



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

(21) BR 112020018705-4 A2



(22) Data do Depósito: 14/03/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 05/01/2021

(54) Título: INIBIDORES DE MICRORNA 22

(51) Int. Cl.: C12N 15/113; C12N 15/11; A61K 31/713.

(30) Prioridade Unionista: 14/03/2018 US 62/642.934.

(71) Depositante(es): BETH ISRAEL DEACONESS MEDICAL CENTER; AALBORG UNIVERSITY.

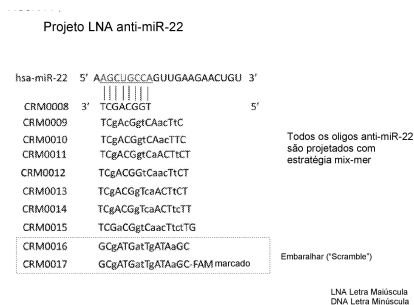
(72) Inventor(es): PIER PAOLO PANDOLFI; RICCARDO PANELLA; SAKARI KAUPPINEN; ANDREAS PETRI.

(86) Pedido PCT: PCT US2019022351 de 14/03/2019

(87) Publicação PCT: WO 2019/178411 de 19/09/2019

(85) Data da Fase Nacional: 14/09/2020

(57) Resumo: A presente divulgação fornece composições e métodos que inibem a atividade de microRNAs, por exemplo miR-22.



“INIBIDORES DE MICRORNA 22”**PRIORIDADE**

[0001] Este pedido reivindica o benefício de prioridade ao Pedido Provisório US Nº 62/642.934, depositado em 14 de março de 2018, cujo conteúdo está incorporado por referência neste documento na sua totalidade.

CAMPO DE APLICAÇÃO

[0002] A divulgação se refere aos agentes que modulam a atividade ou expressão de microRNAs.

DESCRIÇÃO DO ARQUIVO DE TEXTO ENVIADO ELETRONICAMENTE

[0003] O conteúdo do arquivo de texto enviado eletronicamente em anexo é incorporado a este documento por referência na sua totalidade: Uma cópia em formato legível por computador da Listagem de Sequência (nome do arquivo: BID-005PC2_ST25.txt, Data do registro: 14 de março de 2019, tamanho do arquivo: 2.976 kilobytes).

FUNDAMENTOS

[0004] MicroRNAs (miRNA ou miR) são moléculas de ácido nucleico que regulam a expressão de genes alvo. MiRNAs são tipicamente curtos (tipicamente 18-24 nucleotídeos) e agem como repressores de mRNAs alvo, promovendo sua degradação, quando suas sequências são perfeitamente complementares, e/ou inibindo a tradução, quando suas sequências contêm incompatibilidades. As análises funcionais de miRNAs revelaram que esses pequenos RNAs não codificantes contribuem para diferentes processos fisiológicos e metabólicos, incluindo genes reguladores associados a várias doenças ou distúrbios.

[0005] Como tal, há uma necessidade de composições e métodos que regulem miRs.

SUMÁRIO

[0006] A presente divulgação fornece novas composições e métodos para inibir miR-22, por exemplo, inibindo a expressão e/ou atividade de

microRNA. Tal inibição pode ser mediada por oligonucleotídeos quimicamente modificados de sequência específica, incluindo, por exemplo, ácido nucleico bloqueado (LNA).

[0007] Em um aspecto, a presente invenção fornece uma composição inibidora de miR-22. A composição compreende um ácido nucleico com uma sequência compreendendo tggcagct (SEQ ID NO: 2) e compreendendo pelo menos uma modificação de ácido nucleico bloqueado (LNA).

[0008] Em modalidades, o ácido nucleico compreende modificações de LNA nas posições 7 e 8 de tggcagct (SEQ ID NO: 2). Em modalidades, o ácido nucleico compreende cerca de 8 a cerca de 12 modificações de LNA. Em modalidades, o ácido nucleico compreende não menos que 4 modificações de LNA. Em modalidades, o ácido nucleico compreende não mais do que quatro modificações sequenciais de LNA.

[0009] Nas modalidades, o ácido nucleico compreende um ácido nucleico com uma sequência selecionada de: tggcagct (SEQ ID NO: 2), cttcaactggcagct (SEQ ID NO: 3), tcttcaactggcagct (SEQ ID NO: 4), ttcttcaactggcagct (SEQ ID NO: 5) e gttcttcaactggcagct (SEQ ID NO: 6). Em modalidades, o ácido nucleico compreende cerca de 8 a cerca de 12 modificações de LNA, por exemplo, cerca de 8 a cerca de 10 modificações de LNA. Em modalidades, o ácido nucleico compreende cerca de 8, ou cerca de 9, ou cerca de 10, ou cerca de 11, ou cerca de 12 modificações de LNA.

[0010] Nas modalidades, o ácido nucleico compreende tggcagct (SEQ ID NO: 2) e pelo menos 6 modificações de LNA.

[0011] Nas modalidades, o ácido nucleico compreende tggcagct (SEQ ID NO: 2) e pelo menos 8 modificações de LNA.

[0012] Nas modalidades, o ácido nucleico compreende cttcaactggcagct (SEQ ID NO: 3) e pelo menos 6 modificações de LNA, pelo menos 8 modificações de LNA ou pelo menos 10 modificações de LNA. Nas modalidades, o ácido nucleico compreende cttcaactggcagct (SEQ ID NO: 3) e 8

modificações de LNA, sendo as referidas modificações nas posições 1, 3, 6, 7, 10, 12, 14 e 15. Nas modalidades, o ácido nucleico compreende cttcaactggcagct (SEQ ID NO: 3) e 10 modificações de LNA, sendo as referidas modificações nas posições 1, 2, 3, 6, 7, 10, 11, 12, 14 e 15.

[0013] Nas modalidades, o ácido nucleico compreende tcttcaactggcagct (SEQ ID NO: 4) e pelo menos 8 modificações de LNA, pelo menos 10 modificações de LNA ou pelo menos 11 modificações de LNA. Nas modalidades, o ácido nucleico compreende tcttcaactggcagct (SEQ ID NO: 4) e 10 modificações de LNA, sendo as referidas modificações nas posições 1, 2, 4, 8, 10, 11, 12, 13, 15 e 16. Nas modalidades, o ácido nucleico compreende tcttcaactggcagct (SEQ ID NO: 4) e 11 modificações de LNA, sendo as referidas modificações nas posições 1, 2, 4, 5, 6, 8, 11, 12, 13, 15 e 16. Nas modalidades, o ácido nucleico compreende tcttcaactggcagct (SEQ ID NO: 4) e 11 modificações de LNA, sendo as referidas modificações nas posições 1, 2, 4, 5, 6, 9, 11, 12, 13, 15 e 16.

[0014] Nas modalidades, o ácido nucleico compreende ttcttcaactggcagct (SEQ ID NO: 5) e pelo menos 10 modificações de LNA ou pelo menos 11 modificações de LNA. Nas modalidades, o ácido nucleico compreende ttcttcaactggcagct (SEQ ID NO: 5) e 11 modificações de LNA, sendo as referidas modificações nas posições 1, 2, 5, 6, 7, 10, 12, 13, 14, 16 e 17.

[0015] Nas modalidades, o ácido nucleico compreende gttcttcaactggcagct (SEQ ID NO: 6) e pelo menos 9 modificações de LNA ou pelo menos 10 modificações de LNA. Nas modalidades, o ácido nucleico compreende gttcttcaactggcagct (SEQ ID NO: 6) e 9 modificações de LNA, sendo as referidas modificações nas posições 1, 2, 6, 10, 13, 14, 16, 17 e 18.

[0016] Em um outro aspecto, a invenção fornece uma composição farmacêutica, compreendendo o ácido nucleico do aspecto acima de qualquer uma das modalidades e um excipiente ou carreador farmacêuticamente aceitável.

[0017] Em ainda outro aspecto, a presente invenção fornece um vetor ou um plasmídeo compreendendo um ácido nucleico do aspecto acima ou qualquer uma das modalidades acima.

[0018] Um aspecto da presente invenção fornece uma célula hospedeira que compreende um ácido nucleico do aspecto acima ou qualquer uma das modalidades acima.

[0019] Outro aspecto da presente intenção fornece um método para inibir miR-22. O método compreende o contato do miR-22 com uma composição que compreende um inibidor do miR-22 que é um ácido nucleico do aspecto acima ou qualquer uma das modalidades anteriores.

[0020] Qualquer aspecto ou modalidade descrito neste documento pode ser combinado com qualquer outro aspecto ou modalidade, conforme divulgado neste documento.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0021] O arquivo de pedido ou patente contém pelo menos uma figura executada em cor. Cópias dessa patente ou publicação de pedido de patente com figuras coloridas serão fornecidas pelo Escritório mediante solicitação e pagamento da taxa necessária.

[0022] A Figura 1 mostra o projeto do LNA anti-miR-22. SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 e SEQ ID NO: 7 a SEQ ID NO: 15 são mostradas.

[0023] A Figura 2A-C são uma série de gráficos de barras e gráficos de linha que mostram o espaço de projeto para oligonucleotídeos anti-miR-22.

[0024] A Figura 3A-B mostra a geração de possíveis projetos anti-miR *in silico* (11228) e preve propriedades para selecionar os projetos anti-miR-22 mais ideais (8-18 nt de comprimento). SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 7 a SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 e SEQ ID NO: 1 são mostrados, movendo-se de cima para baixo da legenda da Figura 3B.

[0025] A Figura 4 mostra uma absorção não assistida em MCF7 de LNA marcado com FAM.

[0026] A Figura 5 é um western blot que mostra a validação de LNAs

anti-miR-22 em células MCF7.

[0027] A Figura 6A-C mostra que uma absorção não assistida de LNAs anti-miR-22 em MCF7 afeta o nível de proteína alvo. As Figuras 6A e 6B são imagens de western blot que mostram a expressão de TET2 em relação ao controle de HSP-90. A Figura 6C é um gráfico de barras que mostra a expressão da proteína TET2. Na Figura 6C, a ordem dos dados nos gráficos de barras, lendo da esquerda para a direita, é SCR (em preto), 25nM (em cinza claro) e 100nM (em cinza escuro).

[0028] A Figura 7 é um par de imagens dot-blot mostrando que os LNAs anti-miR-22 aumentam o nível de 5-hmC em MCF7.

[0029] A Figura 8 é uma ilustração que mostra o planejamento experimental *in vivo* e as condições para miR-22^{-/-} e camundongos WT em HFD após transfecção de Veículo (VCH), RNA Controle tipo Scramble (SCR) e ácido nucleico bloqueado (LNA).

[0030] A Figura 9 é um gráfico de barras que mostra que não há diferença entre camundongos tratados e não tratados no consumo de alimentos para (Δ) Veículo, (\diamond) SCR, (\square) anti-miR-22.

[0031] A Figura 10A-B são gráficos de linha que mostram uma inibição farmacológica *in vivo* de miR-22 evita que os camundongos se tornem obesos. A Figura 10A mostra o aumento percentual final do corpo. A Figura 10B mostra o silenciamento *in vivo* de miR-22 em camundongos DIO. Em ambas as figuras, nos pontos de tempo finais, a ordem dos dados indo de cima para baixo é Veículo (em verde), SCR (em vermelho) e anti-miR-22 (em azul).

[0032] A Figura 11 é uma ilustração de uma abordagem curativa mostrando camundongos miR-22^{-/-} e WT em um HFD tratado com um anti-miR-22-LNA, SCR e um VHL e colocado em um segundo regime de HFD.

[0033] A Figura 12 é um gráfico de linha que mostra os resultados da abordagem curativa em que há uma redução significativa no peso corporal em camundongos já obesos e alimentados com um HFD. Após 3 meses e meio de tratamento, uma redução significativa no peso corporal foi observada em

camundongos obesos (peso médio >40 g) e alimentado com HFD. Os camundongos foram sacrificados, tecido coletado, RNA de fígados usado para RNAseq.

[0034] A Figura 13 é uma coloração com óleo-vermelho-O mostrando que a inibição farmacológica de miR-22 é eficaz em impedir a diferenciação adipocítica de MEFs.

[0035] A Figura 14 é uma coloração Oil-Red O (Figura 14A) e um gráfico de barras (Figura 14B) mostrando que o tratamento anti-miR-22 em células mesenquimais primárias humanas cultivadas em meio de diferenciação Adipo por 2 semanas com ou sem LNA anti-miR-22. Captação não assistida 500nM (LNAs adicionados a cada 2 dias). Na Figura 14B, os dados nas barras da direita (vermelhas) em cada gráfico de barras são para as células tratadas com LNA nº 10.

[0036] A Figura 15 é um gráfico de barras que mostra que a inibição farmacológica de miR-22 é eficaz em impedir a diferenciação adipocítica de MEFs. A ordem dos dados nos gráficos de barras, ao ler da esquerda para a direita, corresponde à legenda (à direita do gráfico) ao ler de cima para baixo.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA DIVULGAÇÃO

[0037] A presente divulgação fornece novas composições e métodos para inibir miR-22, por exemplo, inibindo a expressão e/ou atividade de microRNA.

[0038] Sem estar limitado pela teoria, acredita-se que miRNAs maduros sejam gerados por pol II ou pol III e surjam de transcritos iniciais denominados pri-miRNAs. Esses pri-miRNAs têm frequentemente vários milhares de bases de comprimento e, portanto, são processados para fazer miRNAs maduros muito mais curtos. Esses pri-miRNAs podem ser multicistrônicos e resultar da transcrição de várias sequências agrupadas que organizam o que pode se desenvolver em muitos miRNAs. O processamento para produzir miRNAs pode ser feito em duas etapas. Em primeiro lugar, os pri-miRNAs podem ser processados no núcleo pela RNase Drosha em

precursores em forma de hairpin de cerca de 70 a cerca de 100 nucleotídeos (pré-miRNAs). Em segundo lugar, após a transposição para o citoplasma, os pré-miRNAs em hairpin podem ser posteriormente processados pelo RNase Dicer para produzir um miRNA de fita dupla. A fita de miRNA madura pode então ser incorporada ao complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), onde pode se associar com seus mRNAs alvo por complementaridade de par de bases e levar à supressão da expressão da proteína. A outra fita do duplex de miRNA que não é preferencialmente selecionada para a entrada em um complexo de silenciamento RISC é conhecida como fita passageira ou miRNA menor ou fita estrela (*). Esta fita pode ser degradada. Entende-se que, a menos que especificado, tal como aqui utilizado, um miRNA pode referir-se a pri- e/ou pré- e/ou maduro e/ou fita menor (estrela) e/ou versão duplex do miRNA.

[0039] Em algumas modalidades, os genes de miRNA podem estar localizados dentro de íntrons de genes que codificam proteínas ou dentro de íntrons ou exons de unidades de transcrição não codificantes. A expressão de miRNAs intrônicos pode coincidir com a das unidades de transcrição hospedeiras porque eles são tipicamente orientados na mesma direção e são expressos de forma coordenada com os pré-mRNAs em que residem.

[0040] Em algumas modalidades, os miRNAs podem se ligar a sequências dentro da região 3' não traduzida (3'UTR) dos transcritos do gene alvo. Em algumas modalidades, os miRNAs podem se ligar a sequências fora de 3'UTR dos transcritos do gene alvo. Em algumas modalidades, os miRNAs podem se ligar tanto dentro quanto fora da 3'UTR dos transcritos do gene alvo.

[0041] Em algumas modalidades, o emparelhamento de nucleotídeos entre o segundo e o sétimo nucleotídeos do miRNA (a sequência de semente de miRNA) e a sequência correspondente ao longo do alvo 3'UTR (correspondência de semente) pode ocorrer para o reconhecimento do alvo. Por conseguinte, a ligação entre miRNA e alvo pode compreender um par de bases de cerca de 5 nucleotídeos. Além disso, a ligação entre o miRNA e o

alvo pode compreender mais do que um par de bases de 5 nucleotídeos. Em algumas modalidades, a ligação entre um miRNA e o gene que ele regula pode ser mediada pela ligação do miRNA em até 2, até 4, até 6, até 8 ou até 10 locais do ácido nucleico alvo.

MiR-22

[0042] MiR-22 é altamente conservado em muitas espécies de vertebrados, incluindo chimpanzés, camundongos, ratos, cães e cavalos. Este nível de conservação sugere importância funcional. O MiR-22 foi previamente identificado como tendo um papel na maturação eritrocitária e, posteriormente, como tendo um papel na oncogênese. MiR-22 tem como alvo direto fosfatase e homólogo de tensina (PTEN) e tet metilcitosina dioxigenase (TET) para promover tumorigênese, metástase e distúrbios metabólicos. Em algumas modalidades, os ácidos nucleicos da presente invenção aumentam a atividade e/ou expressão de PTEN e/ou TET2.

[0043] O precursor em hairpin miR-22 previsto está contido inteiramente no exon 2 de um transcrito não codificador, C17orf91, e o padrão de splicing é geralmente conservado em humanos e camundongos, apesar da falta de potencial de codificação de proteínas. Ver Rodriguez *et al.*, Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. Genome Res. Outubro de 2004; 14 (10A): 1902-10. A deleção do exon 2 de C17orf91 englobando mir-22 em modelos de camundongos revelou que miR-22 pode desempenhar um papel na hipertrofia cardíaca e remodelação ao direcionar SIRT1 (desacetilase sirtuína 1 NAD-dependente), HDAC4 (histona desacetilase 4), PURB (proteína B de ligação ao elemento rico em purinas) e PTEN. Ver Gurha *et al.*, Targeted deletion of microRNA-22 promotes stress-induced cardiac dilation and contractile dysfunction. Circulation. Junho de 2012 5;125(22):2751-61; Huang *et al.*, MicroRNA-22 regulates cardiac hypertrophy and remodeling in response to stress. Circ Res. Abril de 2013 26;112(9):1234-43.

Inibidores de miR-22

[0044] Em modalidades, um inibidor de miRNA é um ácido nucleico que atua como um oligonucleotídeo antisense. Os ácidos nucleicos da presente invenção podem incluir ribonucleotídeos ou desoxirribonucleotídeos ou uma combinação destes. Os ácidos nucleicos da presente invenção podem ter pelo menos uma modificação química (exemplos não limitativos são açúcar ou modificações de estrutura, por exemplo, um ácido nucleico bloqueado (LNA)).

[0045] Em modalidades, a sequência de um ácido nucleico que inibe miR-22 é conservada entre as espécies. Nas modalidades, a sequência do ácido nucleico é complementar, em parte, à sequência do miR-22 humano. Nas modalidades, o inibidor é selecionado para reduzir a expressão e/ou atividade do miR-22 alvo em uma célula ou um sujeito.

[0046] Em modalidades, os ácidos nucleicos da presente invenção inibem o miR-22 humano. Em modalidades, miR-22 humano compreende ou consiste em AAGCUGCCAGUUGAAGAACUGU (SEQ ID NO: 1).

[0047] Em modalidades, os ácidos nucleicos da presente invenção têm cerca de 8 a cerca de 20 resíduos de comprimento (por exemplo, cerca de 8-18, ou cerca de 8-16, ou cerca de 8-14, ou cerca de 8-12, ou cerca de 8-10, ou cerca de 10-18, ou cerca de 10-16, ou cerca de 10-14, ou cerca de 10-12 resíduos de comprimento). Em modalidades, os ácidos nucleicos têm cerca de 8, ou cerca de 9, ou cerca de 10, ou cerca de 11, ou cerca de 12 resíduos de comprimento.

[0048] Em modalidades, os ácidos nucleicos da presente invenção ligam-se com homologia completa a uma porção de miR-22. Por exemplo, um ácido nucleico da presente invenção pode ter 18 resíduos de comprimento e cada um dos 18 resíduos é complementar a um nucleotídeo de miR-22. Alternativamente, os ácidos nucleicos da presente invenção ligam-se com homologia completa a uma porção de miR-22. Por exemplo, para um ácido nucleico da presente invenção pode ter 16 resíduos de comprimento e apenas 15 ou menos dos resíduos são complementares a um nucleotídeo de miR-22.

[0049] Em modalidades, um ácido nucleico da presente invenção

difere de uma porção de miR-22 em uma posição, em duas posições, em três posições, em quatro posições, em cinco posições ou em mais de cinco posições.

[0050] Em modalidades, um ácido nucleico da presente invenção se liga a miR-22 com afinidade suficiente para inibi-lo. Em modalidades, os ácidos nucleicos se ligam a miR-22 com uma alta afinidade (por exemplo, afinidade nM). Assim, um ácido nucleico da presente invenção liga-se ao miR-22 com uma alta afinidade, mesmo que seja diferente de uma porção do miR-22 em uma ou mais posições.

[0051] Um ácido nucleico da presente invenção pode ter uma sequência compreendendo tggcagct (SEQ ID NO: 2) e compreendendo pelo menos uma modificação de ácido nucleico bloqueado (LNA).

[0052] Em um ácido nucleico bloqueado (LNA), a porção ribose do ácido nucleico é modificada com uma ponte extra conectando o carbono 2' e o carbono 4', que bloqueia a ribose na conformação *3'-endo*. Os ácidos nucleicos da presente invenção, e que compreendem LNA, para fornecer agentes com custo-benefício que podem ser distribuídos de forma eficiente e possuem biodisponibilidade suficiente para o tratamento e prevenção de vários distúrbios.

[0053] Em modalidades, um ácido nucleico da presente invenção inclui pelo menos 2 modificações de LNA em direção à sua extremidade 3' (por exemplo, cerca de 2, ou cerca de 3, ou cerca de 4, ou cerca de 5 modificações em direção à sua extremidade 3'). Nas modalidades, o ácido nucleico compreende tggcagct (SEQ ID NO: 2) e pelo menos 6 modificações de LNA ou pelo menos 8 modificações de LNA.

[0054] Por exemplo, o ácido nucleico compreende modificações de LNA nas posições 7 e 8 de tggcagct (SEQ ID NO: 2). Nas modalidades, um ácido nucleico da presente invenção inclui não mais do que 4 modificações sequenciais de LNA (por exemplo, apenas 2, ou 3 ou 4 modificações sequenciais de LNA). Nas modalidades, um ácido nucleico da presente

invenção inclui não mais do que 3 resíduos não modificados sequenciais (por exemplo, apenas 3, ou 2, ou 1 resíduo não modificado). Nas modalidades, um ácido nucleico da presente invenção inclui não menos do que 4 modificações de LNA. Nas modalidades, o ácido nucleico compreende cerca de 8 a cerca de 12 modificações de LNA, por exemplo, cerca de 8, ou cerca de 9, ou cerca de 10, ou cerca de 11, ou cerca de 12 modificações de LNA.

[0055] Nas modalidades, o ácido nucleico compreende ou consiste em um ácido nucleico com uma sequência selecionada a partir de: tggcagct (SEQ ID NO: 2), ctccaactggcagct (SEQ ID NO: 3), tcttccaactggcagct (SEQ ID NO: 4), ttcttccaactggcagct (SEQ ID NO: 5) e gtttccaactggcagct (SEQ ID NO: 6). Nas modalidades, o ácido nucleico compreende um ácido nucleico com uma sequência selecionada a partir de: tggcagct (SEQ ID NO: 2), ctccaactggcagct (SEQ ID NO: 3), tcttccaactggcagct (SEQ ID NO: 4), ttcttccaactggcagct (SEQ ID NO: 5), e gtttccaactggcagct (SEQ ID NO: 6) e compreendendo cerca de 8 a cerca de 12 modificações de LNA, por exemplo, cerca de 8, ou cerca de 9, ou cerca de 10, ou cerca de 11, ou cerca de 12 modificações de LNA.

[0056] Nas modalidades, o ácido nucleico compreende ou consiste em ctccaactggcagct (SEQ ID NO: 3) e pelo menos 6 modificações de LNA, pelo menos 8 modificações de LNA ou pelo menos 10 modificações de LNA. Nas modalidades, o ácido nucleico compreende ou consiste em ctccaactggcagct (SEQ ID NO: 3) e 8 modificações de LNA, sendo as referidas modificações nas posições 1, 3, 6, 7, 10, 12, 14 e 15; por exemplo, o ácido nucleico compreende ou consiste na sequência CtTcaACtgGcAgCT (SEQ ID NO: 7), em que as letras maiúsculas são LNA modificados e as minúsculas não modificados. Nas modalidades, o ácido nucleico compreende ou consiste em ctccaactggcagct (SEQ ID NO: 3) e 10 modificações de LNA, sendo as referidas modificações nas posições 1, 2, 3, 6, 7, 10, 11, 12, 14 e 15; por exemplo, o ácido nucleico compreende ou consiste na sequência CTTcaACtgGCAgCT (SEQ ID NO: 8), em que as letras maiúsculas são modificadas com LNA e as minúsculas não modificadas.

[0057] Nas modalidades, o ácido nucleico compreende ou consiste em ttttcaactggcagct (SEQ ID NO: 4) e pelo menos 8 modificações de LNA, pelo menos 10 modificações de LNA ou pelo menos 11 modificações de LNA. Nas modalidades, o ácido nucleico compreende ou consiste em ttttcaactggcagct (SEQ ID NO: 4) e 10 modificações de LNA, sendo as referidas modificações nas posições 1, 2, 4, 8, 10, 11, 12, 13, 15 e 16; por exemplo, o ácido nucleico compreende ou consiste na sequência TCtTcaaCtGGCAgCT (SEQ ID NO: 10), em que as letras maiúsculas são LNA modificados e as minúsculas não modificados. Nas modalidades, o ácido nucleico compreende ou consiste em ttttcaactggcagct (SEQ ID NO: 4) e 11 modificações de LNA, sendo as referidas modificações nas posições 1, 2, 4, 5, 6, 8, 11, 12, 13, 15, e 16; por exemplo, o ácido nucleico compreende ou consiste na sequência TCtTCAaCtgGCAgCT (SEQ ID NO: 9), em que as letras maiúsculas são LNA modificados e as minúsculas não são modificados.

[0058] Nas modalidades, o ácido nucleico compreende ou consiste em ttttcaactggcagct (SEQ ID NO: 4) e 11 modificações de LNA, sendo as referidas modificações nas posições 1, 2, 4, 5, 6, 9, 11, 12, 13, 15, e 16; por exemplo, o ácido nucleico compreende ou consiste na sequência TCtTCAacTgGCAgCT (SEQ ID NO: 11), em que as letras maiúsculas são LNA modificados e as minúsculas não modificados.

[0059] Em modalidades, o ácido nucleico compreende ou consiste em ttcttcaactggcagct (SEQ ID NO: 5) e pelo menos 10 modificações de LNA ou pelo menos 11 modificações de LNA. Nas modalidades, o ácido nucleico compreende ou consiste em ttcttcaactggcagct (SEQ ID NO: 5) e 11 modificações de LNA, sendo as referidas modificações nas posições 1, 2, 5, 6, 7, 10, 12, 13, 14, 16 e 17; por exemplo, o ácido nucleico compreende ou consiste na sequência TTctTCAacTgGCAgCT (SEQ ID NO: 12), em que as letras maiúsculas são LNA modificados e as minúsculas não modificados.

[0060] Nas modalidades, o ácido nucleico compreende ou consiste em gttcttcaactggcagct (SEQ ID NO: 6) e pelo menos 9 modificações de LNA ou

pelo menos 10 modificações de LNA. Nas modalidades, o ácido nucleico compreende ou consiste em gttcttcaactggcagct (SEQ ID NO: 6) e 9 modificações de LNA, sendo as referidas modificações nas posições 1, 2, 6, 10, 13, 14, 16, 17 e 18; por exemplo, o ácido nucleico compreende ou consiste na sequência GTtctTcaaCtgGCaGCT (SEQ ID NO: 13), em que as letras maiúsculas são LNA modificados e as minúsculas não modificados.

[0061] Em modalidades, o ácido nucleico que compreende uma sequência listada acima, pode ainda incluir nucleotídeos adicionais 5' para uma sequência listada neste documento e/ou incluem nucleotídeos adicionais 3' para uma sequência listada neste documento. Os nucleotídeos adicionais podem ser não modificados ou podem ser modificados, por exemplo, LNA ou uma modificação química adicional.

[0062] Em algumas modalidades, um ácido nucleico da presente invenção pode incluir ainda modificação química adicional. Como exemplos, a modificação química é um ou mais de um fosforotioato, 2'-O-Metil, ou 2'-O-Metoxietil, unidade 2'-O-alkil-RNA, unidade 2'-OMe-RNA, unidade 2'-amino-DNA, unidade 2'-fluoro-DNA (incluindo, mas não se limitando a, um análogo de DNA com uma substituição por um flúor na posição 2'(2' F)), unidade LNA, unidade PNA, unidade HNA, Unidade INA e uma unidade 2' MOE RNA.

[0063] Os ácidos nucleicos adequados podem ser constituídos por uma ou mais modificações conformacionalmente restritas ou bicíclicas de nucleosídeos de açúcar (BSN) que conferem estabilidade térmica aprimorada para complexos formados entre o oligonucleotídeo contendo BSN e sua cadeia alvo de miRNA complementar. Por exemplo, em uma modalidade, os ácidos nucleicos contêm pelo menos um ácido nucleico bloqueado. Os ácidos nucleicos bloqueados (LNAs) contêm um ribonucleosídeo 2'-O, 4'-C-metileno (estrutura A) em que a porção de açúcar da ribose está em uma conformação bloqueada. Em outra modalidade, os ácidos nucleicos contêm pelo menos um 2'-desoxirribonucleosídeo em ponte 2', 4'-C (CDNA, estrutura B). Ver, por exemplo, Patente US N° 6,403,566 e Wang *et al.*, (1999) Bioorganic and

ácidos nucleicos adequados são gapmers 2'-O-metoxietil que contêm ribonucleotídeos modificados com 2'-O-metoxietil nas extremidades 5' e 3' com pelo menos dez desoxirribonucleotídeos no centro. Esses gapmers são capazes de desencadear mecanismos de degradação de alvos de RNA dependentes de RNase H. Outras modificações de ácidos nucleicos para aumentar a estabilidade e melhorar a eficácia, tais como as descritas na Patente US Nº 6.838.283, que é incorporada neste documento por referência em sua totalidade, são conhecidas na técnica e são adequadas para uso nos métodos da invenção. Por exemplo, e sem a intenção de ser limitante, para facilitar a distribuição e estabilidade in vivo, os ácidos nucleicos podem ser ligados a um esteroide, tal como a porção de colesterol, uma vitamina, um ácido graxo, um carboidrato ou glicosídeo, um peptídeo ou outro ligante de pequena molécula em sua extremidade 3'.

[0065] Tal conforme usado neste documento, substancialmente complementar se refere a uma sequência que tem pelo menos cerca de 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% complementar a uma sequência polinucleotídica alvo (exemplos não limitativos são maduros, secundários, miRNA precursor ou sequência pri-miRNA de, por exemplo, miR-22).

[0066] Em algumas modalidades, o ácido nucleico da presente invenção é um antagomir. Os antagomirs são ribonucleotídeos quimicamente modificados de fita simples que são pelo menos parcialmente complementares aos miRNAs e, portanto, podem silenciá-los. *Ver*, por exemplo, Kriitzfeldt, *et al.*, Nature (2005) 438 (7068): 685-9. Os antagomirs podem compreender um ou mais nucleotídeos modificados, tais como modificações 2'-O-metil-açúcar. Em algumas modalidades, os antagomirs compreendem apenas nucleotídeos modificados. Os antagomirs também podem compreender uma ou mais ligações fosforotioato, resultando em uma estrutura principal de fosforotioato parcial ou total. Para facilitar a distribuição e estabilidade in vivo, o antagomir pode ser ligado a um colesterol ou outra porção em sua extremidade 3'. Os antagomirs adequados para inibir podem ter cerca de 15 a cerca de 50

nucleotídeos de comprimento, cerca de 18 a cerca de 30 nucleotídeos de comprimento e cerca de 20 a cerca de 25 nucleotídeos de comprimento. Os antagomirs podem ter pelo menos cerca de 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% complementar a uma sequência de miRNA oncogênica madura ou secundária. Em algumas modalidades, o antagomir pode ser substancialmente complementar a uma sequência de miRNA oncogênica madura ou menor, que tem pelo menos cerca de 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% complementar a uma sequência polinucleotídica alvo. Em outras modalidades, os antagomirs são 100% complementares a uma sequência de miRNA oncogênica madura ou menor.

[0067] Os ácidos nucleicos da presente invenção podem compreender uma sequência que é substancialmente complementar a uma sequência de miRNA precursor (pré-miRNA) ou sequência de miRNA primária (pri-miRNA) de um miRNA oncogênico. Em algumas modalidades, os ácidos nucleicos da presente invenção compreendem uma sequência que está localizada fora da região 3' não traduzida de um alvo desse miRNA. Em algumas modalidades, os ácidos nucleicos da presente invenção compreendem uma sequência que está localizada dentro da região 3' não traduzida de um alvo desse miRNA.

[0068] Em modalidades, os ácidos nucleicos têm limitada ou nenhuma afinidade de auto-ligação. Em modalidades, os ácidos nucleicos têm estruturas duplex limitadas ou nenhuma. Em modalidades, os ácidos nucleicos têm estruturas limitadas ou nenhuma estrutura dobrada.

[0069] Quaisquer ácidos nucleicos da presente invenção podem ser distribuídos a uma célula alvo, distribuindo à célula um vetor de expressão que codifica os inibidores ou agonistas de miRNA. Um vetor é uma composição de matéria que pode ser usada para distribuir um ácido nucleico de interesse ao interior de uma célula. Numerosos vetores são conhecidos na técnica, incluindo, mas não se limitando a, polinucleotídeos lineares, polinucleotídeos associados a compostos iônicos ou anfifílicos, plasmídeos e vírus. Assim, o

termo vetor inclui um plasmídeo de replicação autônoma ou um vírus. Exemplos de vetores virais incluem, mas não estão limitados a, vetores adenovirais, vetores de vírus adeno-associados, vetores retrovirais e semelhantes. Um construto de expressão pode ser replicado em uma célula viva ou pode ser feito sinteticamente. Para os fins deste pedido, os termos construto de expressão, vetor de expressão e vetor são usados indistintamente para demonstrar a aplicação da invenção em um sentido ilustrativo geral e não se destinam a limitar a invenção.

[0070] Em uma modalidade, um vetor de expressão para expressar um ácido nucleico da presente invenção compreende um promotor operacionalmente ligado a um polinucleotídeo que codifica o ácido nucleico da presente invenção. A frase operacionalmente ligado ou sob controle transcricional conforme usado neste documento significa que o promotor está na localização e orientação corretas em relação ao polinucleotídeo para controlar a iniciação de transcrição por polimerase de RNA e expressão do polinucleotídeo.

[0071] Conforme usado neste documento, um promotor refere-se a uma sequência de DNA reconhecida pela maquinaria sintética da célula, ou maquinaria sintética introduzida, necessária para iniciar a transcrição específica de um gene. Os promotores adequados incluem, mas não estão limitados a, RNA pol I, pol II, pol III e promotores virais (por exemplo, citomegalovírus humano (CMV) promotor de gene precoce imediato, o promotor inicial SV40 e a repetição terminal longa do vírus do sarcoma de Rous).

[0072] Em certas modalidades, o promotor operacionalmente ligado a um polinucleotídeo que codifica um ácido nucleico da presente invenção pode ser um promotor induzível. Os promotores induzíveis são conhecidos na técnica e incluem, mas não estão limitados a, o promotor da tetraciclina, o promotor da metalotioneína IIA, o promotor do choque térmico, elementos de resposta de esteroide/hormônio da tireoide/ácido retinoico, o promotor tardio do adenovírus e a LTR do vírus do tumor mamário de camundongo induzível.

[0073] Os métodos de distribuição de construtos de expressão e ácidos nucleicos para células são conhecidos na técnica e podem incluir, a título de exemplo não limitativo, coprecipitação de fosfato de cálcio, eletroporação, microinjeção, DEAE-dextrano, lipofecção, transfecção empregando reagentes de transfecção de poliamina, sonicação celular, bombardeio de genes usando microprojéteis de alta velocidade e transfecção mediada por receptor.

[0074] Um aspecto da invenção fornece uma célula que compreende um ácido nucleico da invenção.

[0075] Outro aspecto da presente intenção fornece um método para inibir miR-22. O método compreendendo contatar miR-22 com uma composição inibidora de miR-22 que é qualquer ácido nucleico da presente invenção descrito neste documento. O método pode ser *in vitro* ou *in vivo*.

[0076] Noutro aspecto, a presente invenção fornece composições farmacêuticas compreendendo um composto da invenção e um excipiente ou carreador farmacêuticamente aceitável.

[0077] Quando as aplicações clínicas são contempladas, as composições farmacêuticas podem ser preparadas em uma forma apropriada para a aplicação pretendida. Geralmente, isso implicará a preparação de composições que são essencialmente livres de pirogênios, bem como outras impurezas que podem ser prejudiciais a humanos ou animais.

[0078] Em uma modalidade, uma composição farmacêutica compreende uma dose eficaz de qualquer ácido nucleico da presente invenção descrito neste documento. Uma dose eficaz é uma quantidade suficiente para afetar um resultado clínico benéfico ou desejado. Uma dose eficaz pode ser de cerca de 1 mg/kg a cerca de 100 mg/kg, cerca de 2,5 mg/kg a cerca de 50 mg/kg ou cerca de 5 mg/kg a cerca de 25 mg/kg. A determinação precisa do que seria considerada uma dose eficaz pode ser baseada em fatores individuais para cada paciente, incluindo seu tamanho, idade, tipo de distúrbio metabólico e natureza do inibidor ou agonista (exemplos não limitativos incluem

antagomir, construto de expressão, oligonucleotídeo antisense, duplex de polinucleotídeo, etc.). Portanto, as dosagens podem ser facilmente determinadas por aqueles versados na técnica a partir desta divulgação e do conhecimento na técnica. Por exemplo, as doses podem ser determinadas com a referência Physicians 'Desk Reference, 66ª Edição, PDR Network; Edição de 2012 (27 de dezembro de 2011), cujos conteúdos são incorporados por referência em sua totalidade.

[0079] Sistemas de dispersão coloidal, tais como complexos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, esferas e sistemas à base de lipídios, incluindo emulsões óleo-em-água, micelas, micelas misturadas e lipossomas, podem usados como veículos de distribuição para qualquer um dos ácidos nucleicos da presente invenção descritos neste documento. Emulsões de gordura comercialmente disponíveis que são adequadas para distribuir os ácidos nucleicos da divulgação aos tecidos adiposos (por exemplo, adipócitos) incluem INTRALIPIDO, LIPOSYN®, LIPOSYN® II, LIPOSYN® III, Nutrilipid e outras emulsões lipídicas semelhantes. Um sistema coloidal para uso como veículo de distribuição in vivo é um lipossoma (*ou seja*, uma vesícula de membrana artificial). A preparação e o uso de tais sistemas são bem conhecidos na técnica. Formulações exemplificativas são também divulgadas em US 5.981.505; US 6.217.900; US 6.383.512; US 5.783.565; US 7.202.227; US 6.379.965; US 6.127.170; US 5.837.533; US 6.747.014; e W003/093449, que são incorporados neste documento por referência na sua totalidade.

[0080] Em geral, será desejável empregar sais e tampões apropriados para tornar os veículos de distribuição estáveis e permitir a absorção pelas células alvo. As composições aquosas da presente invenção compreendem uma quantidade eficaz do veículo de distribuição compreendendo qualquer ácido nucleico da presente invenção descrito neste documento (por exemplo, lipossomas ou outros complexos ou vetores de expressão) dissolvido ou disperso em um carreador farmacologicamente aceitável ou meio aquoso. As frases farmacêutica ou farmacologicamente

aceitável referem-se a entidades moleculares e composições que não produzem uma reação adversa, alérgica ou outra reação adversa quando administradas a um animal ou a um humano. Conforme usado neste documento, o termo carreador farmacêuticamente aceitável incluem solventes, tampões, soluções, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes de retardamento da absorção e isotônicos, e semelhantes, aceitáveis para uso em formulações farmacêuticas, tais como farmacêuticos adequados para administração a humanos. O uso de tais meios e agentes para substâncias farmacêuticamente ativas é bem conhecido na técnica. Exceto na medida em que qualquer meio ou agente convencional é incompatível com os ingredientes ativos da presente invenção, seu uso em composições terapêuticas é contemplado. Ingredientes ativos suplementares também podem ser incorporados nas composições, desde que não inativem os vetores ou polinucleotídeos das composições.

[0081] As formas farmacêuticas apropriadas para injeção podem incluir soluções ou dispersões aquosas estéreis e pós estéreis para a preparação extemporânea de soluções ou dispersões injetáveis estéreis. Geralmente, essas preparações são estéreis e fluidas na medida em que existe uma fácil injetabilidade. As preparações devem ser estáveis sob as condições de fabricação e armazenamento e preservada contra a ação contaminante de microrganismos, tais como bactérias e fungos. Solvente apropriados ou meio de dispersão pode conter, por exemplo, água, etanol, poliol (por exemplo, glicerol, propilenoglicol e polietilenoglicol líquido, e semelhantes), misturas apropriadas destes e óleos vegetais. A fluidez adequada pode ser mantida, por exemplo, pelo uso de um revestimento, como a lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula necessário no caso de dispersão e pelo uso de surfactantes. A prevenção da ação de micro-organismos pode ser alcançada por vários agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo, parabens, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal e semelhantes. Em muitos casos, será preferível incluir agentes isotônicos, por exemplo, açúcares ou cloreto de

sódio. Absorção prolongada das composições injetáveis pode ser provocada pelo uso nas composições de agentes de retardo da absorção, por exemplo, gelatina e monoestearato de alumínio.

[0082] As soluções injetáveis estéreis são preparadas por incorporação de um composto de acordo com a presente invenção na quantidade requerida no solvente apropriado com vários outros ingredientes (como enumerados acima), conforme necessário, seguido de esterilização por filtração. Geralmente, as dispersões podem ser preparadas pela incorporação dos vários ingredientes ativo esterilizados a um veículo estéril que contém um meio de dispersão básico e os outros ingredientes desejados, por exemplo, conforme acima enumerados. No caso de pós estéreis para a preparação de soluções injetáveis estéreis, os métodos de preparação preferenciais incluem técnicas de secagem a vácuo e de liofilização que produzem um pó de ingrediente(s) ativo(s) mais qualquer ingrediente adicional desejado a partir de uma solução previamente filtrada esterilizada deste.

[0083] Após a formulação, as soluções podem ser administradas de forma compatível com a formulação de dosagem e em tal quantidade que seja terapeuticamente eficaz.

EXEMPLOS

[0084] Para que a invenção divulgada neste documento possa ser mais eficientemente compreendida, exemplos são fornecidos abaixo. Deve ser compreendido que esses exemplos são para fins ilustrativos apenas e não devem ser interpretados como limitantes desta invenção de qualquer maneira.

Exemplo 1: Projeto de Construtos de Ácido Nucleico Bloqueado (LNA) anti-miR-22

[0085] Todos os LNA anti-miR-22 são úteis em humanos e camundongos. O gene hospedeiro mostrou uma complementaridade de 49% entre humanos e camundongos e o LNA anti HG-miR-22 funciona predominantemente em humanos.

[0086] Os construtos foram projetados para cobrir a sequência de

semente, conter entre 8 nt e 20 nt de comprimento, ter uma fração específica de comprimento de LNAs permitida e uma afinidade de ligação tão alta quanto possível para miR-22 (ver Figuras 1 e 2A-C) .

[0087] Os elementos de projeto incluíram pelo menos 2 modificações de LNA no final do construto. Outros elementos de projeto não incluíam mais do que 4 modificações de LNA consecutivas. Ainda outros elementos de projeto incluíam não mais do que 3 resíduos não modificados consecutivos.

[0088] Os construtos foram projetados para se ligarem a miR-22 com afinidade suficiente para inibi-lo. Além disso, os construtos foram projetados para ter afinidade de auto-ligação limitada ou nenhuma (por exemplo, estruturas duplex ou de dobra limitada ou nenhuma). Ver as Figuras 3A-B.

[0089] Nas sequências abaixo, as letras maiúsculas são modificados por LNA e as letras minúsculas não são modificados; as orientações para o miR-22 (SEQ ID NO: 1) e para os oligonucleotídeos anti-miR-22 (SEQ ID NO: 2 e SEQ ID NO: 7 a SEQ ID NO: 13) são orientadas de 5' para 3'. A Figura 1 mostra os oligonucleotídeos anti-miR-22 orientados de 3' a 5' como seriam quando hibridizassem com miR-22. Os oligonucleotídeos de SEQ ID NO: 14 e SEQ ID NO: 15, orientados de 5' para 3', são sequências embaralhadas e não hibridizam com o miR-22 (SEQ ID NO: 1).

hsa-miR-22	AAGCUGCCAGUUGAAGAACUGU	(SEQ ID NO: 1)
CRM0008	TGGCAGCT	(SEQ ID NO: 2)
CRM0009	CtTcaACtgGcAgCT	(SEQ ID NO: 7)
CRM0010	CTTcaACtgGCAgCT	(SEQ ID NO: 8)
CRM0011	TCtTCAaCtgGCAgCT	(SEQ ID NO: 9)
CRM0012	TCtTcaaCtGGCAgCT	(SEQ ID NO: 10)
CRM0013	TCtTCAacTgGCAgCT	(SEQ ID NO: 11)
CRM0014	TTctTCAacTgGCAgCT	(SEQ ID NO: 12)
CRM0015	GTtctTcaaCtgGCaGCT	(SEQ ID NO: 13)
CRM0016	CGaATAgTtaGTAagCG	(SEQ ID NO: 14)

CRM0017 FAM marcado-CGaATAgTtaGTA gCG (SEQ ID NO: 15)

Exemplo 2: Inibição de miR-22

[0090] A capacidade dos construtos do Exemplo 1 para inibir miR-22 foi avaliada.

[0091] As sequências foram validadas em um ensaio por otimização do protocolo para captação assistida por LNA (transfecção Lipo200), uma linhagem celular aderente, LNA marcado com FAM foi usado e o efeito biológico validado pela identificação do anti-miR-22 mais potente na linhagem celular aderente assistida e captação não assistida (análise do nível de miR-22 pré e pós-tratamento e atividade de TET2 e nível de proteína). O objetivo era usar o anti-miR em um modelo de camundongo com o anti-miR mais potente para uso para tratamento *in vivo*, ver as Figuras 3A-B, Figura 4, Figura 5, Figura 6 e Figura 7 para resultados de confirmação.

[0092] Uma validação adicional da capacidade dos construtos do Exemplo 1 para inibir miR-22 foi avaliada *in vivo* em um modelo de obesidade.

[0093] Em um planejamento experimental *in vivo* para prevenção, ver a Figura 8, miR-22^{-/-} e WT de 2 meses de idade em HFD foram transfectados com Veículo (VCH), RNA Controle tipo Scramble (SCR) e um ácido nucleico bloqueado (LNA) do Exemplo 1 e tratados com uma dose de carga 20mg/kg (primeira vez) e uma dose de manutenção 10mg/kg de captação não assistida por injeção IP semanal. Não houve diferença entre camundongos tratados e não tratados no consumo de alimentos, ver Figura 9. A inibição farmacológica *in vivo* de miR-22 evitou que camundongos se tornassem obesos. Ver a Figura 10A-B.

[0094] A Figura 11 é uma ilustração de uma abordagem curativa mostrando camundongos miR-22^{-/-} e WT em um HFD tratado com um anti-miR-22-LNA, SCR e um VHL e colocado em um segundo regime de HFD. Como mostrado na Figura 12, um construto do Exemplo 1 inibiu miR-22, como evidenciado pela perda de peso.

[0095] Evidências adicionais de inibição de miR-22 foram observadas em experimentos de coloração com Oil-Red-O que mostram diferenciação adipocítica de MEFs prejudicada. A Figura 13 mostra que a inibição farmacológica de miR-22 com os construtos do Exemplo 1 é eficaz em impedir a diferenciação adipocítica de MEFs. A Figura 14 é uma coloração Oil-Red O (Figura 14A) e um gráfico de barras (Figura 14B) mostrando que o tratamento anti-miR-22 em células mesenquimais primárias humanas cultivadas em meio de diferenciação Adipo por 2 semanas com ou sem LNA anti-miR-22. Captação não assistida 500nM (LNAs adicionados a cada 2 dias). Na Figura 14B, os dados nas barras da direita (vermelhas) em cada gráfico de barras são para as células tratadas com LNA nº 10. A Figura 15 é um gráfico de barras que mostra que a inibição farmacológica de miR-22 é eficaz em impedir a diferenciação adipocítica de MEFs. A ordem dos dados nos gráficos de barras, ao ler da esquerda para a direita, corresponde à legenda (à direita do gráfico) ao ler de cima para baixo. O número de LNAs corresponde ao Exemplo 1 acima.

[0096] Consequentemente, os construtos de ácido nucleico do Exemplo 1 são eficazes na inibição de miR-22.

OUTRAS MODALIDADES

[0097] Deve ser entendido que embora a invenção tenha sido descrita em conjunto com sua descrição detalhada, a descrição anterior destina-se a ilustrar e não a limitar o escopo da invenção, o qual está definido pelo escopo das reivindicações anexas. Outros aspectos, vantagens e modificações estão dentro do escopo das reivindicações a seguir.

INCORPORAÇÃO POR REFERÊNCIA

[0098] Todas as patentes e publicações referidas neste documento estão incorporados em sua totalidade por meio deste por referência.

[0099] As publicações discutidas neste documento são fornecidas unicamente para sua divulgação antes da data de depósito do presente pedido. Nada neste documento deve ser interpretado como uma admissão de que a

presente invenção não é intitulada para preceder tal publicação em virtude de invenção prévia.

[0100] Neste documento, todos os cabeçalhos são simplesmente para a organização e não se destinam a limitar a divulgação de forma alguma.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição inibidora de miR-22 **caracterizada** pelo fato de que compreende um ácido nucleico com uma sequência compreendendo tggcagct (SEQ ID NO: 2), em que o ácido nucleico compreende pelo menos uma modificação de ácido nucleico bloqueada (*locked nucleic acid* - LNA).

2. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que o ácido nucleico compreende modificações de LNA nas posições 7 e 8 de tggcagct (SEQ ID NO: 2).

3. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que o ácido nucleico compreende um ácido nucleico com uma sequência selecionada a partir de: tggcagct (SEQ ID NO: 2), ctccaactggcagct (SEQ ID NO: 3), tctccaactggcagct (SEQ ID NO: 4), ttctccaactggcagct (SEQ ID NO: 5) e gttctccaactggcagct (SEQ ID NO: 6).

4. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 3, **caracterizada** pelo fato de que o ácido nucleico compreende cerca de 8 a cerca de 12 modificações de LNA.

5. Composição, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizada** pelo fato de que o ácido nucleico compreende cerca de 8 a cerca de 10 modificações de LNA.

6. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 3, **caracterizada** pelo fato de que o ácido nucleico compreende cerca de 8, ou cerca de 9, ou cerca de 10, ou cerca de 11, ou cerca de 12 modificações de LNA.

7. Composição, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizada** pelo fato de que o ácido nucleico compreende cerca de 10 modificações de LNA.

8. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que o ácido nucleico compreende tggcagct (SEQ ID NO: 2) e pelo menos 6 modificações de LNA.

9. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada**

pelo fato de que o ácido nucleico compreende tggcagct (SEQ ID NO: 2) e pelo menos 8 modificações de LNA.

10. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que o ácido nucleico compreende ctccaactggcagct (SEQ ID NO: 3) e pelo menos 6 modificações de LNA.

11. Composição, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizada** pelo fato de que o ácido nucleico compreende ctccaactggcagct (SEQ ID NO: 3) e pelo menos 8 modificações de LNA.

12. Composição, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizada** pelo fato de que o ácido nucleico compreende ctccaactggcagct (SEQ ID NO: 3) e pelo menos 10 modificações de LNA.

13. Composição, de acordo com a reivindicação 11, **caracterizada** pelo fato de que o ácido nucleico compreende ctccaactggcagct (SEQ ID NO: 3) e 8 modificações de LNA, sendo as referidas modificações nas posições 1, 3, 6, 7, 10, 12, 14 e 15.

14. Composição, de acordo com a reivindicação 12, **caracterizada** pelo fato de que o ácido nucleico compreende ctccaactggcagct (SEQ ID NO: 3) e 10 modificações de LNA, sendo as referidas modificações nas posições 1, 2, 3, 6, 7, 10, 11, 12, 14 e 15.

15. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que o ácido nucleico compreende tctccaactggcagct (SEQ ID NO: 4) e pelo menos 8 modificações de LNA.

16. Composição, de acordo com a reivindicação 15, **caracterizada** pelo fato de que o ácido nucleico compreende tctccaactggcagct (SEQ ID NO: 4) e pelo menos 10 modificações de LNA.

17. Composição, de acordo com a reivindicação 16, **caracterizada** pelo fato de que o ácido nucleico compreende tctccaactggcagct (SEQ ID NO: 4) e pelo menos 11 modificações de LNA.

18. Composição, de acordo com a reivindicação 16, **caracterizada** pelo fato de que o ácido nucleico compreende tctccaactggcagct (SEQ ID NO: 4)

e 10 modificações de LNA, sendo as referidas modificações nas posições 1, 2, 4, 8, 10, 11, 12, 13, 15 e 16.

19. Composição, de acordo com a reivindicação 17, **caracterizada** pelo fato de que o ácido nucleico compreende tcttcaactggcagct (SEQ ID NO: 4) e 11 modificações de LNA, sendo as referidas modificações nas posições 1, 2, 4, 5, 6, 8, 11, 12, 13, 15 e 16.

20. Composição, de acordo com a reivindicação 17, **caracterizada** pelo fato de que o ácido nucleico compreende tcttcaactggcagct (SEQ ID NO: 4) e 11 modificações de LNA, sendo as referidas modificações nas posições 1, 2, 4, 5, 6, 9, 11, 12, 13, 15 e 16.

21. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que o ácido nucleico compreende ttcttcaactggcagct (SEQ ID NO: 5) e pelo menos 10 modificações de LNA.

22. Composição, de acordo com a reivindicação 21, **caracterizada** pelo fato de que o ácido nucleico compreende ttcttcaactggcagct (SEQ ID NO: 5) e pelo menos 11 modificações de LNA.

23. Composição, de acordo com a reivindicação 22, **caracterizada** pelo fato de que o ácido nucleico compreende ttcttcaactggcagct (SEQ ID NO: 5) e 11 modificações de LNA, sendo as referidas modificações nas posições 1, 2, 5, 6, 7, 10, 12, 13, 14, 16 e 17.

24. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que o ácido nucleico compreende gttcttcaactggcagct (SEQ ID NO: 6) e pelo menos 9 modificações de LNA.

25. Composição, de acordo com a reivindicação 24, **caracterizada** pelo fato de que o ácido nucleico compreende gttcttcaactggcagct (SEQ ID NO: 6) e pelo menos 10 modificações de LNA.

26. Composição, de acordo com a reivindicação 24, **caracterizada** pelo fato de que o ácido nucleico compreende gttcttcaactggcagct (SEQ ID NO: 6) e 9 modificações de LNA, sendo as referidas modificações nas posições 1, 2, 6, 10, 13, 14, 16, 17 e 18.

27. Composição farmacêutica **caracterizada** pelo fato de que compreende um ácido nucleico conforme definido em qualquer uma das reivindicações anteriores, e um excipiente ou carreador farmacêuticamente aceitável.

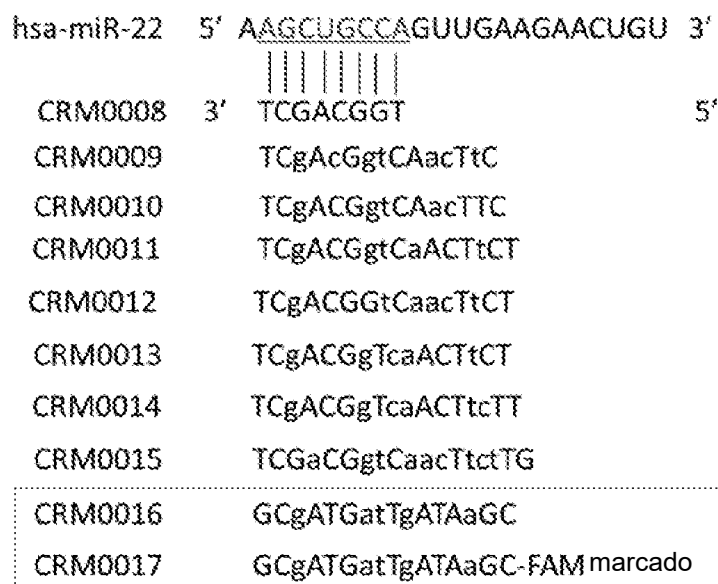
28. Vetor ou plasmídeo **caracterizado** pelo fato de que compreende um ácido nucleico conforme definido em qualquer uma das reivindicações anteriores.

29. Célula hospedeira **caracterizada** pelo fato de que compreende o ácido nucleico conforme definido em qualquer uma das reivindicações anteriores.

30. Método de inibição de miR-22 **caracterizado** pelo fato de que compreende o contato de miR-22 com uma composição inibidora de miR-22 conforme definida em qualquer uma das reivindicações de 1 a 26.

FIGURA 1

Projeto LNA anti-miR-22



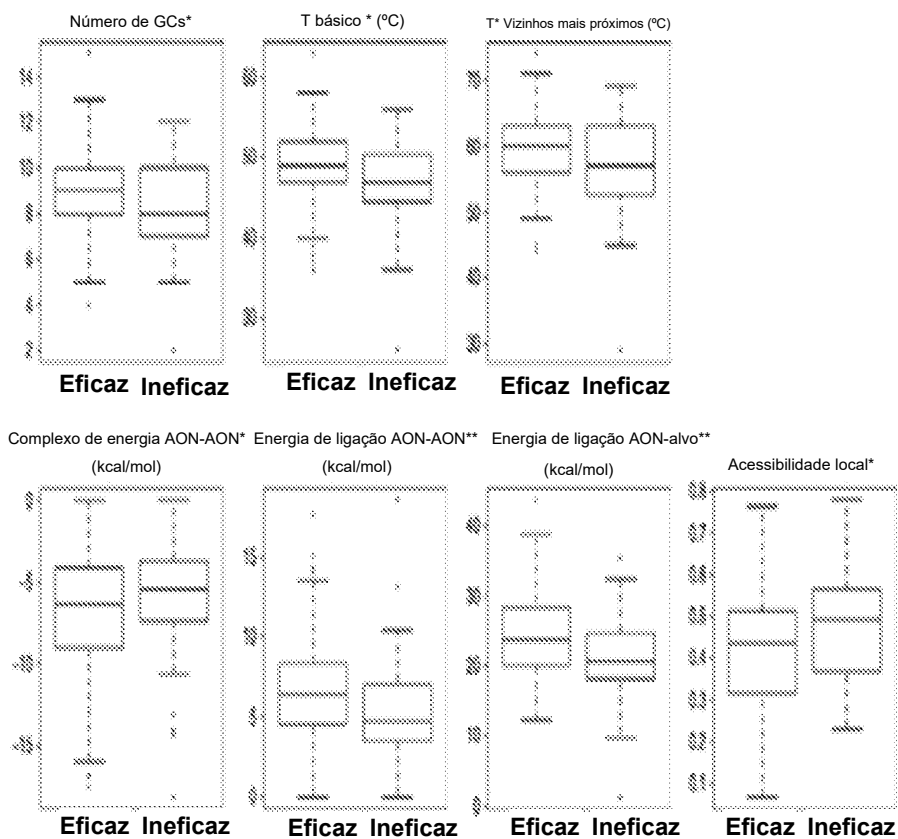
Todos os oligos anti-miR-22 são projetados com estratégia mix-mer

Embaralhar ("Scramble")

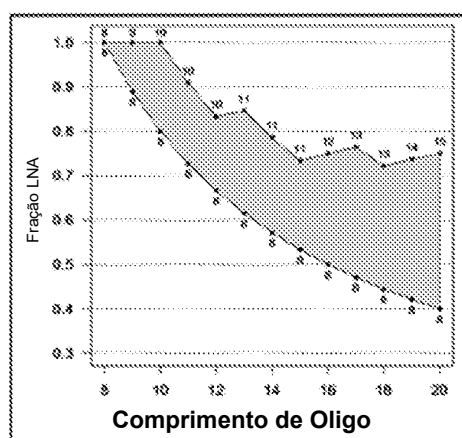
LNA Letra Maiúscula
DNA Letra Minúscula

FIGURA 2

A



B



C

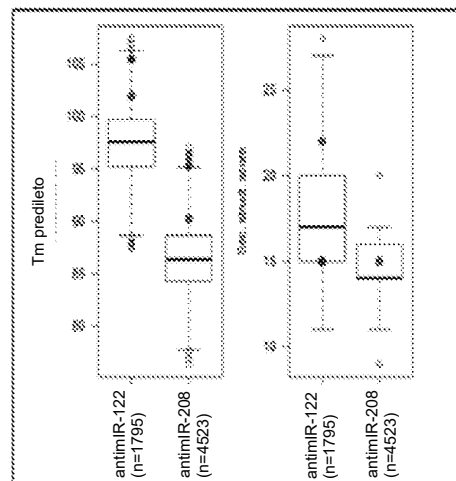
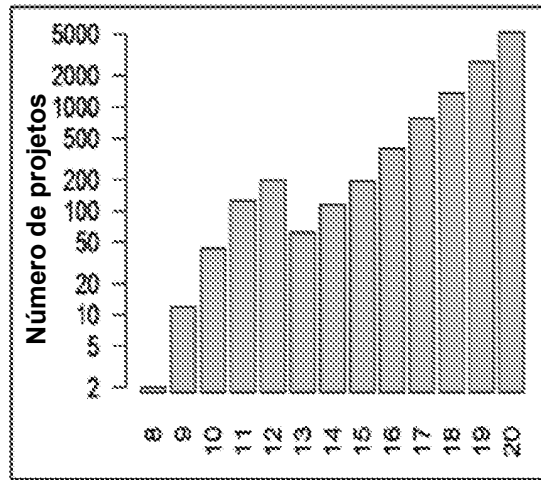


FIGURA 3

A



B

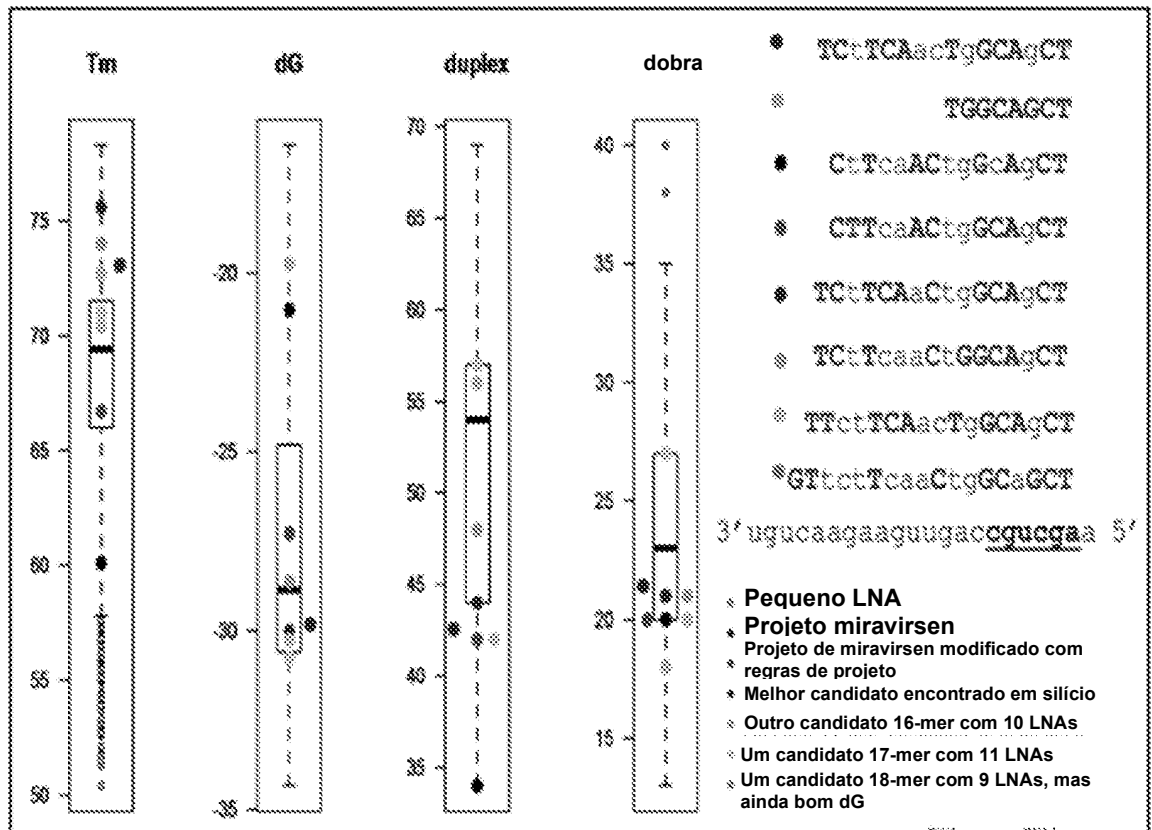
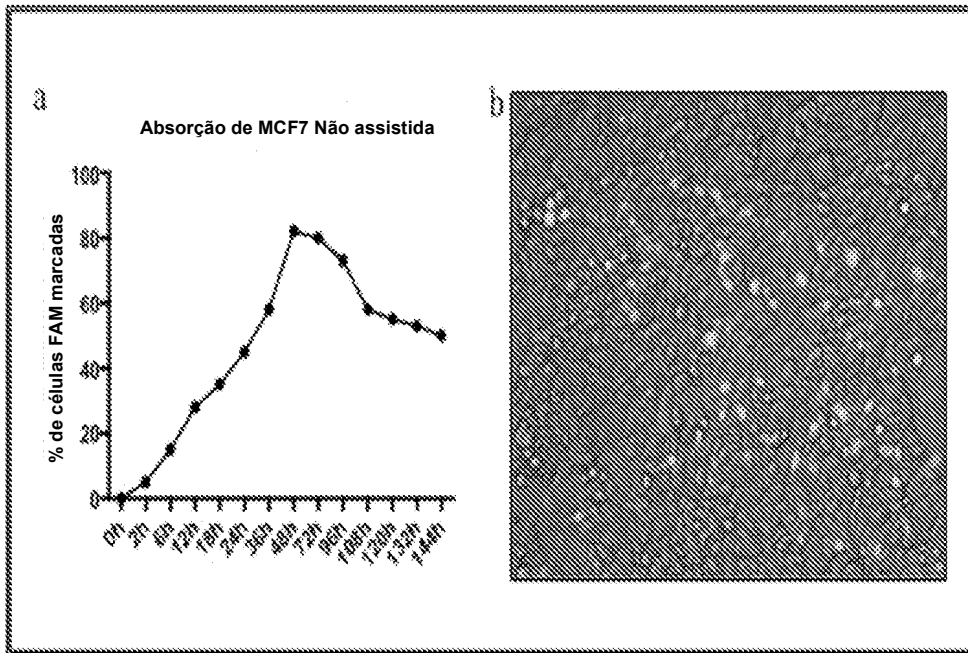


FIGURA 4



FAM marcada Scr-LNA 100 nM

FIGURA 5

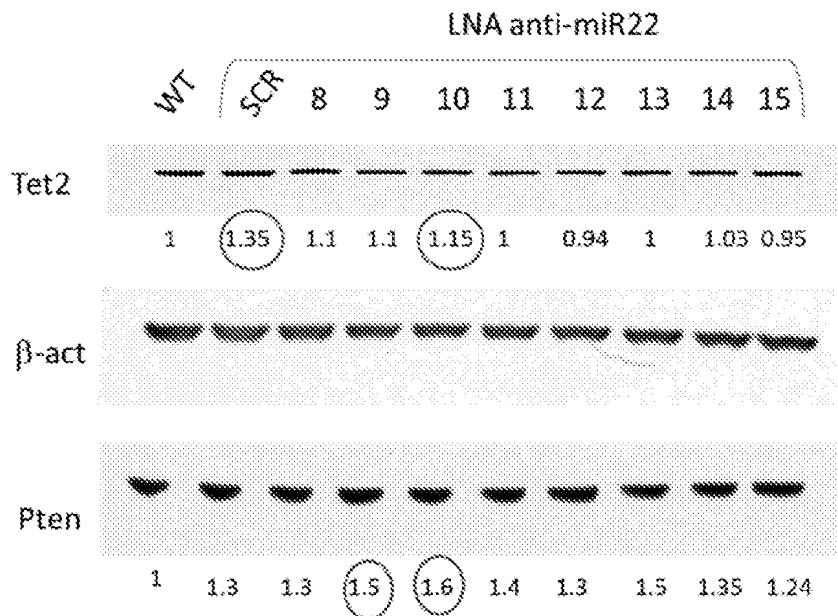


FIGURA 6

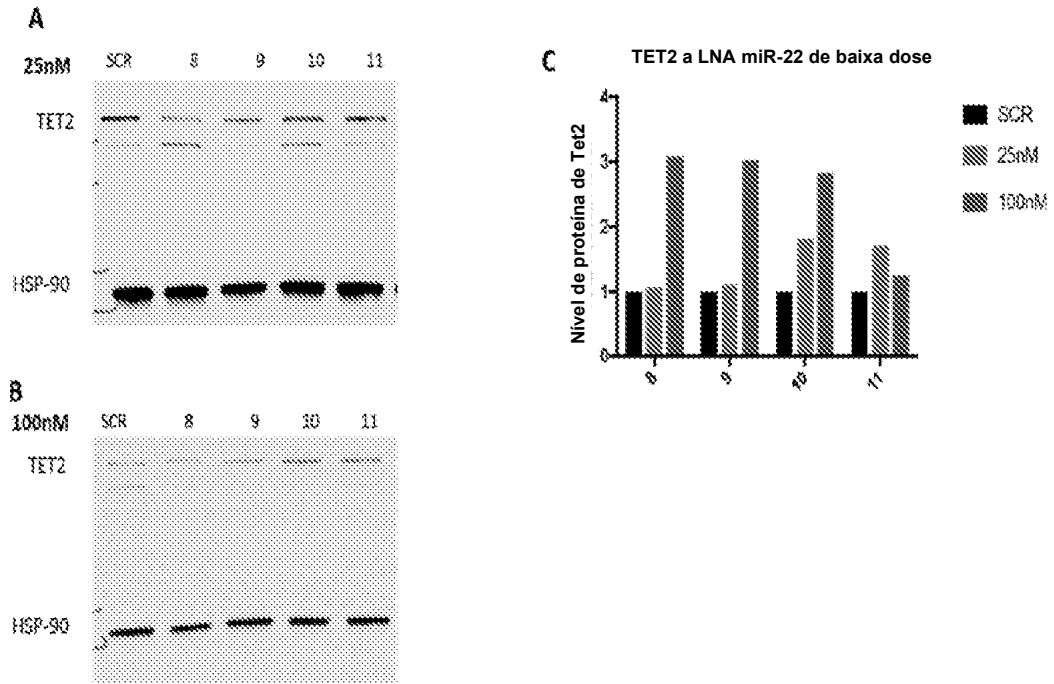


FIGURA 7

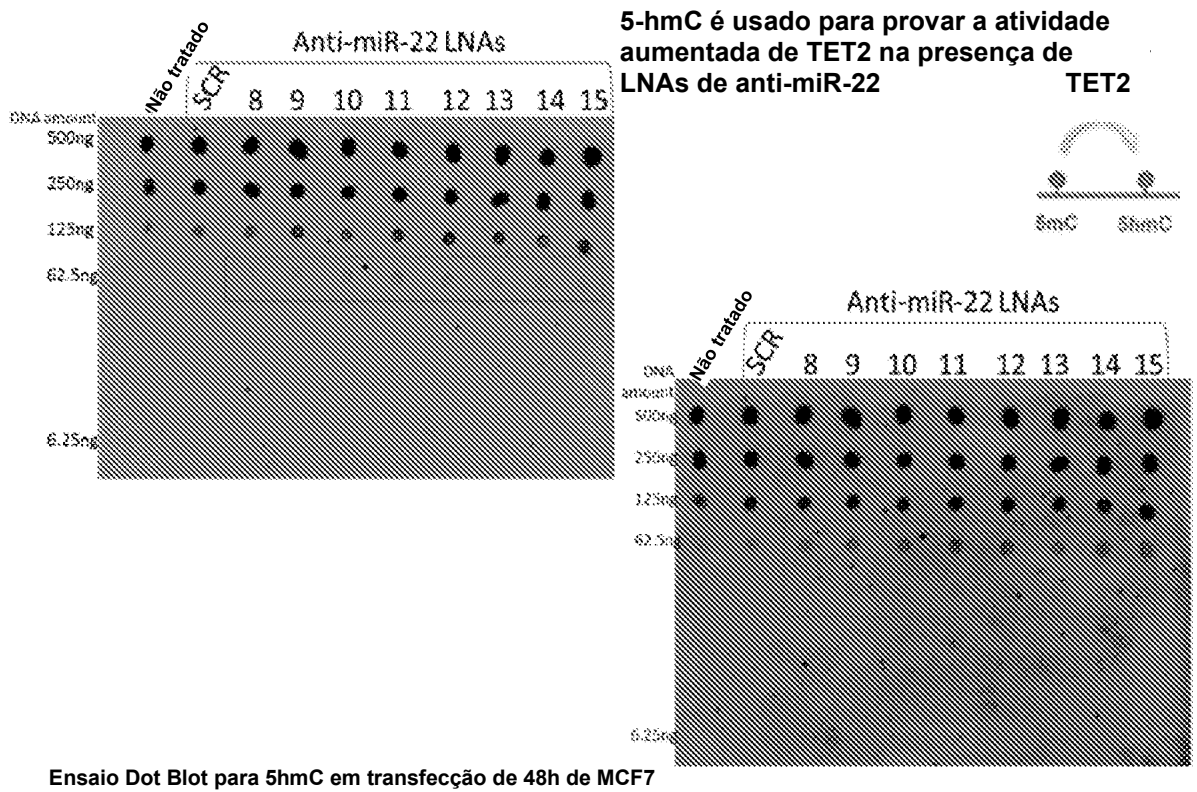
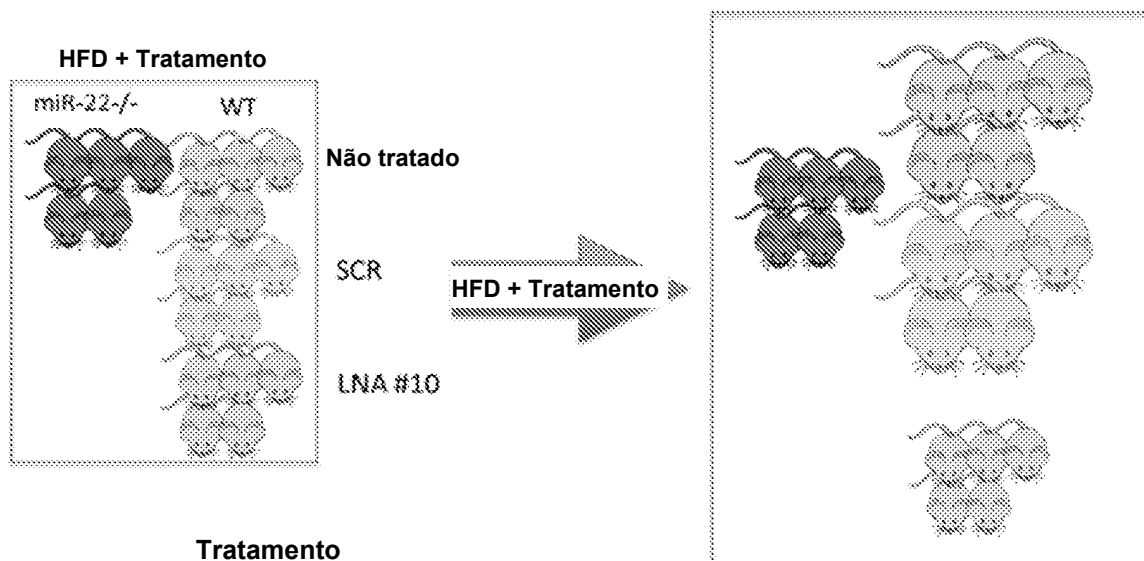


FIGURA 8



Dose de carga 20mg/kg (primeira vez)

Dose de manutenção 10mg/kg injeção IP
semanal absorção não assistida
(primeira vez)

Todos os camundongos tinham 2 meses
de idade no começo do experimento

FIGURA 9

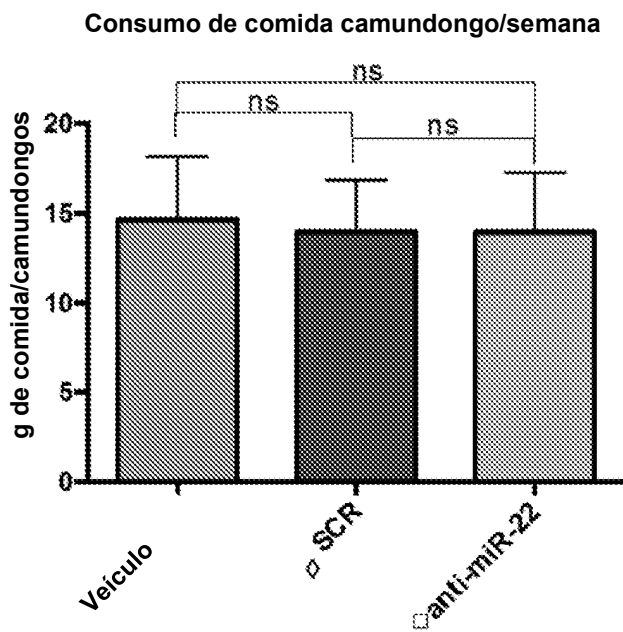
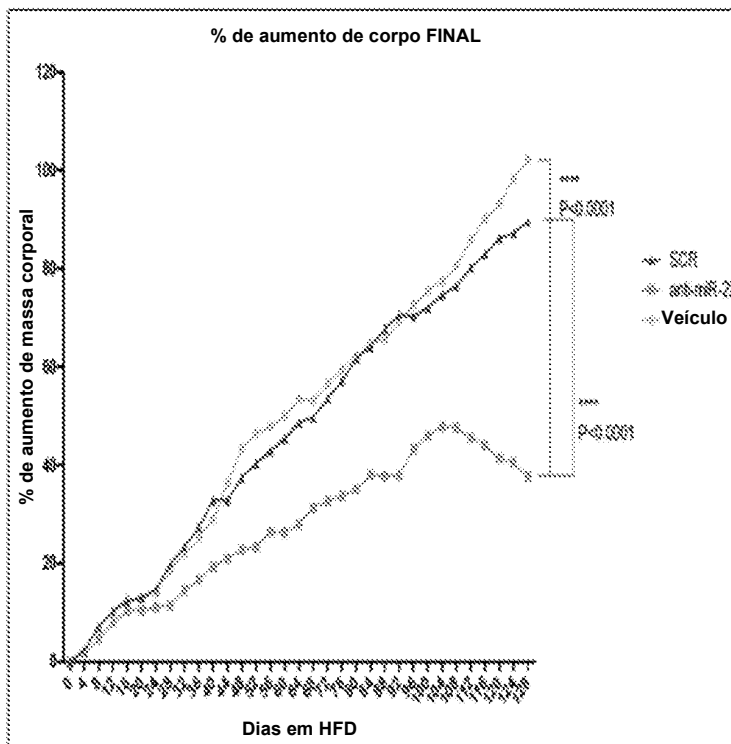


FIGURA 10

A



B

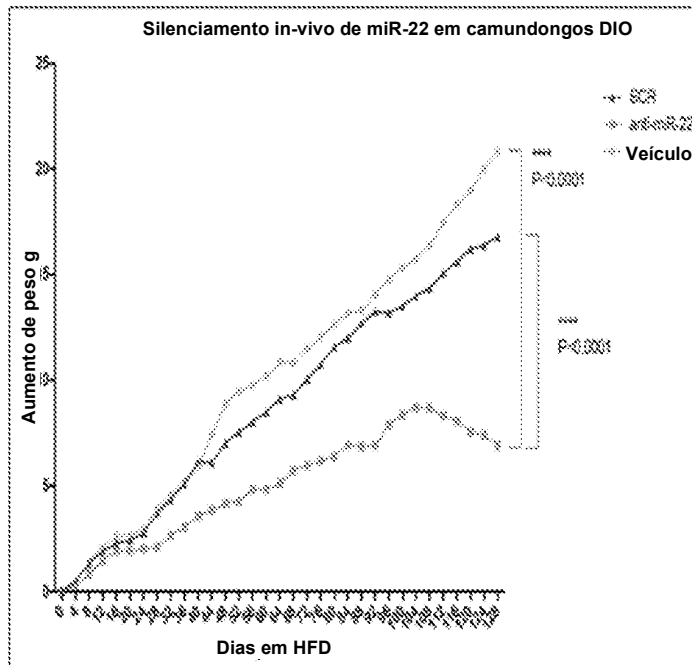


FIGURA 11

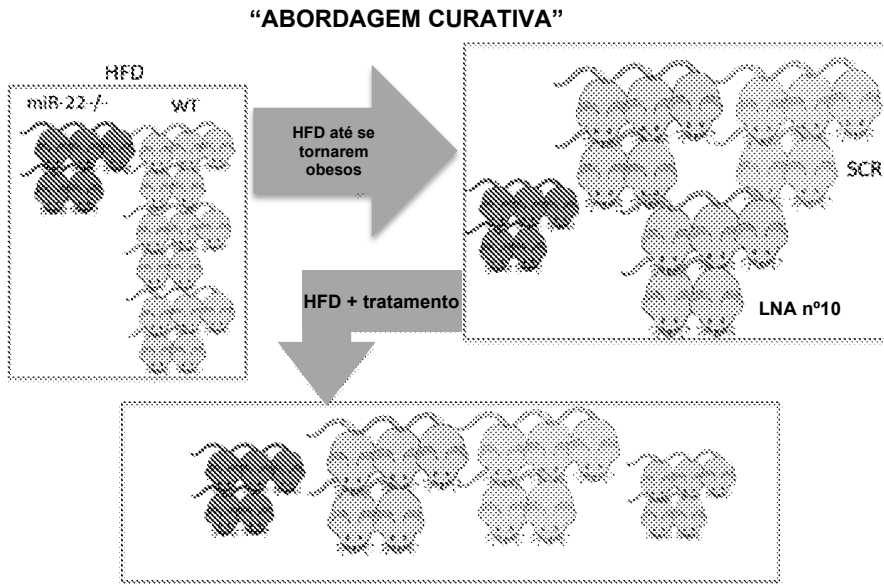


FIGURA 12

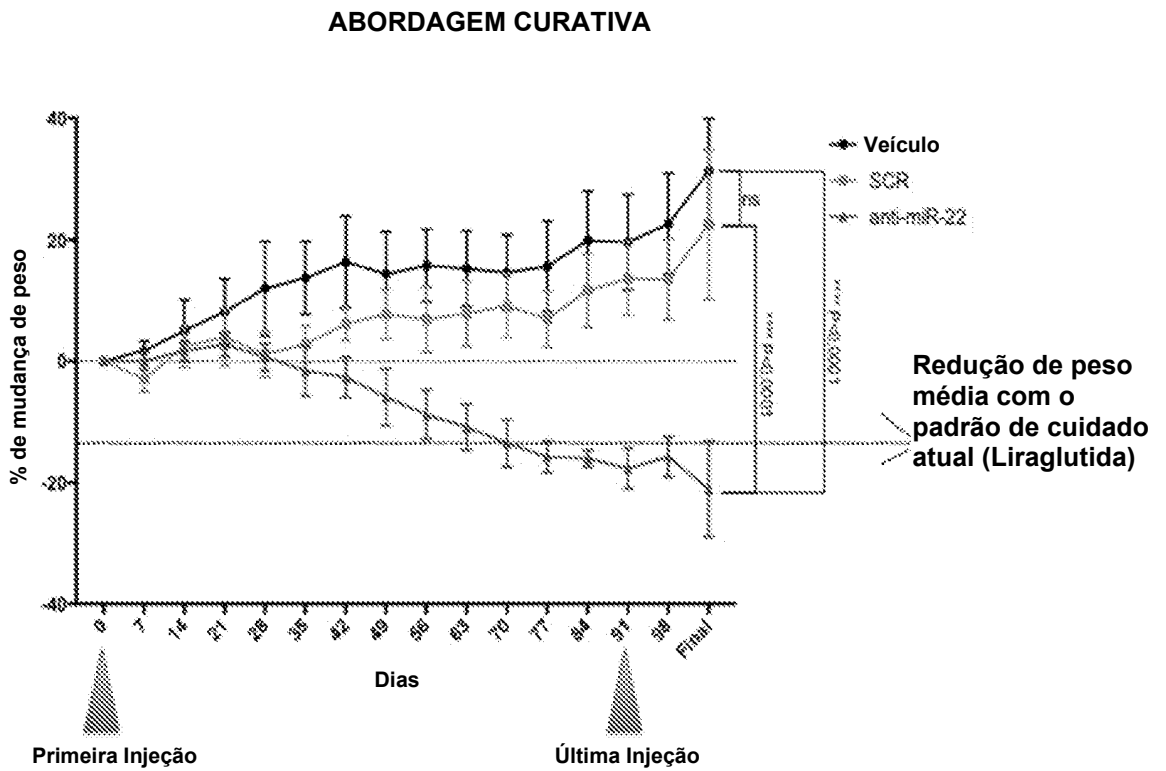


FIGURA 13

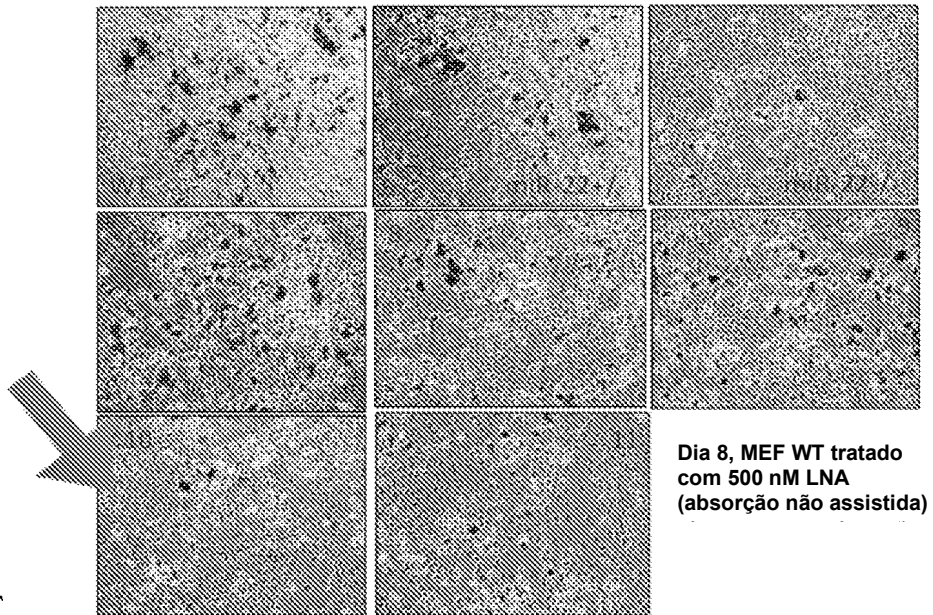


FIGURA 14

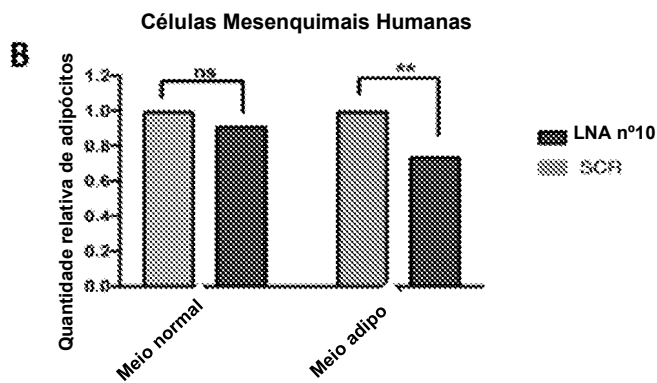
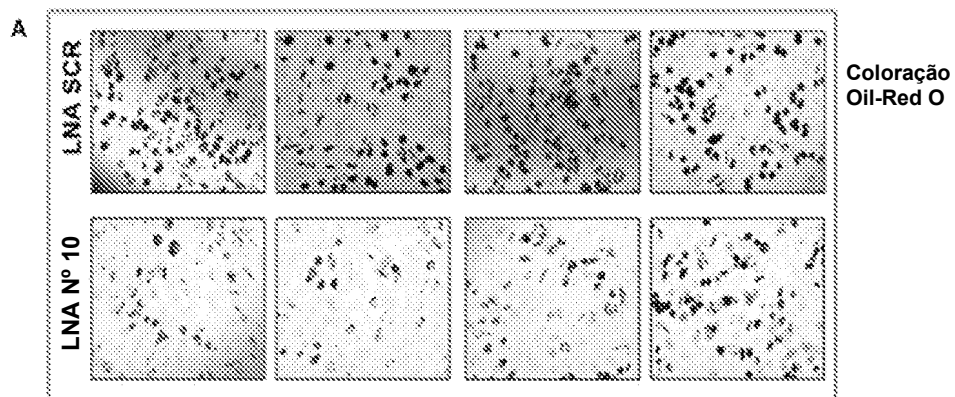
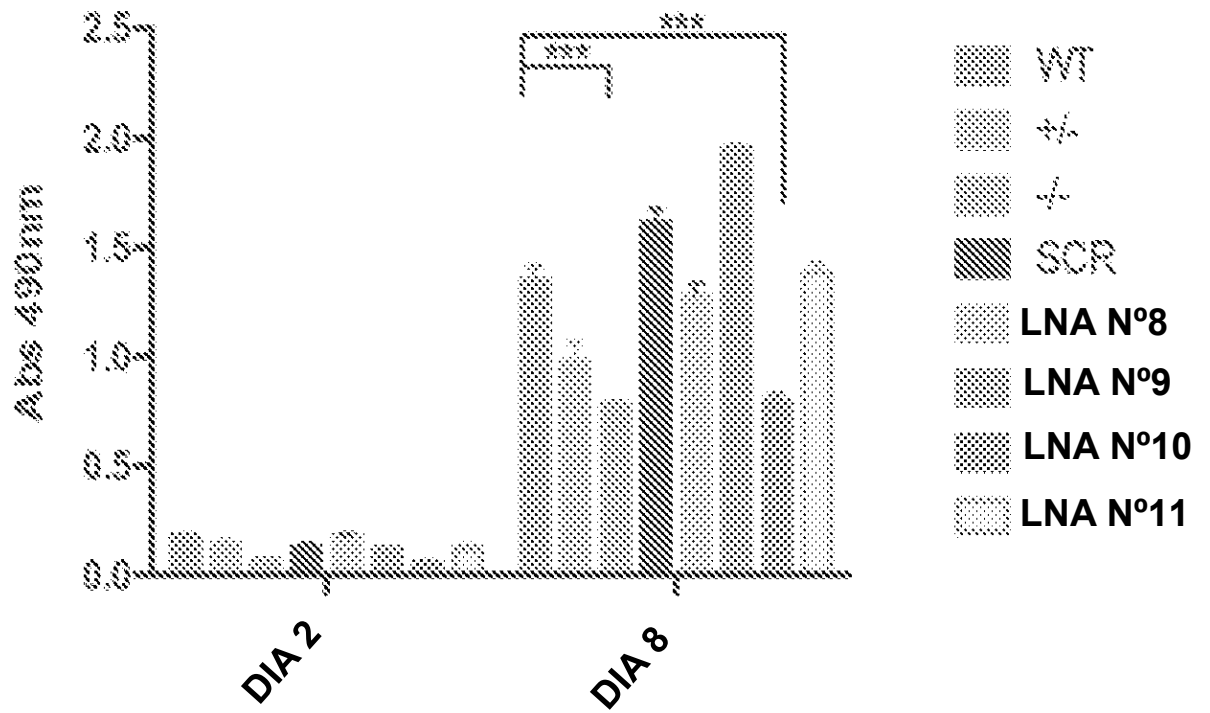


FIGURA 15

COLORAÇÃO OIL RED



RESUMO

“INIBIDORES DE MICRORNA 22”

A presente divulgação fornece composições e métodos que inibem a atividade de microRNAs, por exemplo miR-22.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: Listagem de Sequência.txt
- Data de Geração do Código: 30/09/2020
- Hora de Geração do Código: 12:07:58
- Código de Controle:
 - Campo 1: 75E8FA5C03D90E75
 - Campo 2: 1FF8A4C32C1CC7BC