
RUA CASTILHO, N.º 50, 5º - ANDAR 1269-163 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE UM MEDICAMENTO ESPECÍFICO DE CÉLULAS E/OU DE TECIDOS E/OU DE ESTÁDIOS PATOLÓGICOS**

(57) Resumo:

RESUMO

"PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE UM MEDICAMENTO ESPECÍFICO DE CÉLULAS E/OU DE TECIDOS E/OU DE ESTÁDIOS PATOLÓGICOS"

As inflamações crónicas representam uma esfera problemática a nível médico cada vez maior, com um grande impacto sócio-económico. O factor de transcrição T-bet induz especificamente o desenvolvimento das células TH1 e controla a produção do INFgama nestas células, e está envolvido no aparecimento de reacções inflamatórias crónicas e de doenças auto-imunes. A presente invenção é relativa a desoxirribozimas compostas por um domínio catalítico com a sequência nucleotídica GGCTAGCTACAACGA ou com uma sequência modificada com uma acção biológica equiparável, que cliva o ARNm do T-bet em todos os pontos de ligação de purina-pirimidina a que está ligado, com um domínio de ligação do substrato direito, que se junta na extremidade 3' do domínio catalítico, e com um domínio de ligação do substrato esquerdo que se junta à extremidade 5' do domínio catalítico, sendo os dois domínios de ligação do substrato por sua vez complementares a duas regiões do ARNm do T-bet, pelo que hibridizam com o ARNm, são activos *in vivo* e contêm a sequência td69 GGCAATGAA GGCTAGCTACAACGA TGGGTTTCT ou td70 TCACGGCAA GGCTAGCTACAACGA GAACTGGGT. É ainda feita a descrição de um medicamento que contém uma desoxirribozima destas e a sua utilização na produção de um medicamento destinado ao tratamento de inflamações crónicas, com vista à inibição específica da expressão do T-bet em células-alvos de doentes.

DESCRIÇÃO

"PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE UM MEDICAMENTO ESPECÍFICO DE CÉLULAS E/OU DE TECIDOS E/OU DE ESTÁDIOS PATOLÓGICOS"

A presente invenção é relativa a um processo para a produção de um medicamento específico de células e/ou de tecidos e/ou de estádios patológicos, adequado ao tratamento de inflamações crónicas.

Antecedentes da Invenção

As inflamações crónicas representam uma esfera problemática a nível médico cada vez maior com um grande impacto sócio-económico. Neste âmbito estão sobretudo incluídos os seguintes grupos de patologias:

- doenças auto-imunes e doenças do foro reumático (manifestações, por exemplo, na pele, nos pulmões, rins, sistema vascular, sistema nervoso, tecido conjuntivo, sistema locomotor, sistema endócrino)
- reacções alérgicas imediatas e asma
- doenças pulmonares obstrutivas crónicas (DPOC)
- arteriosclerose
- psoríase e eczema de contacto
- reacções de rejeição crónicas após o transplante de órgãos, medula óssea

Muitas destas patologias mostram nas últimas décadas uma prevalência crescente não apenas nos países industrializados como em certa medida a nível mundial. Assim, na Europa, na América do Norte, no Japão e na Austrália, mais de 20% da população sofre entretanto de

doenças alérgicas e asma. As doenças pulmonares obstrutivas crónicas são actualmente a quinta causa de morte a nível mundial e irão representar no ano de 2020, segundo cálculos da OMS, a terceira causa de morte mais frequente. A arteriosclerose com as subseqüentes patologias enfarte cardíaco, ataque apopléctico e doença arterial oclusiva periférica tomam o primeiro lugar na estatística mundial de morbidade e mortalidade. A psoríase e o eczema de contacto são em conjunto com a neurodermite as doenças inflamatórias crónicas da pele mais comuns.

Devido a uma falta de entendimento suficiente até aos dias de hoje acerca das interacções entre factores ambientais e uma predisposição genética, ocorrem desregulações continuadas do sistema imunitário. Neste contexto, é possível constatar para estas diferentes patologias os seguintes princípios comuns:

- (A) Desenvolve-se uma resposta imunitária excessiva contra antigénios normalmente inofensivos para os humanos. Estes antigénios poderão ser elementos ambientais (por exemplo, alergénios como pólenes, pêlos de animais, alimentos, ácaros, substâncias químicas como conservantes, corantes, detergentes). Nestes casos, desenvolve-se nos doentes uma reacção alérgica. No caso, por exemplo, de fumadores activos e passivos, ocorrem doenças pulmonares obstrutivas crónicas (DPOC). Por outro lado, o sistema imunitário também pode reagir contra componentes do seu próprio organismo, reconhecendo-os como estranhos e despoletando contra eles uma reacção inflamatória. Nestes casos, desenvolve-se uma doença auto-imune. Em todos os casos,

antigénios inofensivos e não tóxicos são indevidamente reconhecidos como estranhos ou perigosos, e acciona-se uma reacção inflamatória desmedida.

- (B) As patologias passam por estádios que incluem iniciação, progressão, portanto evolução da reacção inflamatória, e a destruição a isso associada e a remodelação com perda de funcionalidade orgânica (designada por *remodeling*).
- (C) As patologias mostram características de especificidade sub-fenotípicas específicas dos doentes.
- (D) Tomam efectivamente parte na iniciação, manutenção e nos processos de destruição e remodelação, componentes da imunidade inata e adquirida. Sob a influência da imunidade inata (componentes importantes: células que apresentam antigénios com as respectivas diversas populações e o sistema complemento), ocorre uma activação e uma diferenciação celular do sistema imunitário adaptativo (componentes importantes: linfócitos T e B). As células T assumem funções centrais na progressão, ao se diferenciarem em efectores altamente especializados. Neste caso, activam e adquirem certos mecanismos efectores, a que pertencem sobretudo as seguintes funções: produção de anticorpos, controlo da funcionalidade das células efectoras do sistema imunitário (como, por exemplo, granulócitos neutrófilos, basófilos, eosinófilos), retrocontrolo de funções do sistema

imunitário inato, influência da funcionalidade de células não hematopoiéticas, como, por exemplo, epitélio, endotélio, tecido conjuntivo, osso e cartilagem e, sobretudo, células neuronais. Aqui ocorre uma interacção particular entre o sistema imunitário e o sistema nervoso, a partir da qual se desenvolveu o conceito da interacção neuroimunológica no caso das inflamações crónicas.

Devido à complexidade e aos múltiplos aspectos dos quadros clínicos relacionados como inflamações crónicas, é necessário colocar os seguintes requisitos a um medicamento óptimo para o tratamento de doenças:

(1) As patologias manifestam-se em (sub)-fenótipos específicos do doente. Por isso, é necessário que os medicamentos apresentem uma grande especificidade relativamente ao doente ou ao caso.

(2) As patologias passam por fases e estádios. Por isso, é necessário que os medicamentos tenham uma especificidade para os estádios ou fases.

(3) As patologias são reguladas por células diferentemente especializadas. Por isso, é necessário que os medicamentos intervenham a nível específico das células.

(4) As patologias manifestam-se em diferentes órgãos e compartimentos. Por isso, é necessário que os medicamentos tenham uma especificidade de compartimento ou de órgão.

(5) Os medicamentos devem ser adequados a uma terapia de longo prazo. Deve-se assim evitar reacções do sistema imunitário contra os medicamentos.

(6) O perfil de efeitos secundários dos medicamentos

deve estar numa relação médica e ética para com o nível de gravidade, o prognóstico e a evolução das patologias numa relação aceitável.

Nenhuma das terapias estabelecidas hoje em dia disponíveis contra inflamações crónicas satisfaz estes critérios de forma ideal. A partir do documento DE 695 11 245 T2, conhece-se o tratamento com a imunoglobulina A e, a partir do documento DE 695 18 667 T2, a inibição da fosfolipase A₂ (PLA₂) e/ou da transacilase independente da coenzima A (CoA-IT). No centro dos conceitos terapêuticos actualmente estabelecidos encontram-se, para esta patologia, a terapia anti-inflamatória não específica e a imunossupressão. Assim, muitas das substâncias de acção anti-inflamatória não-específicas empregues, tais como o ibuprofeno, o ácido acetilsalicílico e o paracetamol não são suficientemente eficazes ou acarretam uma taxa elevada de efeitos secundários indesejados. Em contrapartida, os esteróides têm uma maior potência de eficácia, mas acarretam por seu lado efeitos secundários graves, como hipertonia, diabetes e osteoporose. Os medicamentos imunossupressores da nova geração, como, por exemplo, a ciclosporina e o tacrolimus, mostram hepatotoxicidade e nefrotoxicidade.

Esta situação levou à pesquisa e a testes clínicos de uma série de moléculas mais recentes, que deverão intervir de forma específica nas desregulações imunológicas e citobiológicas. A estas pertencem as citoquinas, os receptores das citoquinas e as anti-citoquinas. Os problemas, associados a estas aplicações terapêuticas mais recentes, incluem a falta de especificidade a nível das células e dos órgãos, o desenvolvimento de reacções imunitárias indesejadas contra estas moléculas, assim como

uma eficácia duvidosa em diversos fenótipos.

Procura-se mais recentemente empregar uma nova classe de moléculas catalíticas, as denominadas "desoxirribozimas" (ou "ADNzimas") (Santoro, 1997), como agentes terapêuticos para a desactivação de genes cuja expressão provoca doenças. As desoxirribozimas são moléculas de cadeia simples, que se podem em princípio ligar a regiões complementares do ARN e desactiva-las por clivagem. A utilização específica de desoxirribozimas como agentes terapêuticos pressupõe, porém, que os genes que originam a patologia e o respectivo ARNm sejam conhecidos com a maior precisão possível. No entanto, tal apenas se verifica até à data no caso de poucas doenças.

A desoxirribozima descrita no documento WO 01/11023A1 liga o RelA (p65) mONA e está assim dirigida contra o factor de transcrição NF- κ B, no documento WO 00/42173 é revelada uma desoxirribozima de ligação do ARNm do EGR-1. O documento WO 99/50452 revela uma desoxirribozima 10 - 23, que pode ser utilizada num método de diagnóstico para encontrar mutações de ácidos nucleicos. Nenhuma das moléculas anti-sentido e desoxirribozimas actualmente conhecidas pode ser utilizada na produção de um medicamento destinado ao tratamento de inflamações crónicas nos doentes.

Objectivo da invenção

O objectivo da presente invenção é o de preparar medicamentos específicos de células e/ou de tecidos e/ou de estádios patológicos, que levem à desactivação funcional de moléculas de ácido ribonucleico de factores de transcrição e factores das vias de transdução de sinal, cuja expressão

está envolvida no aparecimento de reacções inflamatórias crónicas e de doenças auto-imunes, e que sejam adequados ao tratamento de reacções inflamatórias crónicas e de doenças auto-imunes, sendo eliminadas as desvantagens descritas no estado da técnica.

Além disso, a invenção tem por objecto um processo para a produção de medicamentos específicos de células e/ou de tecidos e/ou de estádios de doença, o qual identifique as moléculas de ácido ribonucleico de factores de transcrição e de factores das vias de transdução de sinal, cuja expressão está envolvida no aparecimento de reacções inflamatórias crónicas e de doenças auto-imunes, e as desactiva funcionalmente nas células-alvos.

O objectivo é atingido, em conformidade com a invenção, por meio de desoxirribozimas específicas de acordo com as reivindicações 1 a 5, um processo de acordo com a reivindicação 6, e um medicamento e a sua utilização de acordo com as reivindicações 7 a 9.

A vantagem da invenção consiste numa desactivação funcional de moléculas de ácido ribonucleico de factores de transcrição e factores das vias de transdução de sinal, para diferenciação e/ou expressão de citocinas envolvidas no surgimento de reacções inflamatórias crónicas e de doenças auto-imunes, por meio de desoxirribozimas específicas e/ou de ARNsi. Esta estratégia distingue-se das preparações convencionais, mas também das de terapia genética, por uma máxima selectividade e uma máxima especificidade de células e/ou de tecidos e/ou de estádios patológicos, uma grande estabilidade das moléculas e uma antigenicidade desprezável. Conseguem-se condições prévias óptimas para uma terapia de longa duração talhada à medida no caso de doentes com doenças inflamatórias crónicas.

Outros detalhes e vantagens da presente invenção tornam-se evidentes a partir das figuras e da descrição que se seguem. As figuras mostram:

Fig. 1: Representação esquemática da transdução de sinal na diferenciação de células CD4⁺ em célula TH1 ou TH2 (modificadas de acordo com Ho I. C. e Glimcher L. H., "Cell" 2002; 109: pág. 109 - 120).

Fig. 2: Sequência nucleotídica do domínio catalítico da desoxirribosima 10 - 23 e ligação a um ARN-alvo, por meio de emparelhamento de Watson-Crick. (R = A ou G; Y = U ou C, N = A, G, U ou G). A seta mostra o ponto de clivagem no ARNm alvo.

Fig. 3: *Pool* de moléculas específicas de ácido ribonucleico de acordo com a etapa b), em particular as desoxirribosimas td1 a td70 contra T-bet e as respectivas sequências nucleotídicas (A = adenina, G = guanina, C = citosina, T = timina)

Fig. 4: Sequências nucleotídicas do gene T-bet humano no alinhamento

Sequência 1: T-bet humano da base de dados n.º: NM_013351.

Sequência 2: T-bet humano (sequenciado de pBluescript-SK).

As bases divergentes estão com fundo a cinzento. As localizações dos *primers* (iniciadores) para a clonagem do T-bet estão sublinhadas. As localizações de *primers* para a quantificação

relativa no LightCycler estão envoltas por um risco. A localização das desoxirribosimas td54 e td69 encontra-se ao mesmo tempo destacada a cinzento e sublinhada, a td70 está ainda evidenciada em letras gordas (A = adenina, G = guanina, C = citosina, T = timina)

Fig. 4A: Sequência nucleotídica 1 do gene T-bet humano da Figura 4, por sua vez estão identificados com o fundo a cinzento os pares de nucleótidos GT e AT, entre os quais se encontram outros locais de clivagem de desoxirribosimas.

Fig. 5: A electroforese em gel mostra a clivagem de um ARNm-alvo (neste caso ARNm de T-bet) com moléculas específicas de ácido ribonucleico de acordo com a etapa b), aqui desoxirribosimas modificadas [(td54m (vestígio 3), td69m (vestígio 4) e td70m (vestígio 5)]. As desoxirribosimas modificadas (0,25 μ M) são incubadas durante 30 min nos 37°C com ARNm de T-bet (0,025 μ M) transcrito *in vitro* num volume de 10 μ L com a seguinte composição de reacção: 50 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂. Em seguida, separa-se os produtos por electroforese em gel. O vestígio M contém o padrão de comprimento também introduzido de 3 000 bases e 2 000 bases, o vestígio 2 contém como controlo ARNm sem a adição de desoxirribosima. A seta A indica a banda com substrato (neste caso ARNm de T-bet), a seta B indica o maior produto de clivagem. O segundo

produto de clivagem é mais pequeno e já não se encontra nesta figura.

Fig. 6: Qualificação de quantidades de ARNm de T-bet e de GAPDH no LightCycler, com células tratadas com as desoxirribosimas td54 (A), td69 (B) e td70 (C). As células Jurkat E6.1 são transfectadas duas vezes num intervalo de 24 h com as desoxirribosimas específicas de T-bet td54 (A), td69 (B) e td70 (C) ou com desoxirribosima sem sentido como controlo (não representado). Em seguida, purifica-se ARN, realiza-se uma transcrição reversa e emprega-se o ADN obtido no LightCycler. Como padrão interno, usa-se o GAPDH (curvas a tracejado). Mostra-se por sua vez determinações quádruplas de células tratadas com desoxirribosimas específicas de T-bet ou com desoxirribosima sem sentido. As curvas contínuas mostram a quantidade de T-bet nas células tratadas com desoxirribosimas específicas de T-bet, as linhas ponteadas mostram a quantidade de T-bet nas células tratadas com desoxirribosimas sem sentido.

Fig. 7: Diagrama da quantificação relativa do ARNm de T-bet nas células Jurkat E6.1. As células Jurkat E6.1 são transfectadas duas vezes com as desoxirribosimas específicas de T-bet td54, td69 e td70 e isola-se ARN passadas 48 h. Após uma transcrição reversa, determina-se a quantidade de ARNm por meio do LightCycler. Como controlo usa-se a desoxirribosima sem sentido. A quantificação relativa do ARNm de T-bet e de GAPDH é realizada

de acordo com instruções [descritas no "User Bulletin" #2 ("ABI Prism 7 700 Sequence detection System User Bulletin" #2 (2001). Quantificação relativa da expressão genética. [Http://docs.appliedbiosystems.com/pebiiodocs/04303859.pdf](http://docs.appliedbiosystems.com/pebiiodocs/04303859.pdf))]. Neste caso, põe-se a quantidade de ARNm de T-bet da experiência de controlo com desoxirribozima sem sentido igual a 100%.

A Figura 1 mostra numa representação esquemática, modificada de acordo com Ho I. C. und Glimcher L. H. - ("Cell" 2002; 109: pág. 109 - 120), as relações da transdução de sinal na diferenciação de células CD4⁺ em células TH1 ou células TH2. A estimulação através do receptor das células T por meio do respectivo complexo de péptido-MHC induz a expansão clonal e a diferenciação programada de linfócitos T CD4⁺ em células T auxiliares TH1 ou TH2. A distinção entre estes dois subtipos é feita com base nos seus perfis de citocinas. As células TH1 produzem interferão γ (INF γ), interleucina 2 (IL-2) e factor de necrose tumoral β , enquanto as células TH2 segregam IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13. As infecções bacterianas e virais induzem uma resposta imunitária, que é dominada pelas células TH1. Por outro lado, as células TH2 regulam a produção de IgE contra parasitas. Neste caso, existe um equilíbrio entre as células TH1 e as TH2. A destruição deste equilíbrio origina doenças, estando uma resposta excessiva das células TH1 associada a doenças auto-imunes, enquanto as doenças alérgicas têm por base uma resposta mais forte das células TH2.

Sabe-se que as citocinas de TH1 estão envolvidas na patogénese de doenças auto-imunes, como, por exemplo,

uveíte auto-imune, encefalomielite alérgica experimental, Diabetes mellitus tipo 1 ou doença de Crohn, enquanto as citocinas de TH2 (IL-4, IL-5, IL-13 ou IL-9) estão envolvidas no aparecimento de doenças das vias respiratórias inflamatórias crónicas, como, por exemplo, eosinofilia das vias respiratórias, hipersecreção de muco e hiperreactividade das vias respiratórias. A base destas doenças consiste em alterações patofisiológicas durante a produção de citocinas características, por meio de células TH específicas de antígeno. Assim, os ratos transgénicos, que sobreexprimem de forma constitutiva nos epitélios das vias respiratórias as citocinas de TH2 IL-4, IL-5, IL-13 ou IL-9, mostram reacções inflamatórias alérgicas típicas. Subpopulações das células TH2 nos pulmões e nas vias respiratórias provocam nas células TH2 no modelo animal os sintomas característicos da asma brônquica.

Descobriu-se de forma surpreendente que ao tratamento, específico de células e/ou de tecidos, de inflamações crónicas e/ou de doenças auto-imunes, se adequam de forma ideal factores de transcrição e factores das vias de transdução de sinal para a diferenciação e/ou expressão de citocinas, que estão envolvidas no aparecimento de reacções inflamatórias crónicas e de doenças auto-imunes, como, por exemplo, o factor de transcrição específico das células TH1 T-bet e o factor de transcrição específico das células TH2 GATA-3.

O factor de transcrição específico das células TH1 T-bet é sobretudo responsável pela diferenciação das células T CD⁺ naive em células TH1. A sua expressão é controlada pelas vias de transdução de sinal dos receptores das células T (TCR) e pelo receptor de INF γ /STAT1. O T-bet transactiva o

gene do INF γ endógeno e induz a produção do INF γ . Além disso, induz a alta regulação da expressão proteica de cadeias de IL-12R β 2 e leva à remodelação da cromatina de alelos individuais do INF γ . A função *in vivo* do T-bet é confirmada em ratos knock-out (T-bet^{-/-}). Embora os ratos com deficiência em T-bet apresentem um desenvolvimento normal dos linfócitos, as células T CD4⁺ destes ratos não produzem INF γ , nem com a estimulação com anti-CD3/CD28 nem com PMA/ionomicina. Os ratos deficientes em T-bet não mostram resposta imunitária a uma infecção por *L. major*, estando aumentada a quantidade de citocinas das TH2. Conhece-se a função do T-bet em células T das mucosas no aparecimento de patologias inflamatórias do intestino. Estudos no modelo animal mostram um agravamento da colite em ratos com SCID (*severe combined immunodeficiency* = imunodeficiência combinada severa) reconstituída após transdução retroviral do T-bet em células T CD4⁺CD26L⁺ e, ao inverso, a transferência de células T deficientes em T-bet não leva a uma indução da colite.

O factor de transcrição T-bet induz de forma específica o desenvolvimento de células TH1 e controla a produção do INF γ nestas células. Através da inibição do T-bet, muda-se o equilíbrio entre as células TH1 e TH2 a favor das células TH2.

Outros factores de transcrição, que desempenham um papel na diferenciação em células TH1 ou células TH2 e que participam na origem das reacções inflamatórias crónicas e de doenças auto-imunes, apresentam uma expressão que é numa célula-alvo diferente da expressão numa célula de controlo e, de acordo com a invenção, também são empregues na concepção de desoxirribozimas específicas e/ou de ARNsi

para a aplicação terapêutica no caso de doenças inflamatórias crónicas:

- STAT4, STAT5a e STAT1 (*signal transducer and activator of transcription* = transdutor de sinal e activador de transcrição)
- c-Rel
- CREB2 (*cAMP response element-binding protein 2* = proteína de ligação ao elemento de resposta ao cAMP 2)
- ATF-2, ATF-2
- Hlx
- IRF-1 (*interferon regulatory factor-1* = factor regulador do interferão 1)
- c-Maf
- NFAT (*Nuclear factor of activated T cells* = factor nuclear de células T activadas)
- NIP45 (*NF-AT interacting protein 45* = proteína de interacção NF-AT 45)
- AP1 (*Activator Protein 1* = proteína activadora 1)
- Mel-18
- SKAT-2 (*SCAN box, KRAB domain associated with a TH2 phenotype* = SCAN box, domínio KRAB associado a um fenótipo TH2)
- CTLA-4 (*Cytolytic T lymphocyte-associated antigen 4* = antigénio 4 associado aos linfócitos T citolíticos)

Outros factores das vias de transdução de sinal, responsáveis pela diferenciação e/ou pela expressão das citocinas e que estão envolvidos no aparecimento de reacções inflamatórias crónicas e de doenças auto-imunes, apresentam uma expressão que é numa célula-alvo diferente da expressão numa célula de controlo e são igualmente empregues, de acordo com a invenção, na concepção de

desoxirribozimas específicas e/ou de ARNsi com vista à aplicação terapêutica em doenças inflamatórias crónicas:

- Src quinase
- Tec quinase

Rlk (Txk nos humanos)

Itk

Tec

- RIBP (proteína de ligação Rlk/Itk)
- PLC γ (fosfolipase C γ 1)
- MAP quinase (proteína quinase activada por mitogénios)

ERK

JNK

P38

- MKK (MAP quinase quinase)

MKK1

MKK2

MKK3

MKK4

MKK6

MKK7

- Rac2
- GADD45 (*Growth arrest and DNA damage gene 45* = gene de interrupção do crescimento e de ADN danificado 45)

GADD45 β

GADD45 γ

- SOCS (*Suppressors of cytokine signalling* = supressores da sinalização mediada por citocinas)

CIS (Cytokine-induced SH2 protein = proteína SH2 induzida por citocinas)

SOCS1

SOCS2

SOCS3

- JAK (Janus quinase)

JAK1

JAK3

- NIP45 (*NF-AT interacting protein* = proteína de interacção NF-AT)

Em conformidade com a invenção, prepara-se um medicamento específico de células e/ou de tecidos e/ou de estádios patológicos, adequado ao tratamento de inflamações crónicas.

O medicamento actua preferencialmente nos pontos de intervenção das cascatas complexas das desregulações imunológicas e citobiológicas na base das reacções inflamatórias crónicas e das doenças auto-imunes. Em termos preferenciais, trata-se de pontos de intervenção da regulação da diferenciação dos factores de transcrição envolvidos, como, por exemplo, o factor de transcrição T-bet específico das células TH1. O efeito terapêutico atingido consiste numa desactivação funcional de moléculas de ARNm por meio de desoxirribozimas específicas e/ou de

ARNsi. Esta estratégia proporciona uma série de vantagens em relação a preparações convencionais mas também de terapia genética: uma enorme especificidade e uma enorme selectividade, grande estabilidade das moléculas e uma antigenicidade desprezável. Conseguem-se condições de base óptimas para uma terapia de longo prazo talhada à medida no caso de doentes com doenças inflamatórias crónicas.

Em conformidade com a invenção, arranja-se um processo para a produção de um medicamento específico de células e/ou de tecidos e/ou de estádios de doença, que inclui as seguintes etapas:

- a) Identificação de moléculas de ácido ribonucleico, cuja expressão se distingue numa célula-alvo em relação à expressão numa célula de controlo.
- b) Concepção de moléculas específicas de ácido ribonucleico, que se ligam a moléculas de ácido ribonucleico da etapa a) e as desactivam em termos funcionais.
- c) Introdução das moléculas específicas de ácido ribonucleico da etapa b) em células-alvos.
- d) Formulação das moléculas específicas de ácido ribonucleico da etapa b) e/ou de uma célula-alvo da etapa c) num medicamento.

O conceito "específico de células e/ou de tecidos e/ou de estádios patológicos" significa, no sentido da presente invenção, que o medicamento produzido pelo processo de acordo com a invenção é, essencialmente, apenas eficaz no caso de um certo tipo de células (células-alvos) e/ou em certos tecidos ou órgãos e/ou em certos estádios patológicos, e tem uma influência desprezável noutras

células (células de controlo), noutros tecidos ou órgãos. Em termos preferenciais, o medicamento é eficaz em pelo menos 2/3 das células-alvos. Com maior preferência em pelo menos 80% e, com total preferência, em pelo menos 98% das células-alvos. Prefere-se ainda que o medicamento produza efeito em 10%, no máximo, das células-alvos, com maior preferência em 5% no máximo e, com total preferência, em < 1% das células de controlo.

O conceito "identificação de moléculas de ácido ribonucleico, cuja expressão numa célula-alvo é diferente da expressão numa célula de controlo" abrange na presente invenção os seguintes pontos:

i) células-alvos são células em tecidos e órgãos, que levam de forma conhecida ao aparecimento de uma patologia, contribuem para ela ou a reforçam, que sustentam os processos que mantêm a doença, contribuem para eles ou os reforçam, ou que levam a sequelas tardias de uma doença, contribuem para elas ou as reforçam. Destas fazem parte, por exemplo, as células que apresentam certos factores de transcrição, segregam hormonas, citocinas e factores de crescimento específicos, ou células com receptores de superfície típicos.

ii) As células-alvos podem ser isoladas, por exemplo, por meio de tecnologias que se baseiem na ligação de anticorpos específicos. Aplica-se neste caso *magnetic beads*, que podem ser obtidos da empresa Miltenyi (Macs-System), Dynal (DynaBeads) ou BD-Bioscience (iMAG). Em alternativa, isto ocorre pela purificação celular através de anticorpos marcados com fluorescência em locais de células, por exemplo, da

empresa Cytomation (MOFLO) ou BD-Bioscience (FACS-Vantage). A pureza das células-alvos é de preferência de pelo menos 80%, com maior preferência de pelo menos 95% e, com total preferência, de pelo menos 99%.

iii) Processos para o isolamento do ARN encontram-se descritos, por exemplo, *in* Sambrook and Russel, "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", 3.^a edição, Cold Spring Harbor Laboratory (2001), Nova Iorque e Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons (1998), Nova Iorque. Além disso, é possível ao especialista médio utilizar kits (Silika-Technology) disponibilizados no mercado, por exemplo, o RNeasy Kit da empresa Qiagen, para o isolamento do ARN. Além disso, prefere-se purificar directamente o ARNm das células-alvos por meio da utilização de kits comerciais, por exemplo, das empresas Qiagen (Oligotex mRNA kit), Promega (PolyAtractmRNA Isolation System) ou Miltenyl (mRNAdirect).

iv) A identificação de ARNm, diferentes entre si, ou seja, ARNm cuja expressão na célula-alvo é maior do que na célula de controlo, ocorre, por exemplo, com chips genéticos disponíveis no mercado (por exemplo, MWG, CLONTECH) ou com um processo de hibridização de filtro (ex.: Unigene) de acordo com as instruções do fabricante. Em alternativa, produz-se ARNm diferenciais por meio da hibridização substractiva de ADNc, originados anteriormente de ARNm por reacção de TR (*RT-reaction*). A estes processos conhecidos do especialista pertencem, por exemplo, o método SSH (empresa Clontech) ou o método RDA. A uma forma de aplicação também preferida pertence a combinação de tecnologia de chips e hibridização substractiva. A

identificação dos genes expressos de forma diferencial ocorre pela utilização da tecnologia de chips recorrendo a programas disponíveis no mercado, por exemplo, com o programa Vector Xpression da empresa InforMax. Aquando da utilização da hibridização substractiva, ocorre, depois do isolamento dos genes expressos de forma diferencial com base em processos convencionais familiares ao especialista, como a clonagem e o posterior sequenciamento (ver, por exemplo, Sambrook and Russel, "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", 3.^a edição, Cold Spring Harbor Laboratory" (2001), Nova Iorque e Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons (1998), Nova Iorque), um alinhamento de sequências numa base de dados, como, por exemplo, o banco de genes (www.ncbi.nlm.nih.gov).

A expressão na célula-alvo distingue-se da expressão numa célula de controlo. Numa forma de execução do processo segundo a invenção, a expressão na célula-alvo é maior do que a expressão numa célula de controlo, de preferência pelo menos 1,5 vezes maior. Numa forma de execução particularmente preferida, a expressão na célula-alvo é pelo menos 5 vezes maior do que a expressão numa célula de controlo e, numa forma de execução totalmente preferida, a expressão apenas pode ser detectada na célula-alvo e não na célula de controlo.

O conceito "concepção de moléculas de ácido ribonucleico, que se ligam a moléculas de ácido ribonucleico da etapa a) e as desactivam em termos funcionais" abrange, no sentido da presente invenção, a utilização de enzimas de ADN desactivadoras de ARN (desoxirribosimas) e/ou ARN small-

interfering (ARNsi), que desactivam moléculas de ácido ribonucleico em termos funcionais. O conceito desoxirribozimas abrange, neste caso e segundo a invenção, moléculas de ADN que reconhecem e clivam de forma específica a sequência-alvo do ácido nucleico, tanto ADN como ARN. Um modelo geral de desoxirribozimas é representado pelo modelo "10 - 23". As desoxirribozimas do modelo 10 - 23 - também denominadas "desoxirribozimas 10 - 23" - têm um domínio 25 catalítico de 15 ácidos desoxirribonucleicos, tendo por vizinhos dois domínios de ligação do substrato. O comprimento dos domínios de ligação do substrato é variável, podendo ter o mesmo comprimento ou diferentes comprimentos. Numa execução preferida, o comprimento dos domínios de ligação do substrato vai de 6 a 14 nucleótidos. Numa execução particularmente preferida, os domínios de ligação do substrato são completamente complementares à região que está contígua ao ponto de clivagem. De modo a ligar o ARN-alvo e a clivá-lo, não é contudo imprescindível que a desoxirribozima seja totalmente complementar. Estudos *in vitro* mostram que as desoxirribozimas do tipo 10 - 23 clivam o ARNm-alvo em sequências de purina-pirimidina.

De modo a utilizar as desoxirribozimas no tratamento de doenças, é preferível que essas desoxirribozimas estejam estabilizadas tanto quanto possível contra degradação no organismo (no sangue, no meio intracelular, etc.). Uma execução preferida é a introdução de uma inversão 3'-3' numa ou em mais extremidades da desoxirribozima. O conceito inversão 3'-3' designa uma ligação covalente de fosfato entre os carbonos 3' do nucleótido terminal e do nucleótido adjacente. Este tipo de ligação contrasta com a ligação fosfato normal entre os carbonos 3' e 5' de nucleótidos

sequenciais. Em conformidade com isso, prefere-se que o nucleótido na extremidade 3' seja inverso ao domínio de ligação do substrato adjacente à extremidade 3' do domínio catalítico. Além das inversões, as desoxirribozimas podem conter nucleótidos modificados ou compostos nucleotídicos. Os nucleótidos modificados contêm, por exemplo, compostos de amidato de N3'-P5'-fósforo, substituições de 2'-O-metilo e compostos de péptidos-ácidos nucleicos. A sua produção é familiar ao especialista.

Embora os pontos de clivagem de desoxirribozimas potenciais existam de forma ubíqua, estes encontram-se com frequência bloqueadas pela estrutura secundária do ARN e logo inacessíveis às desoxirribozimas. Por conseguinte, selecciona-se dum *pool* de desoxirribozimas aquelas cujos pontos de clivagem são de livre acesso. Estas desoxirribozimas seleccionadas estão activas, clivam o ARNm-alvo e desactivam-no com isso em termos funcionais. A eficiência da clivagem do ARNm pelas diferentes desoxirribozimas é mostrada pelo teste individual de cada desoxirribozima ou por teste conjunto de várias desoxirribozimas em "ensaios multiplexing" (descrito, por exemplo, *in* Cairns et al., 1999).

O conceito ARNsi abrange, segundo a invenção, moléculas de ARN compridas de 21 - 23 bases de cadeia dupla, que levam a uma degradação específica do ARNm-alvo complementar *in vitro* e também *in vivo*. O especialista conhece, com base na literatura (por exemplo, <http://www.mpibpc.gwdg.de/abteilungen/100/105/index.html>, como produzir moléculas de ARNsi a partir da sequência do ARNm-alvo.

A probabilidade de que, entre três moléculas de ARNsi escolhidas, se encontre pelo menos uma altamente activa (inibição do ARN-alvo em pelo menos 80%) é indicada na literatura com o valor de pelo menos 70%. De um *pool* de moléculas de ARNsi, selecciona-se aquelas que levam a uma degeneração específica do ARNm-alvo complementar tanto *in vitro* como *in vivo*.

O conceito "introdução das moléculas específicas de ácido ribonucleico da etapa b) em células-alvos" abrange, no sentido da presente invenção, a transfecção de vectores, em particular de plasmídeos, cosmídeos, vírus ou bacteriófagos, que contêm as moléculas de ácido ribonucleico específicas de acordo com a invenção acima descritas, nas células-alvos. Em termos preferenciais, os vectores adequam-se à transformação de células animais e humanas e permitem a integração das moléculas de ácido ribonucleico segundo a invenção. Os processos de transfecção, como, por exemplo, lipofecção por meio de DMRIE-C da empresa Invitrogen são conhecidos do especialista a partir da literatura. Em princípio, adequam-se a este fim também os vectores lipossómicos. As moléculas-alvos são factores de transcrição, células que segregam hormonas, citoquinas e factores de crescimento, mas também células que têm receptores expressos na superfície.

Como células de controlo recorre-se, no sentido da invenção, a células saudáveis do tecido alvo, células do mesmo tipo de outros compartimentos do mesmo doente ou também de indivíduos saudáveis.

A cultura das células-alvos é feita em meios de cultura adaptados de forma correspondente às necessidades dessas

células-alvos em termos de pH, temperatura, concentração salina, antibióticos, vitaminas, oligoelementos e arejamento. O conceito doente diz do mesmo modo respeito a humanos e animais vertebrados. Deste modo, o medicamento pode ser utilizado na medicina humana e veterinária.

O conceito "formulação das moléculas específicas de ácido ribonucleico da etapa b) ou de uma célula-alvo da etapa c) num medicamento" inclui composições aceitáveis a nível farmacêutico, que contenham modificações e "prodrugs", desde que não causem, depois de uma avaliação médica fiável, uma toxicidade excessiva, irritações ou reacções alérgicas no doente. O termo "prodrug" é relativo a compostos que são transformados para melhorar a absorção, como, por exemplo, através de hidrólise, no sangue.

Em termos preferenciais, a formulação permite que as moléculas específicas de ácido ribonucleico sejam ministradas ao doente na forma de uma composição aceitável a nível farmacêutico, seja por via oral, rectal, parenteral, intravenosa, intramuscular ou subcutânea, intracisternal, intravaginal, intraperitoneal, intratecal, intravascular, local (pós, pomadas ou gotas) ou na forma de pulverização.

As formas de dosagem para a administração local do medicamento desta invenção incluem pomadas, pós, pulverizadores ou inaladores. O componente activo é misturado sob condições estéreis com uma substância de suporte aceitável a nível fisiológico e com possíveis conservantes, tampões ou agentes de expansão, em função do necessário. O tipo de dosagem é determinado pelo médico responsável pelo tratamento em conformidade com os factores

clínicos. O especialista sabe que o tipo de dosagem depende de diversos factores, tais como, por exemplo, tamanho corporal, peso, superfície corporal, idade, sexo ou do estado geral de saúde do doente, mas também do meio a ser administrado de forma especial, da duração e do tipo de administração e de outros medicamentos, que sejam possivelmente ministrados em paralelo.

O medicamento produzido pelo processo de acordo com a invenção apresenta uma elevada especificidade relativamente a doente, doença, estágio ou fase. Provoca uma intervenção específica das células e é específico de compartimentos e órgãos. Não surgem reacções ou apenas muito poucas do sistema imunitário contra o medicamento, e o perfil de efeitos secundários fica numa relação aceitável em relação ao grau de gravidade, ao prognóstico e à evolução da doença. O medicamento pode ser aplicado na terapia contra um conjunto de grupos de patologias relacionados com inflamações crónicas, como, por exemplo, doenças auto-imunes, doenças do foro reumático (manifestações, por exemplo, na pele, nos pulmões, rins, sistema vascular, sistema nervoso, tecido conjuntivo, sistema de locomoção, sistema endócrino), reacções alérgicas do tipo imediato e asma, doenças pulmonares obstrutivas crónicas (DPOC), arteriosclerose, psoríase e eczema de contacto, assim como contra reacções de rejeição crónicas após transplante de órgãos e de medula óssea.

Exemplo

a) Identificação de moléculas de ácido ribonucleico, cuja expressão numa célula-alvo é diferente da expressão numa célula de controlo

i) como células-alvos, emprega-se as células CD4⁺ naives responsáveis pelo aparecimento de reacções inflamatórias crónicas.

ii) As células-alvos CD4⁺ são isoladas através de *magnetic beads* (empresa Miltenyi (Macs-System) Dynal (DynaBeads) ou BD-Bioscience (iMAG), em alternativa por meio de anticorpos marcados com fluorescência em locais de células, por exemplo, da empresa Cytomation (MOFLO) ou BD-Bioscience (FACS-Vantage).

iii) O isolamento do ARN ocorre por um método padrão, ver Sambrook and Russell, "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", 3.^a edição, Cold Spring Harbor Laboratory (2001), Nova Iorque e Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons (1998), Nova Iorque. Em alternativa, emprega-se um kit RNeasy da empresa Qiagen, ou é feito o isolamento directo do ARNm de células-alvos CD4⁺ com o Oligotex mRNA Kit da empresa Qia-20 gen de acordo com as instruções do fabricante.

iv) A identificação de ARNm, que são distintos de forma diferencial, ou seja, ARNm cuja expressão na célula-alvo é maior do que na célula de controlo, é feita por meio de chips de genes (por exemplo, MWG, CLONTECH) e a identificação dos genes expressos de forma diferencial é feita por meio do Programa Vector Xpression da empresa Infor-Max.

Os processos de hibridização por filtro (por exemplo, Unigene) de acordo com as instruções do fabricante. O isolamento dos genes expressos de forma diferencial inclui clonagem, sequenciamento (de acordo com instruções padrão, ver, por exemplo, Sambrook and Russell, "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", 3.^a

edição, Cold Spring Harbor Laboratory (2001) e o alinhamento de sequências na base de dados de genes (www.ncbi.nlm.nih.gov). A expressão do T-bet distingue-se na célula-alvo (célula TH1) comparativamente à expressão numa célula de controlo (por exemplo, célula Th0).

b) Concepção de moléculas específicas de ácido ribonucleico, que se ligam às moléculas de ácido ribonucleico da etapa a) e as desactivam em termos funcionais

A Figura 3 mostra o *pool* td1 - td78, de acordo com a invenção, de desoxirribozimas específicas contra o ARNm do T-bet. As desoxirribozimas apresentam um comprimento total de 33 nucleótidos, indo o domínio catalítico central de 15 nucleótidos (em letras minúsculas) corresponder ao domínio catalítico da desoxirribozima 10 - 23 conhecida (Figura 2). Este domínio catalítico tem adjacentes dois domínios de ligação do substrato, esquerdo e direito, compostos por 9 nucleótidos, respectivamente (em letras maiúsculas). A sequência nucleotídica dos domínios de ligação do substrato esquerdo e direito é distinta e varia nas desoxirribozimas td1 a td78, ocorrendo uma ligação específica diferente por meio de emparelhamento de Watson-Crick ao ARNm de T-bet.

A Figura 2 mostra o modelo geral de ligação da desoxirribozima 10 - 23 a um ARN-alvo opcional marcado com N, indicando a seta o ponto de clivagem no ARNm-alvo.

Visto saber-se com base na literatura que as desoxirribozimas separam de forma eficaz o ARNm-alvo em ligações de purina-uracilo na forma de ligações de purina-

citosina, constrói-se preferencialmente 5 desoxirribozimas que separam em ligações de purina-uracilo. O modelo mostrado na Figura 2 pode ser transferido em termos do seu funcionamento para a ligação das desoxirribozimas td1 a td78 ao ARNm do T-bet.

As desoxirribozimas td1 a td78 são empregues sem modificação em experiências *in vitro*, em experiências em culturas de células providas de modificações (disponíveis no mercado pela empresa Eurogentec). Como modificações para estabilizar e proteger, emprega-se:

- 1) uma timidina inversa estabilizadora na extremidade 3'
- 2) uma marcação FAM na extremidade 5' para avaliar a eficiência de transfecção das células por meio de análise FACS.

Com vista à representação das propriedades de clivagem das desoxirribozimas e à desactivação funcional do ARNm-alvo do ARNm de T-bet, a transcrição *in vitro* do ARNm de T-bet de sangue completo EDTA humano é realizada por meio do QIAamp-RNA-Blood-Mini-Kit (Qiagen, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. A Figura 4 mostra a sequência nucleotídica do T-bet humano, como se pode ver nas entradas da base de dados [PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide>)] n.º: NM_013351, sequência 1. A transcrição reversa tem lugar com o *primer* de avanço CGGCCCGCTGGA-GAGGAAGC e o *primer* reverso CACACACCCACACACAACC de acordo com os procedimentos padrão (ThermoScript da Invitrogen), amplificando-se um produto PCR com um comprimento de 2 450 nucleótidos. Este produto PCR é clonado por meio de processos padrão no plasmídeo pBluescript-SK (Stratagene) e

sequenciado para fins de teste. A Figura 4 mostra uma comparação da sequência de ácidos nucleicos do T-bet n.º NM_013351 (sequência 1) e da sequência sequenciada (sequência 2). Neste caso, verifica-se que as duas sequências não são completamente idênticas, estando em vez trocadas bases individuais. A sequência de ácidos nucleicos 2 do T-bet da Figura 4 constitui nesta invenção a base da construção de desoxirribozimas contra o ARNm do T-bet.

A Figura 4A mostra a sequência nucleotídica da sequência 1 do gene do T-bet humano da Figura 4 e estão aí identificados com fundo a cinzento por sua vez dois nucleótidos GT ou AT, entre os quais se encontram outros pontos de clivagem de desoxirribozima potenciais.

A produção do ARNm do T-bet é feita pela linearização do plasmídeo que contém o T-bet pBluescript-SK, por clivagem com a enzima de restrição Xba I (Fermentas) e por transcrição *in vitro* de acordo com as instruções do fabricante (Ambion). O ARNm do T-bet encontra-se com um comprimento de 2 550 nucleótidos ao todo.

As experiências de clivagem *in vitro* do ARNm do T-bet com as desoxirribozimas (td1 a td78) são realizadas num volume de 10 µL da seguinte composição de reacção: 50 mM Tris, pH = 7,4, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0,25 µM desoxirribozimas e 0,025 µM de ARNm de GATA-3 transcrito *in vitro* (numa relação de substrato para desoxirribozimas de 1 : 10). As reacções são incubadas nos 37°C durante os períodos de tempo indicados, respectivamente. Através da adição de RNA-Sample-Loading-Buffer (Sigma) contendo formamida e EDTA, a reacção é interrompida. As amostras desnaturadas são separadas em géis de agarose-TAE a 1,3% e são analisadas no

transiluminador de UV.

A Figura 5 mostra, como resultado da electroforese em gel, a clivagem do ARNm-alvo do T-bet com desoxirribozimas modificadas [td54-M (vestígio 3), td69-M (vestígio 4), td70-M (vestígio 5)]. O vestígio 2 contém como controlo ARNm-alvo do T-bet sem a adição de desoxirribozima. Um padrão de comprimento também veiculado (vestígio M) mostra tamanhos de banda de 2 000 bp e 3 000 bp. As setas indicam em A as bandas com o substrato (neste caso ARNm de T-bet) e B um dos dois produtos de clivagem (o outro produto de clivagem não pode ser visto nesta figura).

A comparação entre todas as 78 desoxirribozimas mostra que as td54, td69 e td70 são particularmente activas, em que as modificações não reduzem a eficácia dessas desoxirribozimas. A tabela seguinte mostra a classificação das desoxirribozimas td1 a td78 contra o ARNm de T-bet 3 em 4 grupos. Esta classificação por grupos é feita com base em testes de actividade realizados *in vitro* das desoxirribozimas contra ARNm de T-bet. O grupo 1: grande actividade de clivagem, grupo 2: actividade média de clivagem, grupo 3: fraca actividade de clivagem e grupo 4: sem actividade de clivagem mensurável.

Grupo	td	Actividade contra <u>ARNm</u> de T-bet
1	54, 69, 70	Grande actividade de clivagem
2	21, 24, 28, 29, 30, 45, 71, 72, 77, 78	Actividade de clivagem média
3	13, 19, 22, 23, 25, 27, 31, 32, 44, 46, 47, 48, 50, 51, 53, 55, 56, 57, 58, 60, 61, 62, 65, 67, 68, 73, 74, 75	Fraca actividade de clivagem

4	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 26, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41	Sem actividade de clivagem
----------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------

c) Introdução das moléculas específicas de ácido ribonucleico da etapa b) em células-alvos

Emprega-se as desoxirribozimas td54, td69 e td70, com e sem as modificações descritas, em células-alvos.

Nesse intuito, faz-se a cultura de células Jurkat E6.1 (*human acute T cell leukemia cells*) em meio RPMI com 100 U/mL de penicilina, 0,1 mg/mL de estreptomicina e 10% de FKS nos 37°C, em atmosfera de CO₂ a 5% humidificada. As transfecções são realizadas em placas de 6 cavidades. Para isso, transfere-se 2 x 10⁶ células Jurkat E6.1 para meio de cultura celular Opti-MEM I (Invitrogen) e transfecta-se por meio de DMRIE-C (Invitrogen) com as desoxirribozimas modificadas (0,3 µM) (segundo as instruções do fabricante Invitrogen). Passadas 10 horas de incubação na incubadora sob as condições anteriormente referidas, adiciona-se meio RPMI (com os aditivos acima indicados) e continua-se a incubação durante mais 14 horas. As células são lavadas com meio Opti-MEM e depois de novo transfectadas de acordo com o protocolo acima descrito. Após cada transfecção, avalia-se a eficiência de transfecção por meio de análise FACS.

Após a transfecção das células Jurkat E6.1, determina-se quantitativamente a quantidade de ARNm de T-bet relativamente à expressão do ARNm de GAPDH por meio de PCR em tempo real (LightCycler, Roche), de modo a obter informações reais acerca da eficácia *in vitro* das

desoxirribozimas.

Para fins de análise do LightCycler, purifica-se o ARN das células Jurkat E6.1 por meio do RNeasy Mini Kit (Qiagen, Alemanha) e normaliza-se seguidamente por fotometria. Após transcrição reversa com SuperScript II (Gibco) de acordo com as instruções do fabricante, segue-se a análise quantitativa do T-bet e do ARNm de GAPDH no LightCycler. O volume total para a PCR é de 20 μ L, em que estão contidos 1 μ L de ADN, 1 μ L (0,5 μ M) de *primer* sentido e *primer* anti-sentido cada, e 10 μ L de QuantiTect-SYBR-Green-PCR-Master-Mix (Qiagen, Alemanha). Os *primers* de PCR utilizados para o T-bet são: sentido 5'-CCCACCATGTCCTACTACCG-3'; anti-sentido 5'-GCAATCTCAGTCCACACCAA-3'. Os *primers* de PCR para GAPDH são: sentido 5'-TCTTCTTTTGGTCGCCAG-3' e anti-sentido 5'-AGCCCCAGCCTTCTCCA-3'. As condições de PCR são: desnaturação (15 min, 95°C), amplificação (15 s nos 95°C, 25 s nos 59°C, 25 s nos 72°C de 50 ciclos) e depois extensão final de 2 min nos 72°C. A curva de fusão que se segue é gerada do seguinte modo: 0 s nos 95°C, 15 s nos 60°C, e depois aumenta-se a temperatura em etapas de 0,2°C para os 97°C, medindo-se ao mesmo tempo em contínuo a fluorescência. A curva de fusão serve para fins de controlo interno, visto que todos os produtos PCR têm uma temperatura de fusão específica.

O SYBR-Green é um corante fluorescente (contido no QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix), que se liga à cadeia dupla de ADN. Se durante a extensão ocorrer a duplicação do ADN, o SYBR-Green ligar-se-lhe-á e gerará um sinal de fluorescência dependente de ligação, que é detectado pelo LightCycler na extremidade de cada extensão. Quanto maior a quantidade de matéria-prima, mais cedo se detecta o aumento

significativo da fluorescência. O *software* do LightCycler representa em gráfico níveis registados de intensidade de fluorescência contra os ciclos.

Na Fig. 6 encontram-se representadas curvas de amplificação do LightCycler de ARNm de T-bet e de GAPDH, após o tratamento de células Jurkat E6.1 com as desoxirribozimas td54m, td69m e td70m, em comparação com a desoxirribozima sem sentido.

O respectivo "crossing point" (Ct), definido como ciclo PCR, no qual a fluorescência se distingue pela primeira vez de forma significativa da fluorescência de fundo, é determinado manualmente com o método de Fit-Point do *software* do LightCycler. A quantificação relativa do ARNm de T-bet e de GAPDH em células tratadas com desoxirribozimas, em comparação com células tratadas com desoxirribozima sem sentido, é realizada de acordo com as instruções descritas no "User Bulletin" #2 (*ABI Prism 7 700 Sequence detection System User Bulletin #2 (2001) Relative quantification of gene expression* <http://docs.appliedbiosystems.com/pebiiodocs/04303859.pdf>). Neste caso, a quantidade de ARNm de T-bet da experiência de controlo é definida para igual a 100%. Os dados da quantificação relativa encontram-se representados em gráfico na Fig. 7.

Em comparação com o tratamento com a desoxirribozima sem sentido, verifica-se que a desoxirribozima td69m leva a uma supressão de 81,3%, e a desoxirribozima td70m a uma supressão de 81,0%, enquanto a desoxirribozima td54m não produz qualquer efeito de supressão sobre o ARNm de T-bet.

Isso significa que a desoxirribozima td54m não está activa *in vivo*, enquanto as desoxirribozimas td69m e td70m também desactivam em meio celular o ARNm de T-bet. A redução específica do ARNm de T-bet *in vivo* pelas desoxirribozimas td69m e td70m representa assim uma ferramenta terapêutica eficaz no tratamento de doenças inflamatórias crónicas.

**d) Formulação do ácido ribonucleico específico da etapa
b) e/ou de uma célula-alvo da etapa c) num medicamento**

A análise de diversas desoxirribozimas com domínio de ligação do substrato específico de T-bet mostra que as desoxirribozimas td69 e td70 inibem especificamente a expressão do T-bet *in vivo* e se adequam, como ácido ribonucleico específico, à produção de um medicamento específico de células e/ou de tecidos e/ou de estádios patológicos.

Para isso, a td69 (GGCAATGAAggctagctacaacgaTGGGTTTCT) ou a td70 (TCACGGCAAggctagctacaacgaGAACTGGGT) ou células transfectadas com a td69m ou a td70m são providas, numa composição farmacêutica, de um veículo aceitável a nível farmacêutico, por exemplo, lipossomas ou polímeros biodegradáveis.

Em alternativa às desoxirribozimas, propõe-se para a inibição específica da expressão do T-bet e para a produção de um medicamento específico de células e/ou de tecidos e/ou de estádios patológicos, a utilização de ARNsi.

Preferencialmente, trata-se de ARNsi para a inibição do T-bet humano. A produção do ARNsi é conhecida do especialista

e encontra-se descrita na literatura. Um exemplo de sequência de ARNsi:

Fonte	Sequências de ácidos nucleicos
T-bet	Cadeia sentido: UCAGCACCCAGACAGAGAUGdTdT
humano	Cadeia anti-sentido: CAUCUCUGUCUGGUGCUGAdTdT

É evidente ao especialista que, com o saber da presente invenção, também se possa produzir facilmente desoxirribozimas específicas ou ARNsi como medicamento no caso de doenças inflamatórias crónicas e de doenças auto-imunes, que estejam dirigidas contra outros factores de transcrição, os quais desempenham um papel na diferenciação em células TH1 ou em células TH2, por exemplo, STAT4, STAT5a, STAT1, c-Rel, CREB2, ATF-2, ATF-2, Hlx, IRF-1, c-Maf, NFAT, NIP45, AP1, Mel-18, SKAT-2, CTLA-4 ou contra outros factores das vias de transdução de sinal na diferenciação e/ou na expressão de citocinas, por exemplo, Src quinase, Tec quinase, Rlk (Txk nos humanos), Itk, Tec, RIBP, PLC γ , MAP quinase, ERK, JNK, P38, MKK, MKK1, MKK2, MKK3, MKK4, MKK6, MKK7, Rac2, GADD45, GADD45 β , GADD45 γ , SOCS, CIS, SOCS1, SOCS2, SOCS3, JAK, JAK1, JAK3, NIP45.

Estas proteínas apresentam uma expressão que é maior numa célula-alvo do que a expressão numa célula de controlo.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Philipps-Universität Marburg

<120> Processo para a produção de um medicamento específico de células e/ou de tecidos e/ou de estádios patológicos

<130> desconhecido

<140> PCT/DE2004/002197

<141> 2004-10-01

<150> DE 10346487.5

<151> 2003-10-02

<160> 80

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 33

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> desoxirribosima td1 contra ARNm de T-bet

<222> (1)..(33)

<400> 1

tggcttctag gctagctaca acgagccctc gtc

33

<210> 2

<211> 33

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> desoxirribosima td2 contra ARNm de T-bet

<222> (1)..(33)

<400> 2

gggctctgag gctagctaca acgagcctgg ctt 33

<210> 3

<211> 33

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> desoxirribozima td3 contra ARNm de T-bet

<222> (1)..(33)

<400> 3

gggaccccag gctagctaca acgacggagc ccg 33

<210> 4

<211> 33

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> desoxirribozima td4 contra ARNm de T-bet

<222> (1)..(33)

<400> 4

ggtgggggag gctagctaca acgaccacc gga 33

<210> 5

<211> 33

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> desoxirribozima td5 contra ARNm de T-bet

<222> (1)..(33)

<400>5

ggcgggggag gctagctaca acgaccgagg gcc 33

<210> 6

<211> 33

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> desoxirribozima td6 contra ARNm de T-bet

<222> (1)..(33)

<400> 6

gggctgggag gctagctaca acgagggcag gga 33

<210> 7

<211> 33

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> desoxirribozima td7 contra ARNm de T-bet

<222> (1)..(33)

<400> 7

cgtcgaggag gctagctaca acgaccgccc ctc 33

<210> 8

<211> 33

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> desoxirribosima td8 contra ARNm de T-bet

<222> (1)..(33)

<400> 8

gggctggcag gctagctaca acgacttccc gta 33

<210> 9

<211> 33

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> desoxirribosima td9 contra ARNm de T-bet

<222> (1)..(33)

<400> 9

cgatgcccag gctagctaca acgaccgggg cgg 33

<210> 10

<211> 33

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220> .

<221> desoxirribosima td10 contra ARNm de T-bet

<222> (1)..(33)

<400> 10

gctccacgag gctagctaca acgagcccat ccg 33

<210> 11

<211> 33

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> desoxirribozima td11 contra ARNm de T-bet

<222> (1).._(33)

<400> 11

ccggctccag gctagctaca acgagatgcc cat 33

<210> 12

<211> 33

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> desoxirribozima td12 contra ARNm de T-bet

<222> (1).._(33)

<400> 12

tctccgcaag gctagctaca acgaccggct cca 33

<210> 13

<211> 33

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> desoxirribozima td13 contra ARNm de T-bet

<222> (1)..(33)

<400> 13

ccgtcagcag gctagctaca acgagtctcc gca 33

<210> 14

<211> 33

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> desoxirribozima td14 contra ARNm de T-bet

<222> (1)..(33)

<400> 14

tccccggcag gctagctaca acgacggctc ggt 33

<210> 15

<211> 33

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> desoxirribozima td15 contra ARNm de T-bet

<222> (1)..(33)

<400> 15

ccccgcgag gctagctaca acgagctcgt ccg 33

<210> 16

<211> 33

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> desoxirribozima td16 contra ARNm de T-bet

<222> (1)..(33)

<400> 16
gtagggagag gctagctaca acgacccagg ctg 33

<210> 17
<211> 33
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> desoxirribozima td17 contra ARNm de T-bet
<222> (1)..(33)

<400> 17
gggcgggcag gctagctaca acgacaaggc gcc 33

<210> 18
<211> 33
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> desoxirribozima td18 contra ARNm de T-bet
<222> (1)..(33)

<400> 18
cgggaaggag gctagctaca acgatcgccc gcg 33

<210> 19
<211> 33
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>

<221> desoxirribozima td19 contra ARNm de T-bet

<222> (1)..(33)

<400> 19

tagtcctcag gctagctaca acgagcggcc ccg 33

<210> 20

<211> 33

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> desoxirribozima td20 contra ARNm de T-bet

<222> (1)..(33)

<400> 20

tccccgacag gctagctaca acgactccag tcc 33

<210> 21

<211> 33

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> desoxirribozima td21 contra ARNm de T-bet

<222> (1)..(33)

<400> 21

tttccccgag gctagctaca acgaacctcc agt 33

<210> 22

<211> 33

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> desoxirribozima td22 contra ARNm de T-bet

<222> (1)..(33)

<400> 22

tgagcgcgag gctagctaca acgacctcag ttt 33

<210> 23

<211> 33

<212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> desoxirribozima td23 contra ARNm de T-bet
 <222> (1)..(33)

 <400> 23
 ggaccacaag gctagctaca acgaaggtgg ttg 33

 <210> 24
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> desoxirribozima td24 contra ARNm de T-bet
 <222> (1)..(33)

 <400> 24
 cttggaccag gctagctaca acgaaacagg tgg 33

 <210> 25
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> desoxirribozima td25 contra ARNm de T-bet
 <222> (1)..(33)

 <400> 25
 aaacttggag gctagctaca acgacacaac agg 33

 <210> 26
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>

<221> desoxirribozima td26 contra ARNm de T-bet

<222> (1)..(33)

<400> 26

ctgattaaag gctagctaca acgattggac cac 33

<210> 27

<211> 33

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> desoxirribozima td27 contra ARNm de T-bet

<222> (1)..(33)

<400> 27

tggtgctgag gctagctaca acgataaact tgg 33

<210> 28

<211> 33

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> desoxirribozima td28 contra ARNm de T-bet

<222> (1)..(33)

<400> 28

tgatgatcag gctagctaca acgactctgt ctg 33

<210> 29

<211> 33

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> desoxirribozima td29 contra ARNm de T-bet

<222> (1)..(33)

<400> 29

tggtgatgag gctagctaca acgacatctc tgt 33

<210> 30

<211> 33

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> desoxirribozima td30 contra ARNm de T-bet

<222> (1)..(33)

<400> 30

gcttggtgag gctagctaca acgagatcat ctc 33

<210> 31

<211> 33

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> desoxirribozima td31 contra ARNm de T-bet

<222> (1)..(33)

<400> 31

atgggaacag gctagctaca acgaccgccg tcc 33

<210> 32

<211> 33

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> desoxirribosima td32 contra ARNm de T-bet

<222> (1)..(33)

<400> 32

gaatgggaag gctagctaca acgaatccgc cgt 33

<210> 33

<211> 33

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> desoxirribosima td33 contra ARNm de T-bet

<222> (1)..(33)

<400> 33

tgacaggaag gctagctaca acgaggaac atc 33

<210> 34

<211> 33

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> desoxirribosima td34 contra ARNm de T-bet

<222> (1)..(33)

<400> 34
agtaaagtgag gctagctaca acgaaggaat ggg 33
<210> 35
<211> 33
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> desoxirribozima td35 contra ARNm de T-bet
<222> (1)..(33)

<400> 35
cacagtaaag gctagctaca acgagacagg aat 33

<210> 36
<211> 33
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> desoxirribozima td36 contra ARNm de T-bet
<222> (1)..(33)

<400> 36
gcccggccag gctagctaca acgaagtaaa tga 33

<210> 37
<211> 33
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> desoxirribozima td37 contra ARNm de T-bet

<222> (1)..(33)

<400> 37

ccacaaacag gctagctaca acgacctgta gtg 33

<210> 38

<211> 33

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> desoxirribozima td38 contra ARNm de T-bet

<222> (1)..(33)

<400> 38

gtccacaaag gctagctaca acgaatcctg tag 33

<210> 39

<211> 33

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> desoxirribozima td39 contra ARNm de T-bet

<222> (1)..(33)

<400> 39

ccacgtccag gctagctaca acgaaaacat cct 33

<210> 40

<211> 33

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> desoxirribozima td40 contra ARNm de T-bet

<222> (1)..(33)

<400> 40

ccaagaccag gctagctaca acgagtccac aaa 33

<210> 41

<211> 33

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> desoxirribozima td41 contra ARNm de T-bet

<222> (1).._(33)

<400> 41

ccaccaagag gctagctaca acgacacgtc cac 33

<210> 42

<211> 33

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> desoxirribozima td42 contra ARNm de T-bet

<222> (1)..(33)

<400> 42

gctgggtccag gctagctaca acgacaagac cac 33

<210> 43

<211> 33

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> desoxirribozima td43 contra ARNm de T-bet

<222> (1)..(33)

<400> 43

gctctggtag gctagctaca acgacgccag tgg 33

<210> 44

<211> 33

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> desoxirribozima td44 contra ARNm de T-bet

<222> (1)..(33)

<400> 44

ctgcacccag gctagctaca acgattgccg ctc 33

<210> 45

<211> 33

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> desoxirribozima td45 contra ARNm de T-bet

<222> (1)..(33)

<400> 45

cacactgcag gctagctaca acgaccactt gcc 33

<210> 46

<211> 33

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> desoxirribozima td46 contra ARNm de T-bet

<222> (1)..(33)

<400> 46

ctttccacag gctagctaca acgatgcacc cac 33

<210> 47

<211> 33

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> desoxirribozima td47 contra ARNm de T-bet

<222> (1)..(33)

<400> 47

gcctttccag gctagctaca acgaactgca ccc 33

<210> 48

<211> 33

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> desoxirribozima td48 contra ARNm de T-bet

<222> (1)..(33)

<400> 48

ttcctggcag gctagctaca acgagctgcc ctc 33

<210> 49

<211> 33

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> desoxirribozima td49 contra ARNm de T-bet

<222> (1).._(33)

<400> 49

gtggacgtag gctagctaca acgaaggcgg ttt 33

<210> 50

<211> 33

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> desoxirribozima td50 contra ARNm de T-bet

<222> (1)..(33)

<400> 50

ccgggtggag gctagctaca acgagtacag gcg 33

<210> 51

<211> 33

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> desoxirribozima td51 contra ARNm de T-bet

<222> (1)..(33)

<400> 51

cctggcgcag gctagctaca acgaccagtg cgc 33

<210> 52
<211> 33
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> desoxirribozima td52 contra ARNm de T-bet
<222> (1)..(33)

<400> 52
caaatgaaag gctagctaca acgattcctg gcg 33

<210> 53
<211> 33
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> desoxirribozima td53 contra ARNm de T-bet
<222> (1)..(33)

<400> 53
tttcccaaag gctagctaca acgagaaact tcc 33

<210> 54
<211> 33
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> desoxirribozima td54 contra ARNm de T-bet
<222> (1)..(33)

<400> 54
attggttgag gctagctaca acgagccccc ttg 33

<210> 55
<211> 33

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> desoxirribozima td55 contra ARNm de T-bet

<222> (1)..(33)

<400> 55

tgggtcacag gctagctaca acgatgttgg acg 33

<210> 56

<211> 33

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> desoxirribozima td56 contra ARNm de T-bet

<222> (1)..(33)

<400> 56

tctgggtcag gctagctaca acgaattggt gga 33

<210> 57

<211> 33

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> desoxirribozima td57 contra ARNm de T-bet

<222> (1)..(33)

<400> 57

gcacaatcag gctagctaca acgactgggt cac 33

<210> 58

<211> 33

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> desoxirribozima td58 contra ARNm de T-bet

<222> (1)..(33)

<400> 58

ggagcacaag gctagctaca acgacatctg ggt 33

<210> 59

<211> 33

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> desoxirribozima td59 contra ARNm de T-bet

<222> (1)..(33)

<400> 59

actggagcag gctagctaca acgaaatcat ctg 33

<210> 60

<211> 33

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> desoxirribozima td60 contra ARNm de T-bet

<222> (1)..(33)

<400> 60
atggagggag gctagctaca acgatggagc aca 33

<210> 61
<211> 33
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> desoxirribozima td61 contra ARNm de T-bet
<222> (1)..(33)

<400> 61
tggtagctag gctagctaca acgaggaggg act 33

<210> 62
<211> 33
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> desoxirribozima td62 contra ARNm de T-bet
<222> (1)..(33)

<400> 62
gggctggtag gctagctaca acgattatgg agg 33

<210> 63
<211> 33
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>

<221> desoxirribozima td63 contra ARNm de T-bet

<222> (1)..(33)

<400> 63

tcaacgatag gctagctaca acgagcagcc ggg 33

<210> 64

<211> 33

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> desoxirribozima td64 contra ARNm de T-bet

<222> (1)..(33)

<400> 64

cctcaacgag gctagctaca acgaatgcag ccg 33

<210> 65

<211> 33

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> desoxirribozima td65 contra ARNm de T-bet

<222> (1)..(33)

<400> 65

tcacctcaag gctagctaca acgagatatg cag 33

<210> 66

<211> 33

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> desoxirribozima td66 contra ARNm de T-bet

<222> (1)..(33)

<400> 66

cgtcggttcag gctagctaca acgactcaac gat 33

<210> 67

<211> 33

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> desoxirribozima td67 contra ARNm de T-bet

<222> (1)..(33)

<400> 67

gtaaagatag gctagctaca acgagcgtgt tgg 33

<210> 68

<211> 33

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> desoxirribozima td68 contra ARNm de T-bet

<222> (1)..(33)

<400> 68

aagtaaagag gctagctaca acgaatgcgt gtt 33

<210> 69
<211> 33
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> desoxirribozima td69 contra ARNm de T-bet
<222> (1)..(33)

<400> 69
ggcaatgaag gctagctaca acgatgggtt tct 33

<210> 70
<211> 33
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> desoxirribozima td70 contra ARNm de T-bet
<222> (1)..(33)

<400> 70
tcacggcaag gctagctaca acgagaactg ggt 33

<210> 71
<211> 33
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> desoxirribozima td71 contra ARNm de T-bet
<222> (1)..(33)

<400> 71
aggcagtcag gctagctaca acgaggcaat gaa 33

<210> 72

<211> 33

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> desoxirribozima td72 contra ARNm de T-bet

<222> (1)..(33)

<400> 72

atctcggcag gctagctaca acgatctggt agg 33

<210> 73

<211> 33

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> desoxirribozima td73 contra ARNm de T-bet

<222> (1)..(33)

<400> 73

gctgagtaag gctagctaca acgactcggc att 33

<210> 74

<211> 33

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> desoxirribozima td74 contra ARNm de T-bet

<222> (1)..(33)

<400> 74
tattatcaag gctagctaca acgatttcag ctg 33

<210> 75
<211> 33
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> desoxirribozima td75 contra ARNm de T-bet
<222> (1)..(33)

<400> 75
gggttattag gctagctaca acgacaattt tca 33

<210> 76
<211> 33
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> desoxirribozima td76 contra ARNm de T-bet
<222> (1)..(33)

<400> 76
aaggggtag gctagctaca acgatatcaa ttt 33

<210> 77
<211> 33
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>

<221> desoxirribozima td77 contra ARNm de T-bet
<222> (1)..(33)

<400> 77
ctcccggaag gctagctaca acgaccttg gca 33

<210> 78
<211> 33
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> desoxirribozima td78 contra ARNm de T-bet
<222> (1)..(33)

<400> 78
gtacatggag gctagctaca acgatcaaag ttc 33

<210> 79
<211> 2588
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> Local de ligação da td54
<222> (952)..(970)

<220>
<221> Local de ligação da td69
<222> (1096)..(1114)

<220>
<221> Local de ligação da td70

<222> (1100)..(1118)

<400> 79

```

cggcccgtg gagaggaagc ccgagagctg ccgcgcgcct gccggacgag ggcgtagaag      60
ccaggcgtca gagcccgggc tccgggtggg tccccaccc gccccctcggg tcccccgccc    120
cctgtccct gcccatccca gcccacgcga cctctctcgc cgccggagggg cgggtcctcg    180
acggctacgg gaaggtgcca gcccgccccg gatgggcacg gtggagccgg gttgcggaga    240
catgctgacg ggcaccgagc cgatgccggg gagcgcagag gcccgggcgc ctggcgccga    300
cccgcagcac cgctactctt acccggagcc gggcgcgcag gacgcggacg agcgtcgcgg    360
gggcggcagc ctggggtctc cctaccggg gggcgccttg gtgcccgcc cgccgagccg    420
cttccttga gcctacgcct acccggcgcg accccaggcg gccggcttcc ccggcgcggg    480
cgagtcctc ccgcgccccg cggacgcga gggctaccag ccgggcgagg gctacgccgc    540
cccggacccg cgcgccgggc tctaccggg gccgcgtgag gactacgcgc taccgcggg    600
actggaggtg tcgggaaac tgagggtcgc gctcaacaac cacctgtgt ggtccaagtt    660
taatcagcac cagacagaga tgatcatcac caagcagggg cggcggatgt tccattcct    720
gtcatttact gtggccgggc tggagccac cagccactac aggatgtttg tggacgtggt    780
cttggtgac cagcaccact ggcggtacca gagcggcaag tgggtgcagt gtgaaaggc    840
cgagggcagc atgccaggaa accgcctgta cgtccaccg gactccccca acacaggagc    900
gcactggatg cgcaggaag tttcatttgg gaaactaaag ctcaaaaca acaagggggc    960
gtccaacaat gtgaccaga tgattgtgct ccagtcctc cataagtacc agccccggt    1020
gcatacgtt gaggtgaacg acggagagcc agaggcagcc tgcaacgctt ccaacacgca    1080
tatcttact ttccaagaaa ccagttcat tgccgtgact gcctaccaga atgccgagat    1140
tactcagctg aaaattgata ataaccctt tgccaaagga ttccgggaga actttgagtc    1200
catgtacaca tctgtgaca ccagcatccc ctccccgct ggacccaact gtcaattcct    1260
tgggggagat cactactctc ctctcctacc caaccagtat cctgttccca gccgtteta    1320
ccccgacctt cctggccagg cgaaggatgt ggttccccag gcttactggc tgggggcccc    1380
ccgggaccac agctatgagg ctgagtttcg agcagtcagc atgaagcctg cattcttgcc    1440
ctctgcccc tggccccacca tgtctacta ccgaggccag gaggtcctgg cacctggagc    1500
tggctggcct gtggcaccac agtaccctcc caagatgggc ccggccagct ggttccgccc    1560
tatgcggact ctgccatgg aaccggccc tggaggctca gaggacggg gaccagagga    1620
ccagggtccc cccttgggtg ggactgagat tgccccatc cggccggaat ccagtgatc    1680
aggactgggc gaaggagact ctaagaggag gcgcgtgtcc ccctatcctt ccagtgggta    1740
cagctcctcc cctgctggg ccccttctc ttttgataag gaagctgaag gacagttta    1800
taactatttt cccaactgag cagatgacat gatgaaagga acagaaacag tgttattagg    1860
ttggaggaca ccgactaatt tgggaaacgg atgaaggact gagaaggccc ccgctcctc    1920
tggcccttct ctgtttagta gttggttggg gaagtggggc tcaagaagga ttttggggtt    1980
caccagatgc ttctggccc acgatgaaac ctgagagggg tgtcccttg cccatcctc    2040

```

```

tgccctaact acagtcgttt acctgggtgct gcgtcttgc tttggtttcc agctggagaa 2100
aagaagacaa gaaagtcttg ggcatagaagg agctttttgc atctagtggg tgggaggggt 2160
caggtgtggg acatgggagc aggagactcc actttcttcc tttgtacagt aactttcaac 2220
cttttcgttg gcatgtgtgt taatccctga tccaaaaaga acaaatacac gtatgttata 2280
accatcagcc cgccagggtc agggaaagga etcacctgac tttggacagc tggcctgggc 2340
tccccctgct caaacacagt ggggatcaga gaaaaggggc tggaaagggg ggaatggccc 2400
acatctcaag aagcaagata ttgtttgtgg tggttgtgtg tgggtgtgtg tttttcttt 2460
tttttcttt ttattttttt tgaatggggg aggcatttta ttgtactgag agtgggtgtct 2520
ggatatatcc cttttgtctt catcactttc tgaataaac ataaaactgt taaaaaaaaa 2580
aaaaaaaaa                                     2588

```

<210> 80

<211> 2450

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> mutação

<222> (134)..(134)

<220>

<221> mutação

<222> (310)..(310)

<220>

<221> Local de ligação da td54

<222> (952)..(970)

<220>

<221> Local de ligação da td69

<222> (1096)..(1114)

<220>

<221> Local de ligação da td70

<222> (1100)..(1118)

<220>

<221> mutação

<222> (1399)..(1399)

<220>

<221> mutação

<222> (1556)..(1556)

<400> 80

cgccccgctg	gagaggaagc	ccgagagctg	ccgcgcgcct	gccggacgag	ggcgtagaag	60
ccagggcgtca	gagccccggc	tccgggtggg	tccccaccc	ggccctcggg	tccccgecc	120
cctgctccct	gcctatccca	gccccgcga	ccctctcgcg	cgcgaggggg	cgggctctcg	180
acggctacgg	gaaggtgcca	gccccccccg	gatgggcatc	gtggagccgg	gttgccggaga	240
catgctgacg	ggcaccgagc	cgatgccggg	gagcgacgag	ggccgggcgc	ctggcgccga	300
cccgcagcag	cgctacttct	acccggagcc	gggcgcgcag	gacgcggacg	agcgtcgcgg	360
gggcggcagc	ctggggcttc	cttaccggg	gggcgccttg	gtgcccggcc	cgccgagccg	420
cttccttggg	gcctacgcct	acccgcgcg	accccaggcg	gccggcttcc	ccggcgcggg	480
cgagtccttc	ccgccgcccg	cggacgcgga	gggctaccag	ccgggcgagg	gctacgccgc	540
cccggacccg	cgcgccgggc	tctaccggg	gccgcgtgag	gactacgcgc	taccgcggg	600
actggagggtg	tcggggaaac	tgagggtcgc	gctcaacaac	cacctgttgt	ggtccaagtt	660
taatcagcac	cagacagaga	tgatcatcac	caagcagggg	cgccggatgt	tcccattcct	720
gtcatttact	gtggccgggc	tggagcccac	cagccactac	aggatgtttg	tggacgtggt	780
cttgggtggac	cagcaccact	ggcggtacca	gagcggcaag	tgggtgcagt	gtggaaaggc	840
cgagggcagc	atgccaggaa	accgcctgta	cgccaccgg	gactccccca	acacaggagc	900
gcactggatg	cgccaggaag	tttcatttgg	gaaactaaag	ctcacaaca	acaagggggc	960
gtccaacaat	gtgaccgaga	tgattgtgct	ccagtccttc	cataagtacc	agccccggct	1020
gcatatcgtt	gaggtgaacg	acggagagcc	agaggcagcc	tgcaacgctt	ccaacacgca	1080
tatctttact	ttccaagaaa	cccagttcat	tgccgtgact	gcctaccaga	atgccgagat	1140

tactcagctg	aaaattgata	ataacccctt	tgccaaagga	ttccgggaga	actttgagtc	1200
catgtacaca	tctgttgaca	ccagcatccc	ctccccgct	ggaccecaact	gtcaattcct	1260
tgggggagat	cactactctc	ctctcctacc	caaccagtat	cctgttccca	gccgcttcta	1320
ccccgacctt	cctggccagg	cgaaggatgt	ggttccccag	gcttactggc	tgggggcccc	1380
ccgggaccac	agctatgggg	ctgagtttcg	agcagtcagc	atgaagcctg	cattcttgcc	1440
ctctgcccc	gggcccacca	tgctactacta	ccgaggccag	gaggtectgg	cacctggagc	1500
tggctggcct	gtggcacccc	agtaccctcc	caagatgggc	ccggccagct	ggttcagccc	1560
tatgctgact	ctgcccattg	aacccggccc	tggaggctca	gagggacggg	gaccagagga	1620
ccaggtccc	cccttgggtg	ggactgagat	tgccccatc	cggccggaat	ccagtgatcc	1680
aggactgggc	gaaggagact	ctaagaggag	gcgcgtgtcc	ccctatcctt	ccagtgggtg	1740
cagctcctcc	cctgctgggg	ccccctctcc	tttgataag	gaagctgaag	gacagtttta	1800
taactatfff	cccaactgag	cagatgacat	gatgaaagga	acagaaacag	tgttattagg	1860
ttggaggaca	ccgactaatt	tgggaaacgg	atgaaggact	gagaaggccc	ccgctccctc	1920
tggcccttct	ctgtttagta	gttggttggg	gaagtggggc	tcaagaagga	ttttggggtt	1980
caccagatgc	ttcctggccc	acgatgaaac	ctgagagggg	tgcccccttg	ccccatcctc	2040
tgccctaact	acagtcgttt	acctggtgct	gcgtcttget	tttggtttcc	agctggagaa	2100
aagaagacaa	gaaagtcttg	ggcatgaagg	agctttttgc	atctagtggg	tgggaggggt	2160
caggtgtggg	acatgggagc	aggagactcc	actttcttcc	tttgtacagt	aactttcaac	2220
cttttcgitt	gcatgtgtgt	taatccctga	tccaaaaaga	acaaatacac	gtatgttata	2280
accatcagcc	cgccagggtc	agggaaagga	ctcacctgac	tttgacagc	tggcctgggc	2340
tccccctgct	caaacacagt	gggatcaga	gaaaaggggc	tggaaagggg	ggaatggccc	2400
acatctcaag	aagcaagata	ttgtttgtgg	tggttgtgtg	tgggtgtgtg		2450

Lisboa, 27 de Março de 2009

REIVINDICAÇÕES

1. Desoxirribozimas, caracterizadas por serem compostas por
 - um domínio catalítico com a sequência nucleotídica GGCTAGCTACAACGA ou com uma sequência modificada com uma acção biológica equiparável, que cliva o ARNm de T-bet em todos os pontos de ligação de purina-pirimidina a que esteja ligado,
 - um domínio de ligação do substrato direito, que se junta na extremidade 3' do domínio catalítico e
 - um domínio de ligação do substrato esquerdo que se junta à extremidade 5' do domínio catalítico, sendo os dois domínios de ligação de substrato por sua vez complementares a duas regiões do ARNm de T-bet, pelo que hibridizam com o ARNm,
 - serem activas *in vivo* e
 - conterem a sequência td69 GGCAATGAA GGCTAGCTACAACGA TGGGTTTCT ou a td70 TCACGGCAA GGCTAGCTACAACGA GAACTGGGT.
2. Desoxirribozimas de acordo com a reivindicação 1, caracterizadas por clivarem o domínio catalítico do ARNm do T-bet num local de ligação de purina-uracilo.
3. Desoxirribozimas de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizadas por estarem estabilizadas contra a decomposição no organismo, por meio da introdução de uma inversão 3'-3'.
4. Desoxirribozimas de acordo com as reivindicações 1 a 3,

caracterizadas por estarem estabilizadas contra a decomposição no organismo pela introdução de nucleótidos modificados ou de compostos nucleotídicos.

5. Desoxirribozimas de acordo com as reivindicações 1 a 4, caracterizadas por apresentarem, como modificação, uma timidina inversa na extremidade 3' e/ou uma marcação FAM na extremidade 5'.
6. Processo para a produção de um medicamento destinado ao tratamento de inflamações crónicas, caracterizado por
 - se determinar células-alvos, nas quais a expressão do ARNm do T-bet é maior do que nas células saudáveis do corpo,
 - se desenvolverem desoxirribozimas activas *in vivo* de acordo com a reivindicação 1, que se ligam ao ARNm de T-bet e o desactivam em termos funcionais,
 - se introduzir as desoxirribozimas activas *in vivo* em células-alvos e
 - se formular medicamentos que contêm as desoxirribozimas activas *in vivo*.
7. Medicamentos que contêm uma desoxirribozima de acordo com as reivindicações 2 a 5 e um veículo aceitável a nível farmacêutico.
8. Utilização de uma desoxirribozima de acordo com uma ou mais das reivindicações 1 a 5, na produção de um medicamento destinado ao tratamento de inflamações crónicas.
9. Utilização de uma desoxirribozima de acordo com uma ou

mais das reivindicações 1 a 5, na produção de um medicamento para a inibição específica da expressão do T-bet em células-alvos de doentes, tendo em vista o tratamento de inflamações crónicas.

Lisboa, 27 de Março de 2009

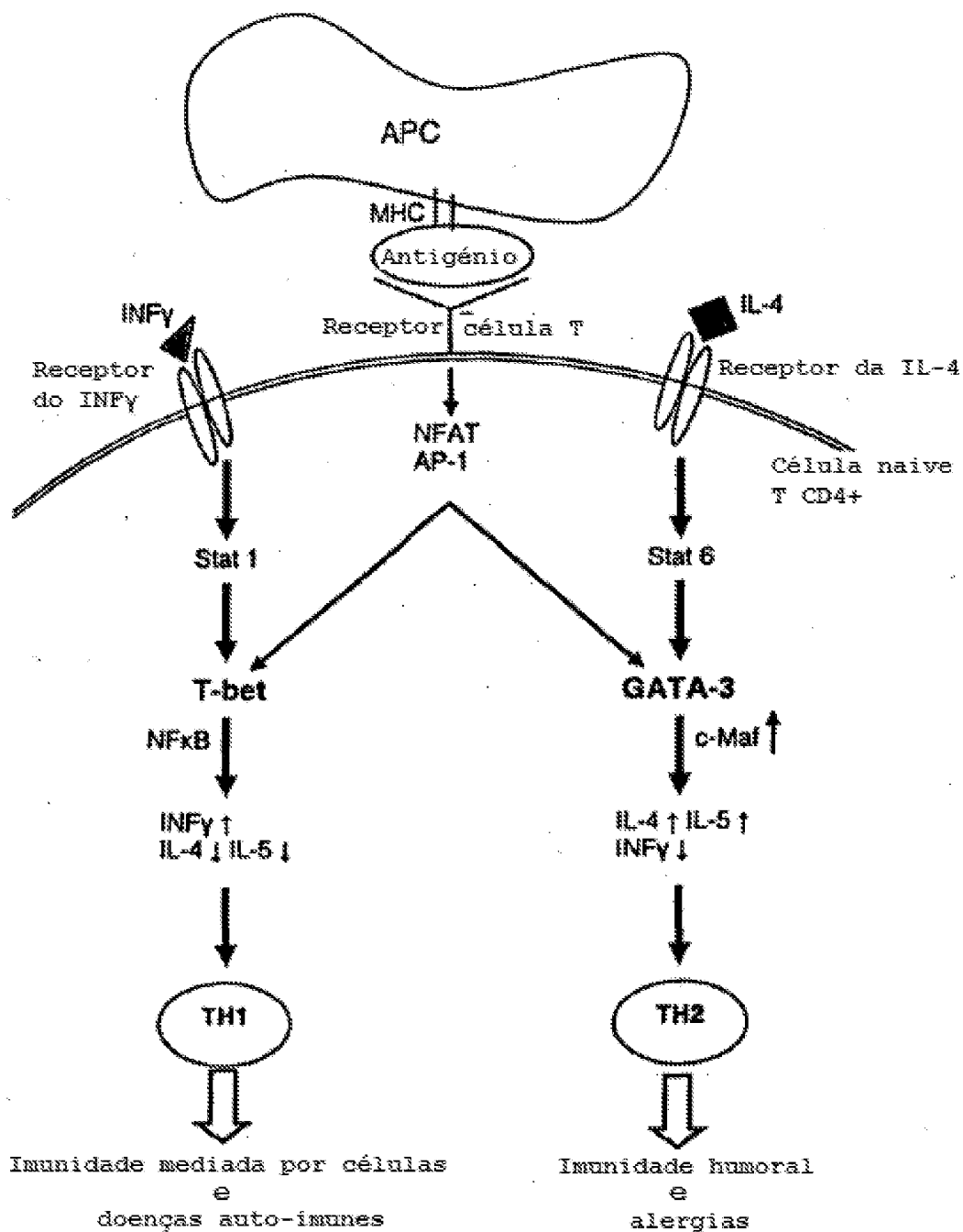


Fig. 1

Fig. 3

Nome	Sequência da desoxirribozima
td1	TGGCTTCTAggctagctacaacgaGCCCCGTC
td2	GGCTCTGAggctagctacaacgaCCCTGGCTT
td3	GGACCCCAggctagctacaacgaCGGAGCCCCG
td4	GGTGGGGCAggctagctacaacgaCCCACCGGA
td5	GGCGGGCAggctagctacaacgaCCGAGGGCC
td6	GGGCTGGCAggctagctacaacgaGGGCAGGGA
td7	CGTCGAGCAggctagctacaacgaCCGCCCTC
td8	GGGCTGGCAggctagctacaacgaCTTCCCGTA
td9	CGATGCCCAggctagctacaacgaCCGGGGCGG
td10	GCTCCACCAggctagctacaacgaGCCCCATCG
td11	CCGGCTCCAggctagctacaacgaGATGCCCAT
td12	TCTCCGCAAggctagctacaacgaCCGGCTCCA
td13	CCCTCAGCAggctagctacaacgaGTCTCCGCA
td14	TCCCCGGCAggctagctacaacgaCGGCTCGGT
td15	CCCCCGCAggctagctacaacgaGCTCGTCCG
td16	GTAGGGAGAggctagctacaacgaCCCAGGCTG
td17	GGGCGGGCAggctagctacaacgaCAAGGCGCC
td18	CGGGAAGCAggctagctacaacgaTCGCCCGCG
td19	TAGTCTCAggctagctacaacgaGCGGCCCCG
td20	TCCCGACAaggctagctacaacgaCTCCAGTCC
td21	TTTCCCCAaggctagctacaacgaACCTCCAGT
td22	TGAGCCCAaggctagctacaacgaCCTCAGTTF
td23	GGACCACAaggctagctacaacgaAGGTGGTGT
td24	CTTGGACCAggctagctacaacgaAACAGGTGG
td25	AACTTGGCAggctagctacaacgaCACACACGG
td26	CTGATTAAGgctagctacaacgaTTGGACCAC
td27	TGGTCTGAggctagctacaacgaTAANCTTGG
td28	TGATGATCAggctagctacaacgaCTCTGTCTG
td29	TGGTATGCAggctagctacaacgaCATCTCTGT
td30	GCTTGGTGAaggctagctacaacgaGATCATCTC
td31	ATGGGAACAaggctagctacaacgaCCGCCCTCC
td32	GAATGGGAaggctagctacaacgaATCCGCCGT
td33	TGACAGGAaggctagctacaacgaGGGAACATC
td34	AGTAAATGAaggctagctacaacgaAGGAATGGG
td35	CACAGTAAAggctagctacaacgaGACAGGAAT
td36	GCCCCGCCaggctagctacaacgaAGTAAATGA
td37	CCACAAACAaggctagctacaacgaCCTGTAGTG
td38	GTCCACAAAggctagctacaacgaATCCTGTAG
td39	CCACGTCCAaggctagctacaacgaAAACATCCT
td40	CCAAGACCAggctagctacaacgaGTCCACAAA
td41	CCACCAAGAggctagctacaacgaCACGTCCAC
td42	GCTGGTCCAaggctagctacaacgaCAAGACCAC
td43	GCTCTGGTAggctagctacaacgaCGCCAGTGG
td44	CTGCACCCAggctagctacaacgaTTGCCGCTC
td45	CACACTGCAggctagctacaacgaCCACTTGCC
td46	CFTTCCACAaggctagctacaacgaTGCACCCAC
td47	GCCFTTCCAaggctagctacaacgaACTGCACCC
td48	TTCTTGGCAggctagctacaacgaGCTGCCCTC

Nome	Sequência da desoxirribose
TD49	GTGGACGTAggctagctacaacgaAGGCGGTTT
TD50	CCGGGTGGAggctagctacaacgaGTACAGGCG
TD51	CCTGGGCGAggctagctacaacgaCCAGTGCGC
TD52	CAAATCAAAGgctagctacaacgaTTCCTGGCG
TD53	TTTCCCAAAGgctagctacaacgaGAAACTTCC
TD54	ATTGTTGGAggctagctacaacgaGCCCCCTTG
TD55	TGGGTCACAggctagctacaacgaTGTTGGACG
TD56	TCTGGGTCAggctagctacaacgaATTGTTGGA
TD57	GCACAATCAGgctagctacaacgaCTGGGTCAC
TD58	GGAGCACAAGgctagctacaacgaCATCTGGGT
TD59	ACTGGAGCAGgctagctacaacgaAATCATCTG
TD60	ATGGAGGGAggctagctacaacgaTGGAGCACA
TD61	TGGTACTTAggctagctacaacgaGGAGGGACT
TD62	GGGCTGGTAggctagctacaacgaTTATGGAGG
TD63	TCAACGATAggctagctacaacgaGCAGCCGGG
TD64	CCTCAACGAggctagctacaacgaATGCAGCCG
TD65	TCACCTCAAggctagctacaacgaGATATGCAG
TD66	CGTCGGTTCAggctagctacaacgaCTCAACGAT
TD67	GTAAGATAggctagctacaacgaGCGTGFTTG
TD68	AAGTAAAGAggctagctacaacgaATGCCTGTT
TD69	GGCAATGAAGgctagctacaacgaTGGGTTTCT
TD70	TCACGGCAAggctagctacaacgaGAACTGGGT
TD71	AGSCAGTCAggctagctacaacgaGGCAATGAA
TD72	ATCTCGGCAGgctagctacaacgaTCTGGTAGG
TD73	GCTGAGTAAggctagctacaacgaCTCGGCATT
TD74	TATTATCAAggctagctacaacgaTTTCAGCTG
TD75	GGTTATTAggctagctacaacgaCAATTTTCA
TD76	AAGGGTTAggctagctacaacgaTATCAATTF
TD77	CTCCCGCAAggctagctacaacgaCCTTTCGCA
TD78	GTACATGGAggctagctacaacgaTCAAAGTTC

Fig. 4

Alinhamentos de seqüências múltiplas T-bet

Seq_1	1	CCGCCCCCTGTGAGAGGAAAGCCGAGAGGCTGCCGCGCGGCTGCGCGGACGAGGGCCCTAGAGG	68
Seq_2	1	CGGCCCCCTGTGAGAGGAAAGCCGAGAGGCTGCCGCGCGGCTGCGCGGACGAGGGCCCTAGAGG	68
Seq_1	61	CCAGGCGCTCAGAGGCCCCGGCTCCGCTGCGGCTCCGACCCGCGGCTCCGCTCCGCGGCTCCGCGG	120
Seq_2	61	CCAGGCGCTCAGAGGCCCCGGCTCCGCTGCGGCTCCGACCCGCGGCTCCGCTCCGCGGCTCCGCGG	120
Seq_1	121	CCCTGCTCCTTCCGCTTCCGACGCGCACGCGACCCCTCTCCGCGCGGAGCGGCGGCTCCGCTCCG	180
Seq_2	121	CCCTGCTCCTTCCGCTTCCGACGCGCACGCGACCCCTCTCCGCGCGGAGCGGCGGCTCCGCTCCG	180
Seq_1	181	ACGCGCTACGCGGAGGCTCCGACGCGCACGCGACCCCTCTCCGCGCGGAGCGGCGGCTCCGCTCCG	240
Seq_2	181	ACGCGCTACGCGGAGGCTCCGACGCGCACGCGACCCCTCTCCGCGCGGAGCGGCGGCTCCGCTCCG	240
Seq_1	241	CATGCTGAGCGGCGCACGCGACGCGCACGCGACCCCTCTCCGCGCGGAGCGGCGGCTCCGCTCCG	300
Seq_2	241	CATGCTGAGCGGCGCACGCGACGCGCACGCGACCCCTCTCCGCGCGGAGCGGCGGCTCCGCTCCG	300
Seq_1	301	CCCGCGGAGGCTCCGACGCGCACGCGACCCCTCTCCGCGCGGAGCGGCGGCTCCGCTCCG	360
Seq_2	301	CCCGCGGAGGCTCCGACGCGCACGCGACCCCTCTCCGCGCGGAGCGGCGGCTCCGCTCCG	360
Seq_1	361	GGCGCGGAGGCTCCGACGCGCACGCGACCCCTCTCCGCGCGGAGCGGCGGCTCCGCTCCG	420
Seq_2	361	GGCGCGGAGGCTCCGACGCGCACGCGACCCCTCTCCGCGCGGAGCGGCGGCTCCGCTCCG	420
Seq_1	421	CTTCTTGGAGGCTACGCGCTACGCGCACGCGACCCCTCTCCGCGCGGAGCGGCGGCTCCGCTCCG	480
Seq_2	421	CTTCTTGGAGGCTACGCGCTACGCGCACGCGACCCCTCTCCGCGCGGAGCGGCGGCTCCGCTCCG	480
Seq_1	481	CGAGGCTTCCGCGCGGAGGCTCCGACGCGCACGCGACCCCTCTCCGCGCGGAGCGGCGGCTCCG	540
Seq_2	481	CGAGGCTTCCGCGCGGAGGCTCCGACGCGCACGCGACCCCTCTCCGCGCGGAGCGGCGGCTCCG	540
Seq_1	541	CCCGGAGGCTCCGACGCGCACGCGACCCCTCTCCGCGCGGAGCGGCGGCTCCGCTCCG	600
Seq_2	541	CCCGGAGGCTCCGACGCGCACGCGACCCCTCTCCGCGCGGAGCGGCGGCTCCGCTCCG	600
Seq_1	601	ACTGCGGAGGCTCCGACGCGCACGCGACCCCTCTCCGCGCGGAGCGGCGGCTCCGCTCCG	660
Seq_2	601	ACTGCGGAGGCTCCGACGCGCACGCGACCCCTCTCCGCGCGGAGCGGCGGCTCCGCTCCG	660
Seq_1	661	TAATCAGGAGGCTCCGACGCGCACGCGACCCCTCTCCGCGCGGAGCGGCGGCTCCGCTCCG	720
Seq_2	661	TAATCAGGAGGCTCCGACGCGCACGCGACCCCTCTCCGCGCGGAGCGGCGGCTCCGCTCCG	720
Seq_1	721	GTCATTACTTCCGCGCGGAGGCTCCGACGCGCACGCGACCCCTCTCCGCGCGGAGCGGCGGCT	780
Seq_2	721	GTCATTACTTCCGCGCGGAGGCTCCGACGCGCACGCGACCCCTCTCCGCGCGGAGCGGCGGCT	780
Seq_1	781	CTTCTTGGAGGCTACGCGCTACGCGCACGCGACCCCTCTCCGCGCGGAGCGGCGGCTCCGCT	840
Seq_2	781	CTTCTTGGAGGCTACGCGCTACGCGCACGCGACCCCTCTCCGCGCGGAGCGGCGGCTCCGCT	840
Seq_1	841	CGAGGCTTCCGCGCGGAGGCTCCGACGCGCACGCGACCCCTCTCCGCGCGGAGCGGCGGCT	900
Seq_2	841	CGAGGCTTCCGCGCGGAGGCTCCGACGCGCACGCGACCCCTCTCCGCGCGGAGCGGCGGCT	900
Seq_1	901	GCACTGAGGCTCCGCGCGGAGGCTCCGACGCGCACGCGACCCCTCTCCGCGCGGAGCGGCGGCT	960
Seq_2	901	GCACTGAGGCTCCGCGCGGAGGCTCCGACGCGCACGCGACCCCTCTCCGCGCGGAGCGGCGGCT	960
Seq_1	961	GTCCAAAGATGCGGAGGCTCCGACGCGCACGCGACCCCTCTCCGCGCGGAGCGGCGGCT	1020
Seq_2	961	GTCCAAAGATGCGGAGGCTCCGACGCGCACGCGACCCCTCTCCGCGCGGAGCGGCGGCT	1020
Seq_1	1021	GCACTGAGGCTCCGCGCGGAGGCTCCGACGCGCACGCGACCCCTCTCCGCGCGGAGCGGCGGCT	1080
Seq_2	1021	GCACTGAGGCTCCGCGCGGAGGCTCCGACGCGCACGCGACCCCTCTCCGCGCGGAGCGGCGGCT	1080
Seq_1	1081	TACTGAGGCTCCGCGCGGAGGCTCCGACGCGCACGCGACCCCTCTCCGCGCGGAGCGGCGGCT	1140
Seq_2	1081	TACTGAGGCTCCGCGCGGAGGCTCCGACGCGCACGCGACCCCTCTCCGCGCGGAGCGGCGGCT	1140
Seq_1	1141	TACTGAGGCTCCGCGCGGAGGCTCCGACGCGCACGCGACCCCTCTCCGCGCGGAGCGGCGGCT	1200
Seq_2	1141	TACTGAGGCTCCGCGCGGAGGCTCCGACGCGCACGCGACCCCTCTCCGCGCGGAGCGGCGGCT	1200
Seq_1	1201	CATGCTGAGGCTCCGCGCGGAGGCTCCGACGCGCACGCGACCCCTCTCCGCGCGGAGCGGCGGCT	1260
Seq_2	1201	CATGCTGAGGCTCCGCGCGGAGGCTCCGACGCGCACGCGACCCCTCTCCGCGCGGAGCGGCGGCT	1260
Seq_1	1261	TGGCGGAGGCTCCGCGCGGAGGCTCCGACGCGCACGCGACCCCTCTCCGCGCGGAGCGGCGGCT	1320
Seq_2	1261	TGGCGGAGGCTCCGCGCGGAGGCTCCGACGCGCACGCGACCCCTCTCCGCGCGGAGCGGCGGCT	1320
Seq_1	1321	CCCGGAGGCTCCGACGCGCACGCGACCCCTCTCCGCGCGGAGCGGCGGCTCCGCTCCG	1380
Seq_2	1321	CCCGGAGGCTCCGACGCGCACGCGACCCCTCTCCGCGCGGAGCGGCGGCTCCGCTCCG	1380
Seq_1	1381	CCCGGAGGCTCCGACGCGCACGCGACCCCTCTCCGCGCGGAGCGGCGGCTCCGCTCCG	1440
Seq_2	1381	CCCGGAGGCTCCGACGCGCACGCGACCCCTCTCCGCGCGGAGCGGCGGCTCCGCTCCG	1440

Seq_1	1441	CCTCGCCCTTGGG <u>CCACCATGTCCTACTACCT</u> AGGCCAGSAGGTCTGSCACCTGGAGC	1500
Seq_2	1441	CCTCGCCCTTGGG <u>CCACCATGTCCTACTACCT</u> AGGCCAGSAGGTCTGSCACCTGGAGC	1500
Seq_1	1501	TGGCTGGCTCTGGCACCCCAATACCTCCGAGATGGGCCCGCCAGCTGGTTG <u>GGCC</u>	1560
Seq_2	1501	TGGCTGGCTCTGGCACCCCAATACCTCCGAGATGGGCCCGCCAGCTGGTTG <u>GGCC</u>	1560
Seq_1	1561	TATGGGACTCTGCCCATGGAA <u>CCCGCCCTGGAAGCTCAGAGGGACGGGACCAGAGGA</u>	1620
Seq_2	1561	TATGGGACTCTGCCCATGGAA <u>CCCGCCCTGGAAGCTCAGAGGGACGGGACCAGAGGA</u>	1620
Seq_1	1621	CCAGGCTGCCCG <u>CTGGCTGGACTGAGATTC</u> CCCCATCGGCCCGGAATCCAGTCAATC	1680
Seq_2	1621	CCAGGCTGCCCG <u>CTGGCTGGACTGAGATTC</u> CCCCATCGGCCCGGAATCCAGTCAATC	1680
Seq_1	1681	AGGACTGGGCGAAGGAGACTCTAAGAGAGAGCGCCCTGTCCDCCATCTCTCCAGTGGTGA	1740
Seq_2	1681	AGGACTGGGCGAAGGAGACTCTAAGAGAGAGCGCCCTGTCCDCCATCTCTCCAGTGGTGA	1740
Seq_1	1741	CAGCTCCCTCCCTGCTGGGGCCCTCTCTCCTTTTGATAAGGAACTGAAGGACAGTTTTA	1800
Seq_2	1741	CAGCTCCCTCCCTGCTGGGGCCCTCTCTCCTTTTGATAAGGAACTGAAGGACAGTTTTA	1800
Seq_1	1801	TAACTATTTTCCAACTGAGCAGATGACATGATGAAAGGACAGAAACAGTGTATTAGG	1860
Seq_2	1801	TAACTATTTTCCAACTGAGCAGATGACATGATGAAAGGACAGAAACAGTGTATTAGG	1860
Seq_1	1861	TTGGAGGACACCGACTAAATTTGGGAACGGATGAAGGACTGAGAGGCCCCCGCTCCCTC	1920
Seq_2	1861	TTGGAGGACACCGACTAAATTTGGGAACGGATGAAGGACTGAGAGGCCCCCGCTCCCTC	1920
Seq_1	1921	TGGCCCTTCTCTGTTAGTACTTGGTGGGGAAGTGGGCTCAGAAAGGATTTTGGGGTT	1980
Seq_2	1921	TGGCCCTTCTCTGTTAGTACTTGGTGGGGAAGTGGGCTCAGAAAGGATTTTGGGGTT	1980
Seq_1	1981	CACCAGATGCTTCTGGGCCACGATGAAACCTGAGAGGGGTGTCCDCTTTCGCCATGCTC	2040
Seq_2	1981	CACCAGATGCTTCTGGGCCACGATGAAACCTGAGAGGGGTGTCCDCTTTCGCCATGCTC	2040
Seq_1	2041	TGCCCTAACTACAGTGGTAACTGCTGCTCTCCCTCTTGGCTTTTGGTTTCAGCTGGAGAA	2100
Seq_2	2041	TGCCCTAACTACAGTGGTAACTGCTGCTCTCCCTCTTGGCTTTTGGTTTCAGCTGGAGAA	2100
Seq_1	2101	AAGAAGACAAAGAAAGCTTGGGCAAGAGGAGCTTTTTCATCTAGTGGTGGGAGGGGT	2160
Seq_2	2101	AAGAAGACAAAGAAAGCTTGGGCAAGAGGAGCTTTTTCATCTAGTGGTGGGAGGGGT	2160
Seq_1	2161	CAGGTGTGGGACATGGGAGCAGGAGACTCCACTTTCTCTCTTGTACAGTAACCTTCAAC	2220
Seq_2	2161	CAGGTGTGGGACATGGGAGCAGGAGACTCCACTTTCTCTCTTGTACAGTAACCTTCAAC	2220
Seq_1	2221	CTTTTCGTTGGCATGTGTGTAAATCCCTGATCCAAAAGAACAAATACAGGTATGTTATA	2280
Seq_2	2221	CTTTTCGTTGGCATGTGTGTAAATCCCTGATCCAAAAGAACAAATACAGGTATGTTATA	2280
Seq_1	2281	ACCATCAACCCCGCCAGGCTCAGGGAAAGGACTCACCTGACTTTGGACAGCTGGCCCTGGGC	2340
Seq_2	2281	ACCATCAACCCCGCCAGGCTCAGGGAAAGGACTCACCTGACTTTGGACAGCTGGCCCTGGGC	2340
Seq_1	2341	TCCCCCTGCTCAAAACAGCTGGGATCAGAGAAAAGGGCTGGAAAAGGGGGATGGCCC	2400
Seq_2	2341	TCCCCCTGCTCAAAACAGCTGGGATCAGAGAAAAGGGCTGGAAAAGGGGGATGGCCC	2400
Seq_1	2401	ACATCTCAAGAGCAGAGATATGTTTGTGGTGGTGTGTGTGGTGTGTGTGTGTGTGTGT	2460
Seq_2	2401	ACATCTCAAGAGCAGAGATATGTTTGTGGTGGTGTGTGTGGTGTGTGTGTGTGTGTGT	2460
Seq_1	2461	TTCTTTCCTTTTATTTTGTGAATGGGGAGGCTATTTATTTACTGAGAGTGGTGTCT	2520
Seq_2	****	-----	****
Seq_1	2521	GGATATATTCCTTTTGTCTTTCATCACTTCTGAAAATAAACATAAAAACCTTTAAAAAAA	2580
Seq_2	****	-----	****
Seq_1	2581	AAAAAAAA	2580
Seq_2	****	-----	****

Fig. 4A

CGGCCCGCTGGAGAGGAAGCCCCGAGAGCTGCCGCGCGCCTGCCGGACGAG
 GGCGTAGAAGCCAGGCGTCAGAGCCCCGGGCTCCGGTGGGGTCCCCACCC
 GGCCCTCGGGTCCCCGCCCCCTGCTCCCTGCCATCCCAGCCCACGCGA
 CCCTCTCGCGCGCGGAGGGGCGGGTCTCGACGGCTACGGGAAGGTGCCA
 GCCCCCCCCGGATGGGCATCGTGGAGCCGGGTGCGGAGACATGCTGACG
 GGCACCGAGCCGATGCCGGGGAGCGACGAGGGCCGGGCGCCTGGCGCCGA
 CCCGACACCCGCTACTTCTACCCGGAGCCGGGCGCGCAGGACGCGGACG
 AGCGTCGCGGGGGCGCAGCCTGGGGTCTCCCTACCCGGGGGGCGCCTTG
 GTGCCCGCCCCGCGAGCCGCTTCTTGGAGCCTACGCCTACCCGCCGCG
 ACCCCAGGCGGGCGGCTTCCCCGGCGCGGGCGAGTCCCTTCCCGCCGCCCG
 CGGACGCCGAGGGCTACCAGCCGGGCGAGGGCTACGCCGCCCGGACCCCG
 CGCGCCGGGCTCTACCCGGGGCCGCGTGAGGACTACGCGCTACCCGCGGG
 ACTGGAGGTGTGGGGAACTGAGGGTCCGCTCAACAACCACCTGTTGT
 GGTCCAAGTTAATCAGCACCAGACAGAGATGATCATCACCAAGCAGGGA
 CGGCGGATGTTCCATTCTGTCAATTTACTGTGGCCGGGCTGGAGCCCAC
 CAGCCACTACAGGATGTTTGTGGACGTGGTCTTGGTGGACCAGCACCCT
 GCGGTACCAGAGCGCAAGTGGGTGCAGTGTGGAAAGGCCGAGGGCAGC
 ATGCCAGGAAACCGCCTGTACGTCCACCCGGACTCCCCAACACAGGAGC
 GCACTGGATGCCCCAGGAAGTTTCATTTGGGAACTAAAGCTCACAACA
 ACAAGGGGGCGTCEAACAATGTGACCCAGATGATTGTGCTCCAGTCCCTC
 CATAAGTACCAGCCCCGGCTGCATATCGTTGAGGTGAACGACGGAGAGCC
 AGAGGCAGCCTGCAACGCTTCCAACACGCATATCTTACTTCCAAGAAA
 CCCAGTTCATTGCCGTGACTGCCTACCAGAATGCCGAGATTACTCAGCTG
 AAAATTGATAATAACCCCTTTGCCAAAGGATTCGGGAGAACTTTGAGTC
 CACTACACACTCTGACACCAGCAACCCTCCCCGCTGGACCCAACCT
 CCAATTCCTTGGGGGAGCACTACTCTCCTCTCCTACCCAACCACT
 CCTTCCCAGCCGCTTCTACCCCGACCTTCCTGGCCAGGCGAAGGATGT
 GCTCCCCAGGCTTACTGGCTGGGGGCCCCCGGGACCACAGCTTGGAGG
 CTGAGTTCGAGCACTCAGCGAAGCCTGCCTTCTTGCCTCTGCCCT
 GGGCCACCTGCTCCTACTACCGAGGCCAGGAGTCTTGGCACCTGGAGC
 TGGCTGGCCTGGCACCCCAACCCCTCCAAGTGGGCCCGGCCAGCT
 GCTCCGCCCTGCGGACTCTGCCCGGAACCCGGCCCTGGAGGCTCA
 GAGGACGGGGACCAGAGGACCAGGCTCCCCCTTGGCTGGACTGAGT
 TGCCCCCTCCGGCCGGATCCACTGATTCAGGACTGGCGGAGGAGACT
 CTAAGAGGAGGCGCTGCCCTTCTTCCACTGGGACAGCTCCTCC
 CCTGCTGGGGCCCCCTTCTCCTTTGTAAGGAAGCTGAAGGACAATTT
 TAACTTTTCCCAACTGAGCAGAGGACGATGAAAGGAACAGAAACA
 TTTTAGCTTGGAGGACACCGACTAATTTGGGAAACGGTGAAGGACT
 GAGAAGGCCCCCGCTCCCTCTGGCCCTTCTCTTTTAACTAGTGGTGGG
 GAAAGGGGCTCAAGAAGGATTTGGGCTCACCAGAGCTTCTGGCCC
 ACGTGAACCTGAGAGGGGCTCCCTTGCCTTCTCTGCCCCCTACT
 ACACTTACCTGCTGCTCTTGGCTTTGCTTCCAGCTGGAGAA
 AAGAAGACAAGAACTCTTGGGCATGAAGGAGCTTTTTGCTACTAGG
 GGGAGGGTCACTCTGGGACGGGAGCAGGAGACTCCACTTCTTCC
 TTTACAATACTTTCAACCTTTCTTGGCTGGCTTAACTCCCTG
 TCCAAAAGAACAATACACTATTAACCAACAGCCCCGACGGCTC
 AGGGAAGGACTCACCTGACTTTGGACAGCTGGCCTGGGCTCCCCCTGCT
 CAAACACAAGGGGACAGAGAAAAGGGGCTGGAAAGGGGGGAAGGCC
 ACTCAAGAAGCAAGTTTCTTCTGCTCTGCTGGCTGGCTGGCTGGCT
 TTTTCTTTTCTTTCTTTTATTTTTTTGAATGGGGGAGGCTATTT
 TCTACTGAGAAGCTCTGGATATCTCTTTTCTTCTCACTTTC
 TGAAATAACAATAACTTAAAAA

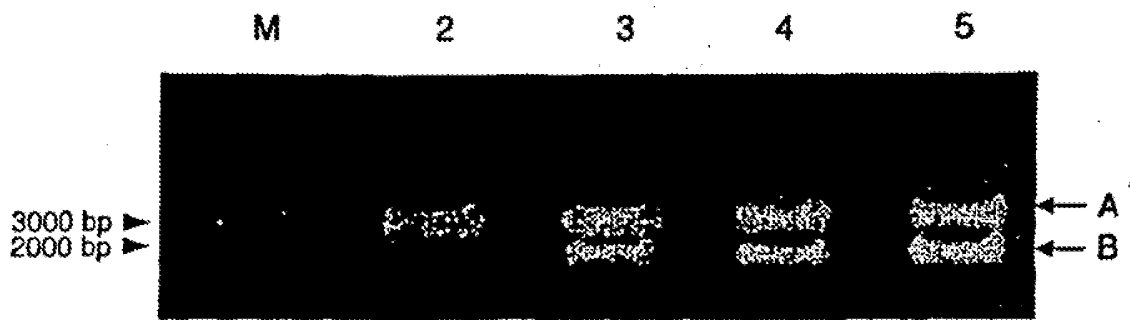


Fig. 5

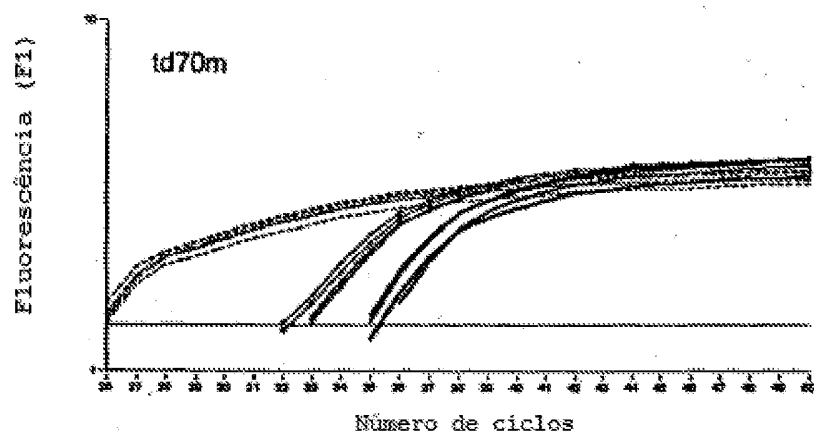
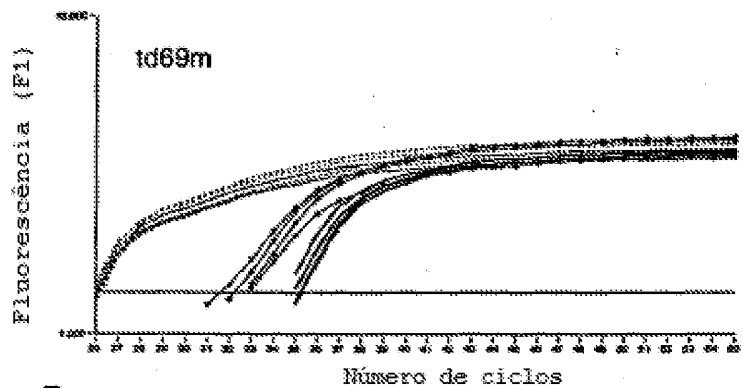
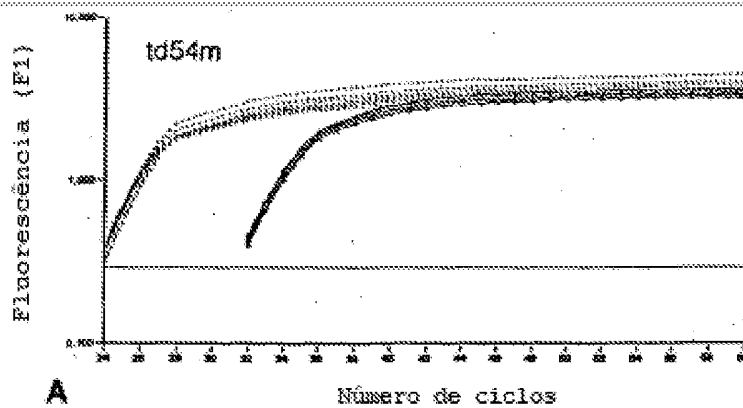


Fig. 6

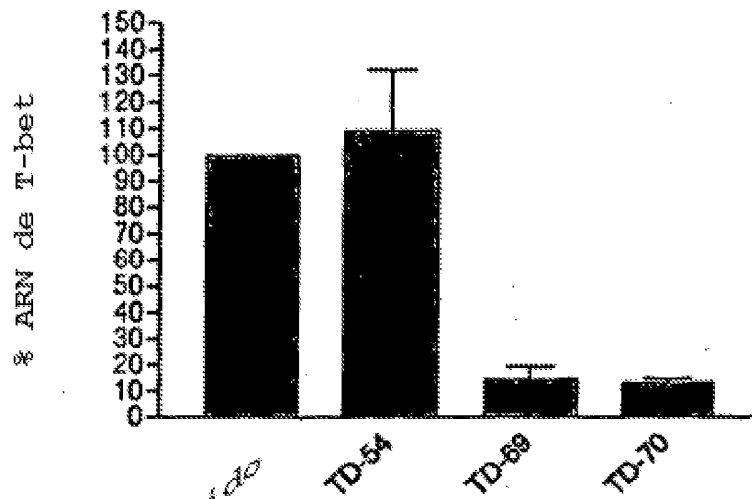


Fig. 7

Desoxirribosima sem sentido