

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0707160-4 A2**

(22) Data de Depósito: 18/01/2007
(43) Data da Publicação: 26/04/2011
(RPI 2103)



(51) *Int.Cl.:*
A61K 31/70

(54) Título: **USOS TERAPÊUTICOS DE INIBIDORES DE RTP801**

(30) Prioridade Unionista: 20/01/2006 US 60/760,586,
01/05/2006 US 60/796,901, 10/10/2006 US 60/851,000, 20/01/2006
US 60/760,586

(73) Titular(es): Quark Pharmaceuticals Inc, Silence Therapeutics
Ag

(72) Inventor(es): Elena Feinstein, Rami Skaliter

(74) Procurador(es): Nellie Anne Daniel Shores

(86) Pedido Internacional: PCT US2007001468 de 18/01/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/084684 de 26/07/2007

(57) Resumo: USOS TERAPÊUTICOS DE INIBIDORES DE RTPB8O1. A presente invenção fornece moléculas, composições, métodos e usos inéditos para tratar desordens microvasculares, desordens nos olhos, condições respiratórias e desordens de ouvido com base na inibição do gene e/ou proteína RTPB8O1.

"USOS TERAPÊUTICOS DE INIBIDORES DE RTP801"

Por todo este pedido, várias publicações e patentes, incluindo patentes dos Estados Unidos, são referenciadas pelo autor e ano, e patentes pelo número. As divulgações das publicações e patentes e de pedidos de patente em suas
5 integras são por meio desta incorporadas pela referência neste pedido a fim de descrever mais completamente a tecnologia de ponta à qual esta invenção diz respeito.

Campo técnico

10 A presente invenção diz respeito a moléculas de RNAsi inéditas que inibem o gene RTP801 e ao uso de tais moléculas para tratar distúrbios respiratórios de todos os tipos (incluindo distúrbios pulmonares), doenças e distúrbios oculares, distúrbios microvasculares, distúrbios relaciona-
15 dos a angiogênese e a apoptose, e deficiências auditivas.

Antecedentes da invençãoDoença pulmonar obstrutiva crônica (COPD)

A doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD) afeta mais de 16 milhões de americanos e é a quarta maior causa de
20 morte nos Estados Unidos. O consumo de cigarro ocasiona a maior parte das ocorrências de doença debilitante, mas outros fatores ambientais não podem ser excluídos (Petty TL. 2003. Definition, epidemiology, course, and prognosis of COPD. Clin. Cornerstun, 5-10).

25 Enfisema pulmonar é uma importante manifestação da COPD. A destruição permanente de espaços aéreos periféricos, distal dos bronquíolos terminais, é a marca característica do enfisema (Tuder RM, et al. Oxidative stress and apoptosis

interact and cause emphysema due to vascular endothelial growth factor blockade. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 29:88-97; 2003.). Enfisema também é caracterizado pelo acúmulo de células inflamatórias, tais como macrófagos e neutrófilos em estruturas de bronquíolos e alveolares (Petty, 2003).

A patogênese do enfisema é complexa e multifatorial. Em humanos, uma deficiência de inibidores de proteases produzida por células inflamatórias, tal como alfa1-antitripsina, mostrou contribuir para o desequilíbrio protease / antiprotease, desse modo, favorecendo a destruição da matriz extracelular alveolar em enfisema induzida por fumaça de cigarro (CS) (Eriksson, S. 1964. Pulmonary Emphysema and Alpha1-Antitrypsin Deficiency. *Acta Med Scand* 175:197-205. Joos, L., Pare, P.D., e Sandford, A.J. 2002. Genetic factors of risk of chronic obstructive pulmonary disease. *Swiss Med Wkly* 132:27-37). Metaloproteinases matrizes (MMPs) desempenham um papel central em enfisema experimental, documentado pela resistência de metaloelastase de macrófago em camundongos knockout contra enfisema ocasionada pela inalação crônica de CS (Hautamaki, et al: Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Science* 277:2002-2004). Além do mais, a sobreexpressão pulmonar de interleucina-13 em camundongos transgênicos resulta em enfisema dependente de MW e de catepsina (Zheng, T., et al 2000. Inducible targeting of IL-13 to the adult lung causes matrix metalloproteinase- and cathepsin-dependent emphysema. *J Clin Invest* 106:1081-1093). Trabalhos recentes descrevem o envolvimento da apoptose celular do septo na destruição do tecido

pulmonar que leva à enfisema (Rangasami T, et al. Genetic ablation of Nrf2 enhances susceptibility to cigarette smoke-induced emphysema in mice. Submitted to Journal of Clinical Investigation.; Tudor RM et al. Oxidative stress and apoptosis interact and cause emphysema due to vascular endothelial growth factor blockade. Am J Respir Cell Mol Biol, 29:88-97; 2003.; Yokohori N, Aoshiba K, Nagai A, Increased levels of cell death and proliferation in alveolar wall cells in patients with pulmonary emphysema. Chest. 2004 Feb; 125(2): 626-32.; Aoshiba K, Yokohori N, Nagai A., Alveolar wall apoptose causes lung destruction and emphysematous changes. Am J Respir Cell Mol Biol. 2003 M;28(5):555-62.).

Entre os mecanismos que baseiam ambas as rotas de destruição pulmonar em enfisema, a formação excessiva de espécies reativas ao oxigênio (ROS) deve ser mencionada em primeiro lugar. É bem estabelecido que existe desequilíbrio pró-oxidante / antioxidante no sangue e no tecido pulmonar de fumantes (Hulea SA, et al: Cigarette smoking causes biochemical changes in blood that are suggestive of oxidative stress: a case-control study. J Environ Pathol Toxicol Oncol. 1995; 14(3-4):173-80.; Rahman I, MacNee W. Lung glutathium and oxidative stress: implications in cigarette smoke-induced airway disease. Am J Physiol. 1999 Dec; 277(6 Pt 1):L1067-88.; MacNee W. Oxidants / antioxidants and COPD. Chest. 2000 May; 117(5 Suppl 1):303S-17S.; Marwick JA, Kirkham P, Gilmour PS, Donaldson K, MacNEE W, Rahman I. Cigarette smoke-induced oxidative stress and TGF-beta1 increase p21waf1/cip1 expression in alveolar epithelial cells. Ann NY

Acad Sci. 2002 Nov; 973:278-83.; Aoshiba K, Koinuma M, Yokohori N, Nagai A. Immunohistochemical evaluation of oxidative stress in murine lungs after cigarette smoke exposure. *Inhal Toxicol.* 2003 Sep; 15(10): 1029-38.; Dekhuijzen PN. Antioxidant properties of N-acetylcysteine: their relevance in relation to chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J.* 2004 Apr, 23(4): 629-36.; Tudor RM, Zhen L, Cho CY, Taraseviciene-Stewart L, Kasahara Y, Salvemini D, Voelkel NF, e Flores SC. Oxidative stress and apoptosis interact and cause emphysema due to vascular endothelial growth factor blockade. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 29:88-97; 2003.). Depois de uma hora de exposição de camundongos à CS, há um drástico aumento de 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG) nas células epiteliais alveolares, particularmente, do tipo II (veja *Inhal Toxicol.* 2003 Sep;15(10):1029-38. supra).

Espécies reativas ao oxigênio sobreproduzidas são conhecidas por suas atividades citotóxicas, que é originada de um efeito nocivo direto de DNA e da ativação de rotas de transdução de sinal apoptótico (Takahashi A, Masuda A, Sun M, Centonze VE, Herman B. Oxidative stress-induced apoptosis is associated with alterations in mitochondrial caspase activity and Bcl-2-dependent alterations in mitochondrial pH (pHm). *Brain Res Bull.* 2004 Feb 15;62(6):497-504.; Taniyama Y, Griendling K.K. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension.* 2003 Dec; 42(6):1075-81. Epub 2003 Oct 27.; Higuchi Y. Chromosomal DNA fragmentation in apoptosis and necrosis induced by oxidative stress. *Biochem Pharmacol.* 2003 Oct 15;66(8):1527-

35.; Punj V, Chakrabarty AM. Redox proteins in mammalian cell death: an evolutionarily conserved function in mitochondria and prokaryotes. *Cell Microbiol.* 2003 Apr;5(4):225-31.; Ueda S, Masutani H, Nakamura H, Tanaka T, Ueno M, Yodoi J. Redox controle of cell death. *Antioxid Redox Signal.* 2002 Jun; 4(3):405-14.).

ROS's não são somente citotóxicos por si mesmos, mas também são estímulos pró-inflamatórios, sendo proeminentes ativadores de fatores de transcrição sensíveis ao redox

10 NFkB e AP-1 (revisado em Rahman I. Oxidative stress and gene transcription in asthma and chronic obstructive pulmonary disease: antioxidant therapeutic targets. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 2002 Sep; 1(3):291-315.). Por sua vez, ambos os fatores de transcrição estão fortemente implicados no

15 estímulo da transcrição de citocinas pró-inflamatórias (revisado em Renard P, Raes M. The proinflammatory transcription factor NFkappaB: a potencial target for novel therapeutic strategies. *Cell Biol Toxicol.* 1999;15(6):341-4.; Lentsch AB, Ward PA. The NFkappaBb/IkappaB system in acute

20 inflammation. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2000;48(2):59-63) e proteinases degradantes de matriz (Andela VB, Gordon AH, Zotalis G, Rosier RN, Goater JJ, Lewis GD, Schwarz EM, Puzas JE, O'Keefe RJ. NFkappaB: a pivotal transcription factor in prostate cancer metastasis to bone. *Clin Orthop.* 2003

25 Oct; (415 Suppl):S75-85.; Fleenor DL, Pang IH, Clark AF. Involvement of AP-1 in interleukin-1alpha-stimulated MMP-3 expression in human trabecular meshwork cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003 Aug; 44(8):3494-501.; Ruhul Amin AR, Senga

T, Oo ML, Thant AA, Hamaguchi M. Secretion of matrix metalloproteinase-9 by the proinflammatory cytokine, IL-1 β : a role for the dual signalling pathways, Akt and Erk. *Genes Cells*. 2003 Jun;8(6):515-23.). Por sua vez, citocinas pró-inflamatórias servem como atrativos de células inflamatórias que também secretam enzimas degradantes de matriz, citocinas e espécies reativas ao oxigênio. Assim, parece que um fator patogênico, como, por exemplo, CS, dispara uma rede patológica em que espécies reativas ao oxigênio agem como os principais mediadores de destruição pulmonar.

Tanto a espécie reativa ao oxigênio (ROS) da fumaça de cigarro inalada quanto aquela endogenamente formada pelas células inflamatórias contribuem para uma maior carga oxidante intrapulmonar.

Um fator patogênico adicional em relação à patogênese COPD é a menor expressão observada de VEGF e VEGFR2 em pulmões de pacientes enfisematosos (Yasunori Kasahara, Rubin M. Tudor, Carlyne D. Cool, David A. Lynch, Sonia C. Flores, and Norbert F. Voelkel. *Endothelial Cell Death and Decreased Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 in Emphysema*. *Am J Respir Crit Care Med* Vol 163. pp 737-744, 2001). Além do mais, a inibição de sinalização VEGF usando inibidor VEGFR químico leva à apoptose celular endotelial do septo alveolar e, então, à apoptose celular epitelial, provavelmente, em função da interrupção de íntima conexão estrutural / funcional de ambos os tipos de células nos alvéolos (Yasunori Kasahara, Rubin M. Tudor, Laimute Taraseviciene-Stewart, Timo-

thy D. Le Cras, Steven Abman, Peter K. Hirth, Johannes Waltenberger, and Norbert F. Voelkel. Inhibition of VEGF receptors causes lung cell apoptosis and emphysema. J. Clin. Invest. 106:1311-1319 (2000).; Voelkel NF, Cool CD. Pulmonary vascular involvement in chronic obstructive pulmonary disease. Eur Respir J Suppl. 2003 Nov; 46: 28s-32s).

Degeneração macular

A causa mais comum de menor visão mais bem corrigida em indivíduos acima dos 65 anos de idade nos EUA é um distúrbio retinal conhecido como degeneração macular relacionada à idade (AMD). À medida que a AMD progride, a doença é caracterizada pela perda da visão aguda e central. A área ocular afetada pela AMD é a Mácula - uma pequena área no centro da retina composta, primariamente, por células fotoreceptoras. A assim denominada AMD "seca", responsável por cerca de 85 % - 90% dos pacientes de AMD, envolve alterações na distribuição do pigmento ocular, perda de fotorreceptores e menor função retinal em função da total atrofia das células. A assim denominada AMD "molhada" envolve a proliferação de vasos coroidais anormais que leva a coágulos ou cicatrizes no espaço subretinal. Assim, o início de AMD molhada ocorre em virtude da formação de uma rede neovascular coroidal anormal (neovascularização coroidal, CNV) debaixo da retina neural. Os vasos sangüíneos recém-formados vazam excessivamente. Isto leva ao acúmulo de fluido subretinal e sangue levando à perda de acuidade visual. Eventualmente, há perda total de retina funcional na região envolvida, à medida que uma grande cicatriz disquiforme que envolve as coróí-

des e a retina se forma. Embora pacientes da AMD seca possam reter visão de menor qualidade, freqüentemente, AMD molhada resulta em cegueira. (Hamdi & Kenney, Age-related Macular degeneration - a new viewpoint, *Frontiers in Bioscience*, e305-314, May 2003). CNV ocorre não somente na AMD molhada, mas também em outras patologias oculares, tais como, síndrome da histoplasiose ocular, estrias angióides, rupturas na membrana de Bruch, degeneração miópica, tumores oculares e certas doenças degenerativas da retina.

Vários estudos conduzidos determinaram diversos fatores de risco de AMD, tais como fumar, envelhecimento, histórico familiar (Milton, *Am J Ophthalmol* 88, 269 (1979); Mitchell et al., *Ophthalmology* 102, 1450-1460 (1995); Smith et al., *Ophthalmology* 108, 697-704 (2001)) sexo (7-fold higher likelihood in females: Klein et al., *Ophthalmology* 99, 933-943 (1992) e raça (brancos são mais suscetíveis). Fatores de risco adicionais podem incluir características oculares, tais como, hipermetropia (hiperopia) e olhos de coloração clara, bem como doença cardiovascular e hipertensão. Evidência de envolvimento genético na progressão do início da doença também foi documentada (veja Hamdi & Kenney supra).

Duas empresas, Acuity Pharmaceuticals e Sima Therapeutics, depositaram recentemente um IND para moléculas de RNAsi que inibem VEGF e VEGF-R1 (Flt-1), respectivamente, para o tratamento de AMD. Estas moléculas são chamadas de inibidor Cand5 e de inibidor 027, respectivamente.

Distúrbios microvasculares

Distúrbios microvasculares são compostos por um

amplo grupo de distúrbios que afetam primariamente os vasos capilares microscópicos e o sistema linfático e, portanto, estão fora do escopo da intervenção cirúrgica direta. A doença microvascular pode ser amplamente agrupada em vasospástica, vasculite e oclusiva linfática. Adicionalmente, muitos dos distúrbios vasculares conhecidos têm um elemento microvascular em si.

* Doença Vasospástica - Doenças vasospásticas são um grupo de distúrbios relativamente comuns em que, por motivos desconhecidos, os reflexos vasoconstritivos periféricos são hipersensíveis. Isto resulta em vasoconstrição inapropriada e isquemia de tecido, até o ponto da perda de tecido. Usualmente, sintomas de vasospástica são relacionados à temperatura ou ao uso de maquinário vibratório, mas podem ser secundário em relação a outros distúrbios.

* Doença Vasculítica - Doenças vasculíticas são aquelas que envolvem um processo inflamatório primário na microcirculação. Usualmente, vasculite é um componente de um distúrbio auto-imune ou distúrbio do tecido conjuntivo e, no geral, não é tratável por tratamento cirúrgico, mas exige tratamento imunossupressivo se os sintomas forem severos.

* Doença Oclusiva Linfática - Inchaço crônico do membro inferior ou superior (linfoedema) é o resultado de oclusão linfática periférica. Esta é uma condição relativamente rara que tem um grande número de causas, algumas herdadas, algumas adquiridas. Os suportes principais do tratamento são vestuários de compressão corretamente instalados e o uso de dispositivo de compressão intermitente.

Patologias microvasculares associadas com diabetes

Diabetes é a principal causa de cegueira, a causa número um de amputações e de impotência, e uma das doenças infantis crônicas com ocorrência mais freqüente. Diabetes também é a principal causa de doença renal em estágio terminal nos Estados Unidos, com uma taxa de prevalência de 31 % em comparação com outras doenças renais. Diabetes também é a indicação mais freqüente para transplante de rins, responsável por 22 % de todas as operações de transplante.

No geral, complicações diabéticas podem ser classificadas amplamente como doença microvascular ou macrovascular. Complicações microvasculares incluem neuropatia (dano do nervo), nefropatia (doença renal) e distúrbios da visão (por exemplo, retinopatia, glaucoma, catarata e doença de córnea). Na retina, glomérulo, e vasa nervorum, recursos patofisiológicos similares caracterizam doença microvascular específica de diabetes.

Patologias microvasculares associadas com diabetes são definidas como uma doença dos vasos sanguíneos menores (vasos capilares) que pode ocorrer, por exemplo, em pessoas que tiveram diabetes por um longo tempo. As paredes dos vasos ficam anormalmente espessas, mas fracas. Portanto, eles sangram, vazam proteína e diminuem o fluxo sanguíneo através do corpo.

Dados clínicos e de modelo animal indicam que hiperglicemia crônica é o fator de iniciação central para todos os tipos de doença microvascular diabética. Tanto a duração quanto a magnitude da hiperglicemia são fortemente

correlacionadas com a quantidade e a taxa de progressão da doença microvascular diabética. Embora todas as células diabéticas sejam expostas a elevados níveis de glicose plasmática, o dano hiperglicêmico é limitado àqueles tipos de células (por exemplo, células endoteliais) que desenvolvem hiperglicemia intracelular. Células endoteliais desenvolvem hiperglicemia intracelular em virtude de, diferente de muitas outras células, elas não poderem regular para baixo o transporte de glicose quando expostas a hiperglicemia extracelular. É adicionalmente demonstrado que a hiperglicemia intracelular é necessária e suficiente para o desenvolvimento de patologia diabética pelo fato de que a sobreexpressão do transporte de glicose GLUT1 em células mesangiais colocadas em cultura em um meio de glicose normal imita o fenótipo diabético, induzindo os mesmos aumentos no colágeno tipo IV, colágeno tipo I, e expressão genética de fibronectina como hiperglicemia diabética.

Função Celular Endotelial Anormal: Inicialmente no curso da diabetes mellitus, antes que as mudanças estruturais fiquem evidentes, a hiperglicemia causa anormalidades no fluxo sanguíneo e permeabilidade vascular na retina, no glomérulo, e no vasa nervorum do nervo periférico. O aumento do fluxo sanguíneo e da pressão intracapilar é concebido para refletir a menor produção de óxido nítrico (NO) induzida por hiperglicemia no lado eferente dos leitos capilares e, possivelmente, uma maior sensibilidade a angiotensina II. Como uma consequência da maior pressão intracapilar e da disfunção celular endotelial, vasos capilares da retina exi-

bem maior vazamento de fluoresceína e os vasos capilares glomerulares têm uma elevada taxa de excreção de albumina (AER). Mudanças comparáveis ocorrem no vasa vasorum do nervo periférico. Inicialmente no curso do diabetes, a maior permeabilidade é reversível à medida que o tempo progride, entretanto, ele se torna irreversível.

Maior Acúmulo de Proteína na Parede do Vaso

O recurso patofisiológico comum da doença microvascular diabética é o progressivo estreitamento e eventual oclusão de lumina vascular, o que resulta em perfusão e função inadequadas dos tecidos afetados. Hipertensão microvascular inicialmente induzida por hiperglicemia e maior permeabilidade vascular contribuem para a oclusão irreversível do microvaso por três processos:

* O primeiro é um vazamento anormal de proteínas plasmáticas contendo carboidrato com ácido Schiff periódico (PAS) positivo, que são depositadas na parede do vaso capilar e que podem estimular células perivasculares, tais como perícitos e células mesangiais, para elaborar fatores de crescimento e matriz extracelular.

* O segundo é o extravasamento de fatores de crescimento, tais como fator de crescimento transformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), que estimula diretamente a superprodução de componentes da matriz extracelular e podem induzir a apoptose em certos tipos de células com complicação relevante.

* O terceiro é estímulo induzido por hipertensão de expressão genética patológica por células endoteliais e células de suporte, que incluem transportadores de glicose

glut-1, fatores de crescimento, receptores de fator de crescimento, componentes de matriz extracelular e moléculas de adesão que podem ativar leucócitos circulantes. A observação de que a redução unilateral na severidade da doença microvascular diabética ocorre no lado com arteriostenose oftálmica ou renal é consistente com este conceito.

Perda de Célula Microvascular e Oclusão de Vaso

O progressivo estreitamento e a oclusão de lumina microvascular diabética também são acompanhados pela perda de célula microvascular. Na retina, diabetes mellitus induz morte celular programada de células Müller e de células de gânglio, de perícitos, e de células endoteliais. No glomérulo, a função renal declinante é associada com oclusão de capilar expandida e perda de podócito, mas os mecanismos que fundamentam a perda de célula glomerular ainda não são conhecidos. No vasa nervorum, ocorre degeneração de célula endotelial e de perícito, e estas mudanças microvasculares parecem preceder o desenvolvimento de neuropatia periférica diabética. A distribuição multifocal de degeneração axonal em diabetes suporta um papel causal para oclusão microvascular, mas a indução por hiperglicemia diminui em neurotrofinas pode contribuir pelo impedimento de reparo e regeneração axonal normal.

Um outro recurso comum da doença microvascular diabética foi denominado memória hiperglicêmica, ou a persistência ou progressão de alterações microvasculares induzidas por hiperglicemia durante subseqüentes períodos de homeostase normal de glicose. O exemplo mais impressionante deste

fenômeno é o desenvolvimento de severa retinopatia em olhos histologicamente normais de cães diabéticos que ocorreu inteiramente durante um período de 2,5 anos de glicose sanguínea normalizada que seguiu 2,5 anos de hiperglicemia. O aumento induzido por hiperglicemia na transcrição genética da matriz selecionada também persiste por semanas depois da restauração de normoglicemia in vivo, e um menos pronunciado, mas qualitativamente similar, prolongamento do aumento induzido por hiperglicemia na transcrição genética da matriz selecionada ocorre em células endoteliais colocadas em cultura.

Para informação adicional, veja "Shared pathophysiologic features of microvascular complications of diabetes" (Larsen: Williams Textbook of Endocrinology, 10th ed., Copyright © 2003 Elsevier).

Complicações microvasculares ocorrem não somente em diabetes observável, mas também ocorrem em função de Tolerância de Glicose Danificada (IGT). Complicações microvasculares de IGT: neuropatia, retinopatia, e microproteínúria renal.

Neuropatia Diabética

Neuropatias diabéticas são distúrbios neuropáticos (dano do nervo periférico) que são associados com diabetes mellitus. Usualmente, estes distúrbios resultam de lesão microvascular diabética que envolve pequenos vasos sanguíneos que suprem os nervos (vasa nervorum). Distúrbios relativamente comuns que podem ser associados com neuropatia diabética incluem paralisia do terceiro nervo, mononeuropatia,

mononeuropatia multiplex, amiotrofia diabética, uma dolorosa polineuropatia, neuropatia autonômica e neuropatia toracoabdominal, e a forma mais comum, neuropatia periférica, que afeta principalmente os pés e as pernas. Há quatro fatores
5 envolvidos no desenvolvimento de neuropatia diabética: doença microvascular, produtos glicolizados finais avançados, proteína quinase C e a rota de poliol.

Doença microvascular em neuropatia diabética

Doenças vasculares e neurais são intimamente relacionadas e misturadas. Vasos sanguíneos dependem da função
10 nerval normal, e nervos dependem de fluxo sanguíneo adequado. A primeira mudança patológica na microvasculatura é a vasoconstrição. À medida que a doença progride, a disfunção neuronal se correlaciona intimamente com o desenvolvimento
15 de anormalidades vasculares, tais como o espessamento da membrana da base do vaso capilar e hiperplasia endotelial, que contribuem para a menor tensão de oxigênio e hipóxia. A isquemia neuronal é uma característica bem estabelecida de neuropatia diabética. Agentes vasodilatadores (por exemplo,
20 inibidores angiotensina-converting-enzyme, antagonistas alfa) podem levar a melhorias substanciais no fluxo sanguíneo neuronal, com melhorias correspondentes nas velocidades de condução nerval. Assim, a disfunção microvascular ocorre inicialmente em diabetes, paralela à progressão da disfunção
25 neural, e pode ser suficiente para suportar a severidade das mudanças estrutural, funcional e clínica observadas na neuropatia diabética. A neuropatia periférica (pernas), neuropatia sensorimotor é um componente significativo na patogê-

nese de úlceras na perna em diabetes.

Neuropatia é uma complicação comum de diabetes que ocorre durante o tempo em mais da metade dos pacientes com diabetes tipo 2. Estudos de condução nerval demonstram que neuropatia já está presente em 10 - 18 % dos pacientes no momento do diagnóstico do diabetes, sugerindo que a lesão do nervo periférico ocorre em estágios iniciais da doença e com desregulação glicêmica mais suave. O conceito de que a neuropatia é um sinal clínico inicial de diabetes foi proposto > 40 anos atrás, e a maior parte dos estudos relata uma associação entre IGT e neuropatia. A maior parte dos pacientes com IGT e neuropatia associada tem um polineuropatia sensorial simétrica distal com dor neuropática proeminente. Neuropatia IGT (Microvascular complications of impaired glucose tolerance - Perspectives in Diabetes, J. Robinson Singleton, in Diabetes December 1, 2003) é fenotipicamente similar à neuropatia diabética inicial, que também causa sintomas sensoriais, incluindo dor, e disfunção autonômica. Em uma pesquisa de 669 pacientes com neuropatia diabética inicial, sintomas sensoriais estavam presentes em > 60 %, impotência em quase 40 %, e outro envolvimento autonômico em 33 %, mas evidência de envolvimento motor em somente 12 %. Estes achados clínicos sugerem envolvimento inicial proeminente das pequenas fibras de nervo não mielinadas que conduzem dor, temperatura e sinais autonômicos. Quantização direta de fibras de nervo intraepidérmico não mielinado das biópsias da pele mostra perda de fibra similar e morfologia alterada em pacientes com neuropatia associada com IGT e diabetes inici-

al.

Disfunção autonômica, particularmente disfunção erétil e resposta vagal cardíaca alterada, são recursos iniciais comuns da lesão neuropática em diabetes. Trabalho com
5 pacientes IGT também sugere disautonomia vagal prevalente: estudos separados descobriram recuperação de taxa cardíaca anormal depois do exercício, variabilidade do intervalo R-R rombudo em relação à respiração profunda, e expiração reduzida em relação à taxa de inspiração (todas as medidas de
10 disautonomia vagal) em uma maior fração de pacientes IGT do que sujeitos em controle normoglicêmico com idade casada.

Dano do nervo em diabetes afeta as fibras motores, sensoriais e autonômicas. Neuropatia motor causa fraqueza muscular, atrofia e paresia. Neuropatia sensorial leva à
15 perda das sensações protetoras de dor, pressão, e calor. A ausência de dor leva a muitos problemas no pé insensível, incluindo ulceração, trauma não percebido e neuroartropatia de Charcot. O paciente pode não buscar tratamento até depois que o ferimento tenha avançado. Uma combinação de disfunção
20 sensorial e motor pode fazer com que o paciente coloque tensões anormais no pé, resultando em trauma, o que pode levar à infecção. Neuropatia simpática autonômica causa vasodilatação e menor sudorese, o que resulta em aquecimento, pés excessivamente secos que são particularmente propensos à
25 ruptura da pele, bem como em alterações funcionais no fluxo microvascular. A disfunção autonômica (e denervação das estruturas dérmicas) também resulta na perda de integridade da pele, o que fornece um local ideal para a invasão microbia-

na. O pé neuropático não passa por ulceração espontânea. Em vez disto, ela é a combinação de alguma forma de trauma acompanhada pela neuropatia.

5 A disfunção microvascular ocorre inicialmente em diabetes, paralela à progressão da disfunção neural, e pode ser suficiente para suportar a severidade das mudanças estruturais, funcionais e clínicas observadas na neuropatia diabética.

10 Produtos glicolizados finais avançados - Elevados níveis intracelulares de glicose causam uma ligação covalente não enzimática com proteínas, o que altera suas estruturas e destrói suas funções. Algumas destas proteínas glicolisadas são implicadas na patologia de neuropatia diabética e em outras complicações de diabetes de longo prazo.

15 Proteína quinase C (PKC) - PKC é implicada na patologia de neuropatia diabética. Maiores níveis de glicose causam um aumento no diacilglicerol intracelular, o que ativa PKC. Inibidores PKC em modelos animais aumentarão velocidade da condução nerval pelo aumento do fluxo sanguíneo neuronal.
20 ronal.

Polineuropatia sensorimotor

Fibras de nervo mais longas são afetadas em um grau maior do que as mais curtas em virtude de a velocidade da condução nerval ser diminuída em proporção ao comprimento
25 de um nervo. Nesta síndrome, menores sensação e perda de reflexos ocorrem primeiro nos dedos dos pés bilateralmente, então, se estende para cima. Usualmente, ela é descrita como distribuição nas extremidades dos membros, perda sensorial,

disestesia e dor noturna. A dor pode ser percebida como queimadura, sensação de formigamento, dolorosa ou embotamento. Sensação de comichão é comum. Perda de propriocepção, isto é, o sentido de onde um membro está no espaço é afetado inicialmente. Estes pacientes não podem sentir quando eles estão pisando em um corpo estranho, como um estilhaço, ou quando eles estão desenvolvendo um calo por causa de sapato mal ajustado. Consequentemente, eles estão em risco de desenvolver úlceras e infecções nos pés e nas pernas, o que pode levar à amputação. Similarmente, estes pacientes podem sofrer múltiplas fraturas do joelho, tornozelo ou pé, e podem desenvolver uma junta de Charcot. A perda de função motora resulta em contraturas em dorsoflexão dos dedos dos pés, assim denominadas dedos em forma de martelo. Estas contraturas ocorrem não somente no pé, mas também na mão.

Neuropatia autonômica

O sistema nervoso autonômico é composto por nervos que servem o coração, o trato GI e o sistema urinário. A neuropatia autonômica pode afetar qualquer um destes sistemas de órgãos. A disfunção autonômica mais comumente reconhecida em diabéticos é a hipotensão ortostática ou a desconfortável sensação de desmaio quando um paciente fica de pé. No caso da neuropatia diabética autonômica, ela ocorre em função da falência cardíaca e de artérias para ajustar apropriadamente a taxa cardíaca e tom vascular para manter o sangue fluindo contínua e completamente até o cérebro. Usualmente, este sintoma é acompanhado por uma perda de variação respiratória do seio, isto é, a mudança usual na taxa

cardíaca vista com a respiração normal. Quando estes dois achados estão presentes, neuropatia cardíaca autonômica está presente.

Manifestações do trato GI incluem esvaziamento
5 gástrico atrasado, gastroparesia, náusea, inchaço e diarréia. Em virtude de muitos diabéticos tomarem medicamento oral para suas diabetes, a absorção destes remédios é enormemente afetada pelo esvaziamento gástrico atrasado. Isto pode levar a hipoglicemia quando um agente diabético oral for tomado
10 antes de uma refeição e não for absorvido por horas ou, algumas vezes, dias depois, quando já há índice normal ou baixo de açúcar no sangue. Movimento moroso do intestino delgado pode causar o supecrescimento bacteriano, que fica pior pela presença de hiperglicemia. Isto leva ao inchaço, gás e
15 diarréia.

Sintomas urinários incluem frequência urinária, urgência, incontinência e retenção. Novamente, em virtude da retenção de urina doce, infecções do trato urinário são frequentes. A retenção urinária pode levar a divertículos da
20 bexiga, pedras, nefropatia de refluxo.

Neuropatia craniana

Quando os nervos cranianos são afetados, neuropatias oculomotores (3ª) são mais comuns. O nervo oculomotor controla todos os músculos que movem o olho com a exceção
25 dos músculos retos laterais e oblíquos superiores. Ele também serve para constriuir a pupila e para abrir a pálpebra. Usualmente, o início da paralisia de um terceiro nervo diabético é abrupto, começando com dor frontal ou periorbital

e, então, diplopia. Todos os músculos oculomotores enervados pelo terceiro nervo podem ser afetados, exceto aqueles que controlam o tamanho da pupila. O sexto nervo, o nervo abducente, que enerva o músculo reto lateral ocular (move o olho lateralmente), também é comumente afetado, mas o envolvimento do quarto nervo, o nervo troclear, (enerva o músculo oblíquo superior, que move o olho para baixo) não é usual. Mononeuropatias dos nervos torácicos ou da espinha lombar podem ocorrer e levar a dolorosas síndromes que imitam o infarto do miocárdio, colecistite ou apendicite. Diabéticos têm uma maior incidência de neuropatias compressivas, tal como síndrome do túnel carpal.

Isquemia Diabética de Membro e Úlceras Diabéticas no Pé

Diabetes e pressão podem prejudicar a circulação microvascular e levar a mudanças na pele nas extremidades inferiores que, por sua vez, podem levar à formação de úlceras e subsequente infecção. Mudanças microvasculares levam à microangiopatia de músculo do membro, bem como a uma predisposição a desenvolver isquemia periférica e a uma reduzida resposta compensatória de angiogênese a eventos isquêmicos. A patologia microvascular exacerba a Doença Vascular Periférica (PVD) (ou Doença Arterial Periférica (PAD) ou Doença Arterial da Extremidade Inferior (LEAD)) uma complicação macrovascular que estreita as artérias das pernas em função de arteriosclerose. PVD ocorre mais cedo em diabéticos, é mais severa e difundida e, freqüentemente, envolve problemas microcirculatórios intercorrentes que afetam as pernas, olhos

e rins.

Úlceras no pé e gangrena são distúrbios comórbidos frequentes da PAD. Neuropatia periférica concorrente com sensação de debilidade torna o pé suscetível a trauma, ulce-
5 ração e infecção. A progressão da PAD em diabetes é composta por tal comorbidade como neuropatia periférica e insensibilidade dos pés e extremidades inferiores à dor e ao trauma. Com circulação debilitada e sensação de debilidade, ocorrem ulceração e infecção. A progressão para osteomielite e gan-
10 grena pode necessitar de amputação.

É até 25 vezes mais provável que pessoas com diabetes passem por uma amputação de membro inferior do que pessoas não diabéticas, ressaltando a necessidade de impedir úlceras no pé e subsequente perda de membro. Úlceras diabé-
15 ticas do pé podem ocorrer não somente em conjunto com a PAD, mas também pode ser associada com neuropatia, insuficiência venosa (veias com varizes), trauma e infecção. A PAD contribui para estes outros distúrbios na produção ou precipitação de úlceras no pé. Úlceras no pé não representam, necessariamente, progressão da PAD, já que elas podem ocorrer na pre-
20 sença de adequado perfusão arterial periférica clínica. Estudos com base em paciente indicam um maior risco de ulceração no pé em pacientes diabéticos que têm neuropatia periférica e uma maior pressão plantar no pé. A prevalência de um
25 histórico de úlceras ou chagas no pé ou tornozelos foi 15 % de todos os pacientes diabéticos no estudo com base em população no sul do Wisconsin. A prevalência foi maior para indivíduos diabéticos diagnosticados com < 30 anos de idade,

foi ligeiramente mais alta em homens (16 %) do que em mulheres (13 %), e foi maior em pacientes diabéticos tratado com insulina (17 %) do que em pacientes que não tomam insulina (10 %). A prevalência aumentou com a idade, especialmente em
5 pacientes diabéticos diagnosticados com < 30 anos de idade. Em estudos em pacientes da Europa, a prevalência de úlceras no pé em pacientes diabéticos foi de 3 % naqueles com < 50 anos de idade, 7 % naqueles com < 60 anos de idade e 14 % naqueles com < 80 anos de idade. A prevalência foi maior em
10 machos do que em fêmeas com 70 anos de idade.

Em pacientes diabéticos, isquemia e infecção no pé são serias ocorrências e, até mesmo, com risco de morte. Entretanto, a neuropatia é a condição mais difícil de tratar. A literatura médica e cirúrgica que considera todos os aspectos das manifestações clínicas e patológicas do pé diabético é decisiva. Neuropatia, angiopatia, retinopatia e nefropatia, sozinhas ou em combinação e em variados graus de
15 severidade, podem influenciar o tratamento do pé diabético.

A cada ano, 82.000 amputações de membro são realizadas em pacientes com diabetes mellitus. A maioria destas amputações é realizada na população mais idosa. Amputações que resultam de diabetes podem surgir de múltiplos etiologias, incluindo úlceras no pé, isquemia, úlceras venosas na perna (isto é, aquelas secundárias em relação ao refluxo venoso) e úlceras no calcanhar (isto é, aquelas resultantes
25 das úlceras de pressão não tratadas no calcanhar). A maioria destas amputações se origina das úlceras. A prevalência de úlceras no pé entre pacientes com diabetes é de 12 %. Além

do mais, a incidência cumulativa de 20 anos das úlceras de extremidade inferior em pacientes com diabetes tipo I é de 9,9 %. Amputações de membro induzidas por diabetes resultam em uma taxa de mortalidade de 5 anos de 39 % até 68 %, e são associadas com um maior risco de amputações adicionais. A duração da permanência em hospital é aproximadamente 60 % maior entre pacientes com úlceras diabéticas no pé, se comparado com aqueles sem úlceras.

Neuropatia diabética debilita o reflexo axônio do nervo que depende da função nociceptora da fibra C saudável e causa vasodilatação local em resposta a um estímulo doloroso. Esta condição compromete adicionalmente o resposta vasodilatadora presente em distúrbios de tensão, tais como lesão ou inflamação, no pé diabético neuropático. Esta debilitação pode explicar parcialmente porque algumas úlceras no pé diabético neuropático são lentas para curar ou não curam de nenhuma maneira, apesar da revascularização com sucesso da extremidade inferior.

Assim, a rota causal mais comum para a ulceração diabética no pé pode ser identificada como a combinação de neuropatia (perda sensorial), deformidade (por exemplo, cabeças metatársicas proeminente) e trauma (por exemplo, calçados mal ajustados).

A maior parte dos cirurgiões prefere realizar desvio arterial popliteal ou tibial em virtude de taxas inferiores de salvação e revelação de membro se comparadas com procedimentos mais proximais. Foi relatado que se o desvio arterial popliteal ou tibial for incapaz de restaurar um

pulso palpável no pé, o desvio pedal fornece um procedimento de salvação de membro mais durável e efetivo para pacientes com diabetes e ferimentos isquêmico no pé. Mesmo a doença oclusiva multi-segmento extensiva em pacientes com diabetes não apresenta um impedimento para o salvamento do pé. Apesar de sérias complicações de ferimento poder ter resultados desastrosos, elas são incomuns depois do enxerto do desvio pedal. Controle adequado de infecção pré-existente no pé e cuidadoso tunelamento de enxerto mostraram ser efetivos para evitar complicações adicionais. Angioplastia na extremidade inferior está sendo progressivamente mais utilizada. Entretanto, deve-se enfatizar que para que a angioplastia seja efetiva, um vaso distal ou vaso de alimentação deve estar presente se a angioplastia mais proximal deve ter sucesso.

Embora úlceras diabéticas / patologias de membro possam ser tratadas em alguns pacientes (por debridamento, tratamento com antibiótico, uso de preparações para estimular tecido de granulação (novos colágeno e angiogênese) e redução de carga bacteriana no ferimento), será benéfico ter uma composição farmacêutica que pode mais bem tratar estes distúrbios e/ou aliviar os sintomas.

Para informação adicional, veja American Journal of Surgery, Volume 187 • Number 5 Suppl 1 May 1, 2004, Copyright © 2004 Elsevier .

Disfunção microvascular coronária em diabetes

A correlação entre histopatologia e disfunção microcirculatória em diabetes é bem conhecida de estudos experimentais antigos e de autópsia, em que o espessamento da

membrana basal, fibrose perivascular, rareação vascular e hemorragia do vaso capilar são freqüentemente encontrados. Permanece difícil confirmar estes dados in vivo, embora um documento recente tenha demonstrado uma correlação entre a

5 patologia e a disfunção microvascular ocular (Am J Physiol 2003;285). Entretanto, uma grande quantidade de estudos clínicos indica que não somente diabetes observável, mas também controle metabólico debilitado, podem afetar a microcirculação coronária (Hypert Res 2002;25:893). Werner aludiu ao im-

10 portante documento de Sambuceti et al (Circulation 2001; 104:1129) que mostra a persistência da disfunção microvascular em pacientes depois da reabertura com sucesso da artéria relacionada ao infarto, e que pode explicar a maior morbidez cardiovascular e mortalidade nestes pacientes. Há evidência

15 crescente de grandes estudos de reperfusão aguda de que a morbidez e a mortalidade não são relacionadas com a própria reabertura da artéria relacionada ao infarto, mas muito mais dependente do fluxo+/- TIMI do rubor miocardial (Stone 2002; Feldmann Circulation 2003). Herrmann indicou, entre outros,

20 que, provavelmente, a integridade da microcirculação coronária é o fator clínico e prognóstico mais importante neste contexto (Circulation 2001). O efeito neutro do dispositivo de proteção (nenhuma mudança relevante para o fluxo TIMI para resolução ST ou para MACE) pode indicar que uma debilida-

25 de funcional da microcirculação é o principal determinante do prognóstico. Também há evidência crescente de que a disfunção microvascular coronária desempenha um papel principal na CAD não obstrutiva. Disfunção endotelial coronária perma-

nece um forte preditor de prognóstico nestes pacientes.

Nefropatia diabética (Disfunção renal em pacientes com diabetes)

Nefropatia diabética abrange microalbuminúria (um
5 efeito da doença microvascular), proteinúria e ESRD. Diabetes é a causa mais comum de falha renal, responsável por mais de 40 por cento dos novos casos. Mesmo quando medicamentos e dieta alimentar são capazes de controlar a diabetes, a doença pode levar à nefropatia e à falha renal. A maior parte das pessoas com diabetes não desenvolve nefropatia que é
10 severa o suficiente para causar falha renal. Cerca de 16 milhões de pessoas nos Estados Unidos têm diabetes, e cerca de 100.000 pessoas têm falha renal em decorrência da diabetes.

Retinopatia diabética

15 No estado diabético, a hiperglicemia leva ao menor fluxo sanguíneo na retina, hiperpermeabilidade na retina, atrasos na condução nerval do fotorreceptor e morte celular neuronal da retina. Em diabetes de curta duração, morte celular neuronal foi identificada na camada nuclear interna da
20 retina. Especificamente, a apoptose foi localizada em células gliais, tais como células Mueller e astrócitos, mostrou-se ocorrer em 1 mês de diabetes no modelo de rato diabético induzido por STZ. A causa destes eventos é multifatorial, incluindo a ativação da rota diacilglicerol / PKC, tensão
25 oxidante e glicosilação não enzimática. A combinação destes eventos produz a retina hipóxica e, em última análise, leva ao desenvolvimento de retinopatia diabética. Uma possível conexão entre a isquemia retinal e as mudanças iniciais na

retina diabética é a produção de fatores de crescimento induzida por hipóxia, tal como VEGF. O principal regulador da resposta hipóxica foi identificado como fator-1 indutível por hipóxia (HIF-1), que controla os genes que regulam a proliferação celular e a angiogênese. Estudos anteriores demonstraram que a inibição da ubiquitinação de HIF-1 leva à ligação com os elementos responsivos da hipóxia (HRE) e com a produção de RNAm do VEGF.

Retinopatia diabética é definida como a disfunção progressiva da vasculatura retinal causada por hiperglicemia crônica. Recursos chave de retinopatia diabética incluem microaneurismas, hemorragias retiniais, exudatos de lipídio retinal, marcas de algodão, não perfusão de vaso capilar, edema macular e neovascularização. Recursos associados incluem hemorragia vítrea, descolamento da retina, glaucoma neovascular, catarata prematura e paralisias do nervo craniano.

Há 16 milhões de pessoas nos EUA com diabetes Tipo 1 e Tipo 2. Em 15 anos, 80 % dos pacientes do Tipo 1 desenvolveram retinopatia diabética, enquanto que 84 % dos pacientes diabéticos do Tipo 2 desenvolveram retinopatia em 19 anos. Estes números constituem um significativo mercado para agentes terapêuticos direcionados para doenças oculares de neovasculatura. O desenvolvimento de retinopatia diabética é demorado. Apesar do controle ideal de açúcar no sangue, pode-se esperar que, eventualmente, pacientes com doença há muito tempo desenvolvam alguma forma de retinopatia. A National Society to Prevent Blindness estimou que de 4 a 6 mi-

lhões de diabéticos nos EUA têm retinopatia diabética. A incidência anual estimada de novos casos de retinopatia diabética proliferativa e de edema macular diabético são 65.000 e 75.000, respectivamente, com uma prevalência de 700.000 e 500.000, respectivamente. A retinopatia diabética causa de 12.000 a 24.000 novos casos de cegueira nos EUA todos os anos. A retinopatia é tratada por métodos cirúrgicos, efetivos na redução de severa perda de visão, mas as partes da retina tratadas com laser são irreversivelmente destruídas. Não há tratamentos por medicamento disponíveis.

Uma doença microvascular que afeta primariamente os vasos capilares, a diabetes mellitus afeta o olho pela destruição da vasculatura na conjuntiva, na retina e no sistema nervoso central. Pacientes podem apresentar históricos de conjuntiva bulbar injetada há muito tempo juntamente com reclamações sistêmicas de perda de peso apesar do apetite maior do que o normal (polifasia), sede anormal (polidipsia) e frequência anormal de urina (poliúria).

Acuidade visual flutuante secundária em relação ao açúcar instável no sangue é um sinal ocular comum. Inchaço das lentes do cristalino resulta em grandes deslocamentos súbitos na refração, bem como em prematura formação de catarata. Mudanças na acuidade visual dependerão da severidade e do estágio da doença.

Na retina, o enfraquecimento das arteríolas e dos vasos capilares pode resultar na aparência característica do ponto intraretinal e em hemorragias em manchas, exudatos, microanormalidades vasculares intraretinais (IRMA) microa-

neurismas, edema e infartos de algodão. A retinopatia diabética proliferativa é o resultado de severo comprometimento vascular e é visível como neovascularização do disco (NVD), neovascularização em outro lugar (NVE) e neovascularização da íris (NVI, ou rubeose da íris). Complicações neurológicas incluem paralisias do terceiro, quarto e sexto nervos cranianos bem como papilite diabética e paralisia do nervo facial.

Diabetes mellitus é um grupo de doenças geneticamente influenciadas que compartilham intolerância à glicose. Ela é caracterizada como um distúrbio de regulação metabólica em decorrência de insulina deficiente ou com mau funcionamento ou de receptores de insulina celular deficientes ou com mau funcionamento.

A bioquímica que envolve a formação de sorbitol desempenha um papel na destruição de perícitos, que são células que suportam o endotélio vascular. À medida que os perícitos de suporte morrem, o endotélio do vaso capilar fica comprometido, resultando no vazamento vascular de sangue, proteína e lipídeo. Isto, em combinação com o sangue espesso com carga de glicose, produz insuficiência vascular, não perfusão do vaso capilar, hipóxia retinal, estrutura alterada e menor função. A formação e a liberação de fatores vasoproliferativos que desempenham um papel na gênese da neovascularização retinal são muito pouco entendidos.

A maior parte das seqüelas de diabetes que ameaçam a não visão se resolve espontaneamente durante o curso das semanas a meses seguintes ao controle médico. Em casos em

que há grandes mudanças refrativas, pacientes podem exigir uma prescrição de espetáculo temporário até que a refração estabilize. Quando a retinopatia ameaça a mácula ou quando novos vasos sangüíneos proliferam, o paciente pode ser conduzido para fotocoagulação a laser. O Estudo da Retinopatia Diabética (DRS) provou conclusivamente que a fotocoagulação panretinal teve sucesso na redução do risco de severa perda da visão em pacientes de alto risco. Ele definiu como as características de alto risco como: (1) Neovascularização do disco ótico (NVD) um quarto até um terço do tamanho do diâmetro de um disco e (2) Neovascularização em outro lugar (NVE) com alguma hemorragia vítrea.

Edema macular diabético (DME)

DME é uma complicação da retinopatia diabética, uma doença que afeta os vasos sangüíneos da retina. A retinopatia diabética resulta em múltiplas anormalidades na retina, incluindo espessamento e edema retinal, hemorragias, fluxo sangüíneo impedido, vazamento excessivo de fluido dos vasos sangüíneos e, nos estágios finais, crescimento anormal do vaso sangüíneo. Este crescimento do vaso sangüíneo pode levar a grandes hemorragias e severo dano retinal. Quando o vazamento do vaso sangüíneo da retinopatia diabética causa inchaço na mácula, ele é chamado de DMA. O principal sintoma do DME é uma perda da visão central. Fatores de risco associados com DME incluem níveis de glicose sangüínea fracamente controlados, alta pressão sangüínea, função renal anormal que causa retenção de fluido, altos níveis de colesterol e outros fatores sistêmicos gerais.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, a retinopatia diabética é a principal causa de cegueira em adultos com idade para trabalhar e uma causa principal de perda de visão em diabéticos. A American Diabetes Association relata que há aproximadamente 18 milhões de diabéticos nos Estados Unidos e aproximadamente 1,3 milhões casos recém-diagnosticados de diabetes nos Estados Unidos a cada ano. A Prevent Blindness America e a National Eye Institute estimam que nos Estados Unidos haja mais de 5,3 milhões de pessoas com 18 anos ou mais com retinopatia diabética, incluindo aproximadamente 500.000 com DME. O CDC estima que haja aproximadamente 75.000 novos casos de DME no Estados Unidos a cada ano.

Neuropatias Adicionais

Além da diabetes, as causas comuns de neuropatia são infecção de herpes zóster, trauma crônico ou agudo (incluindo cirurgia) e várias neurotoxinas. Dor neuropática é comum em câncer como um resultado direto do câncer nos nervos periféricos (por exemplo, compressão por um tumor) e como um efeito colateral de muitos medicamentos quimioterápicos.

Doença microvascular - Doenças vasculares e neurais são intimamente relacionadas e misturadas. Vasos sanguíneos dependem da função nervosa normal, e nervos dependem do fluxo sanguíneo adequado. A primeira mudança patológica na microvasculatura é a vasoconstrição. À medida que a doença progride, a disfunção neuronal se correlaciona intimamente com o desenvolvimento de anormalidades vasculares, tais

como espessamento da membrana da base do vaso capilar e hiperplasia endotelial, que contribuem para a menor tensão de oxigênio e hipóxia. Agentes vasodilatadores (por exemplo, inibidores enzima de conversão da angiotensina, antagonistas $\alpha 1$) pode levar a melhorias substanciais no fluxo sanguíneo neuronal, com melhorias correspondentes nas velocidades de condução nerval.

Manifestações clínicas

A neuropatia afeta todos os nervos periféricos: fibras dolorosas, neurônios motores e nervos autonômicos. Portanto, ela pode, necessariamente, afetar todos os órgãos e sistemas desde que todos sejam enervados. Há diversas síndromes distintas com base nos sistemas de órgãos e membros afetados, mas estas não são, de nenhuma maneira, exclusivas. Um paciente pode ter neuropatia sensorimotor e autonômica ou qualquer outra combinação.

Apesar dos avanços no entendimento das causas metabólicas de neuropatia, os tratamentos direcionados para a interrupção destes processos patológicos foram limitados pelos efeitos colaterais e pela falta de eficácia. Assim, tratamentos são sintomáticos e não abordam os problemas fundamentais. Agentes para dor causados pela neuropatia sensorimotor incluem antidepressivos tricíclicos (TCAs), inibidores de reabsorção de serotonina (SSRIs) e medicamentos antiepilépticos (AEDs). Nenhum destes agentes reverte os processos patológicos que levam à neuropatia diabética e nenhum altera o severo curso da enfermidade. Assim, será útil ter uma composição farmacêutica que pode mais bem tratar estes distúr-

bios e/ou aliviar os sintomas.

Retinopatias Adicionais

Microvasculopatia retinal (retinopatia da AIDS)

Microvasculopatia retinal é vista em 100 % dos pa-
5 cientes com AIDS. Ela é caracterizada por hemorragias intra-
retinais, microaneurismas, marcas Roth, marcas de algodão
(microinfartos da camada de fibra do nervo) e embainhamento
perivascular. A etiologia da retinopatia é desconhecida, em-
bora tenha-se pensado que ela seja em função de complexos
10 imunológicos circulantes, liberação local de substâncias ci-
totóxicas, hemorreologia anormal, e infecção de células en-
doteliais com o HIV. Agora, a retinopatia da AIDS é tão co-
mum que marcas de algodão em um paciente sem diabetes ou hi-
pertensão, mas com risco de HIV deve estimular o médico a
15 considerar o teste viral. Não há tratamento específico para
retinopatia da AIDS, mas sua presença contínua pode estimu-
lar um médico a reexaminar a eficácia da terapia contra o
HIV e a adaptação do paciente.

Retinopatia do transplante de medula óssea (BMT)

20 Retinopatia do transplante de medula óssea foi re-
latado pela primeira vez em 1983. Tipicamente ela ocorre em
seis meses, mas ela pode ocorrer com atraso de 62 meses de-
pois da BMT. Fatores de risco, tais como diabetes e hiper-
tensão podem facilitar o desenvolvimento da retinopatia do
25 BMT pelo aumento da microvasculopatia isquêmica. Não há pre-
dileção de idade, sexo ou raça conhecida para o desenvolvi-
mento da retinopatia do BMT. Pacientes apresentam menor acu-
idade visual e/ou déficit de campo visual. Tipicamente, a-

chados de segmento posteriores são bilaterais e simétricas. Manifestações clínicas incluem múltiplas marcas de algodão, telangiectasia, microaneurismas, edema macular, exudatos duros e hemorragias retiniais. Angiografia com fluoresceína demonstra não perfusão e perda de vaso capilar, anormalidades microvasculares intrarretinais, microaneurismas e edema macular. Embora a precisa etiologia da retinopatia do BMT não foi elucidada, ela parece ser afetada por diversos fatores: toxicidade de ciclosporina, irradiação total do corpo (TBI) e agentes quimioterapêuticos. Ciclosporina é um poderoso agente imunomodulatório que suprime enxerto contra hospedeiro imunoresposta. Ela pode levar a lesão da célula endotelial e a efeitos colaterais neurológicos, e em decorrência disto, ela foi sugerida como a causa da retinopatia do BMT. Entretanto, a retinopatia do BMT pode se desenvolver na ausência do uso de ciclosporina e a ciclosporina não mostrou causar a retinopatia do BMT em receptores autólogos ou singenéticos de medula óssea. Portanto, ciclosporina não parece ser a causa exclusiva da retinopatia do BMT. A irradiação total do corpo (TBI) também foi implicada como a causa da retinopatia do BMT. A radiação lesiona a microvasculatura retinal e leva à vasculopatia isquêmica. Variáveis tais como a dose total de radiação e o intervalo de tempo entre a radiação e a ablação da medula óssea parecem ser importantes. Entretanto, a retinopatia do BMT pode ocorrer em pacientes que não recebem TBI, e retinopatia do BMT não é observada em receptores de transplante de órgão sólido que receberam doses de radiação similares. Assim, a TBI não é a causa exclusiva, mas ela

é um outro fator que contribui para o desenvolvimento de retinopatia do BMT. Agentes quimioterapêuticos foram sugeridos como um fator potencial que contribui para a retinopatia do BMT. Medicamentos, tais como cisplatina, carmustina e ciclofosfamida podem causar efeitos colaterais oculares, incluindo papiledema, neurite ótica, déficit de campo visual e cegueira cortical. Foi sugerido que estes medicamentos quimioterapêuticos podem predispor pacientes a danos retinais induzidos por radiação e melhorar o efeito deletério da radiação. No geral, pacientes com retinopatia do BMT têm um bom prognóstico. Usualmente, a retinopatia se resolve em dois a quatro meses depois da interrupção ou da diminuição da dosagem de ciclosporina. Em um relatório, 69 por cento dos pacientes obtiveram a completa resolução dos achados retinais, e 46 por cento dos pacientes recuperaram completamente suas acuidades visuais básicas. Em virtude do prognóstico favorável e da natureza relativamente não progressiva da retinopatia do BMT, usualmente, a intervenção agressiva não é necessária.

20 Distúrbios isquêmicos

A isquemia pode ser dividida em 2 categorias: a primeira envolve a arteriosclerose acelerada que ocorre comumente em pacientes com diabetes, isto é, nas artérias femoral, popliteal, e tibial posterior. Estes vasos, frequentemente com somente 1 ou 2 cm de diâmetro, podem desenvolver placa aterosclerótica, que diminui seriamente o fluxo sanguíneo. Depois que os grandes vasos ficam completamente ocluídos, pode ocorrer derrame cerebral, infarto do miocárdio.

dio, isquemia e úlceras diabéticas do pé sem cura. Essencialmente, esta forma de isquemia é uma doença de vaso grande.

Demência pós-derrame cerebral

25% das pessoas tem demência depois de um derrame cerebral com muitas outras desenvolvendo demência durante os 5 a 10 anos seguintes. Além do mais, muitos indivíduos sofrem de debilidades mais delicadas de suas funções cerebrais superiores (tais como habilidades de planejamento e velocidade de processamento de informação) e estão em risco muito alto de desenvolver a demência subsequente. Neste processo (chamado de doença microvascular), derrames muito pequenos nas partes profundas do cérebro parecem ser essenciais no processo que leva a um padrão identificado de atrofia cerebral específico da demência pós-derrame cerebral.

Síndrome da isquemia ocular

No geral, pacientes que sofrem da síndrome da isquemia ocular (OIS) são idosos, com idade variando dos 50 aos 80. Machos são afetados duas vezes mais comumente que fêmeas. Apenas raramente, o paciente é assintomático. Ocorre diminuição da visão na apresentação em 90 por cento dos casos, e 40 por cento dos pacientes tem dor concomitante no olho. Também pode haver um histórico concomitante ou antecedente de ataques isquêmicos transitórios ou amaurose fugaz. Pacientes também têm significativa doença sistêmica conhecida ou desconhecida no momento da apresentação. As doenças sistêmicas mais comumente encontradas são hipertensão, diabetes, doença isquêmica cardíaca, derrame cerebral, e doença vascular periférica. Em uma quantidade menor, pacientes ma-

nifestam OIS em decorrência de arterite de célula gigante (GCA).

Achados unilaterais estão presentes em 80 por cento dos casos. Achados comuns podem incluir catarata unilateral
5 avançada, inflamação do segmento anterior, reação assintomática de câmara anterior, edema macular, veias retiniais dilatadas mas não tortuosas, hemorragias em ponto mesoperiférico e em manchas, marcas de algodão, exudatos e neovascularização do disco e da retina. Também pode haver pulso arterial
10 espontâneo, elevada pressão intraocular, e neovascularização do íris e ângulo com glaucoma neovascular (NVG). Embora o paciente possa exibir neovascularização do segmento anterior, hipotonia ocular pode ocorrer em função de baixa perfusão arterial em relação ao corpo ciliar. Ocasionalmente, há
15 visível embolia retinal (Placas de Hollenhorst).

Os achados na OIS são causados pela ulceração ateromatosa da artéria carótida interna e pela estenose na bifurcação da artéria carótida comum. Cinco por cento dos pacientes com arteriostenose interna desenvolve OIS. Entretanto,
20 OIS ocorre somente se o grau de estenose exceder 90 por cento. A estenose da artéria carótida reduz a pressão de perfusão ocular, resultando no supramencionado fenômeno isquêmico. Uma vez que a estenose alcança 90 por cento, a pressão de perfusão na artéria retinal central (CRA) cai somente até 50
25 por cento. Frequentemente, a reduzida pressão arterial se manifesta como pulso espontâneo da CRA. Os achados são variáveis e podem incluir qualquer um ou todos os achados expostos.

Pacientes com OIS têm significativa doença sistêmica que deve ser avaliada. A morte cardíaca é a causa primária de mortalidade em pacientes com OIS - a taxa de mortalidade em cinco anos é de 40 por cento. Por este motivo, pacientes com OIS devem ser encaminhados a um cardiologista para serologia, EKG, ECG e avaliação da carótida completos.

Doenças Microvasculares do Rim

O rim é envolvido em inúmeras condições clinicopatológicas discretas que afetam microvasculatura sistêmica e renal. Algumas destas condições são caracterizadas pela lesão primária das células endoteliais, tais como:

* síndrome hemolítica-urêmica (HUS) e púrpura trombótica trombocitopênica (TTP) - HUS e TTP são doenças intimamente relacionadas caracterizadas por anemia microangiopática hemolítica e debilidade variável de órgão. Tradicionalmente, o diagnóstico de HUS é feito quando falha renal é uma característica predominante da síndrome, como é comum em crianças. Em adultos, debilidade neurológica predomina frequentemente e, então, a síndrome é chamada de TTP. Microangiopatia trombótica é a lesão patológica fundamental em ambas as síndromes, e os achados clínicos e laboratoriais em pacientes tanto com HUS quanto com TTP coincidem em uma grande quantidade. Isto motivou diversos investigadores a considerar as duas síndromes como uma variedade de uma única entidade de doença. Patogênese: Dados experimentais sugerem fortemente que a lesão da célula endotelial é o evento primário na patogênese de HUS/TTP. O dano endotelial dispara uma sucessão de eventos que inclui coagulação intravascular

local, deposição de fibrina, e ativação e agregação de plaqueta sangüínea. O resultado final é a observação histopatológica de microangiopatia trombótica comum às diferentes formas da síndrome HUS/TTP. Se HUS/TTP for deixada sem tratamento, a taxa de mortalidade aproxima-se de 90 %. Terapia de apoio - incluindo diálise, medicamentos anti-hipertensivos, transfusões sangüíneas e tratamento de complicações neurológicas contribuem para a maior sobrevivência de pacientes com HUS/TTP. Equilíbrio adequado de fluido e descanso do intestino são importantes no tratamento típico da HUS associada com diarréia.

* nefrite por radiação - As conseqüências de longo prazo de irradiação renal em excesso de 2.500 rad pode ser dividida em cinco síndromes clínicas:

(i) Nefrite por radiação aguda ocorre em aproximadamente 40 % dos pacientes depois de um período de latência de 6 a 13 meses. Ela é clinicamente caracterizada pelo início abrupto de hipertensão, proteinúria, edema e progressiva falha renal que, na maior parte dos casos, leva aos rins em estágio terminal.

(ii) Inversamente, a nefrite por radiação crônica tem um período de latência que varia entre 18 meses e 14 anos depois do insulto inicial. Ela é insidiosa no início e é caracterizada por hipertensão, proteinúria, e perda gradual da função renal.

(iii) A terceira síndrome se manifesta se 5 a 19 anos depois da exposição à radiação como proteinúria benigna com função renal normal.

(iv) Um quarto grupo de pacientes exibe somente hipertensão benigna de 2 a 5 anos mais tarde e pode ter proteinúria variável. Hipertensão maligna posterior surge de 18 meses a 11 anos depois da irradiação em pacientes tanto com
5 nefrite crônica por radiação quanto com hipertensão benigna. A remoção do rim afetado reverteu a hipertensão. Dano induzido por radiação nas artérias renais com subsequente hipertensão renovascular foi relatado.

(v) Uma síndrome de insuficiência renal análoga à
10 nefrite aguda por radiação foi observada em pacientes de transplante de medula óssea (BMT) que foram tratados com irradiação de corpo inteiro (TBI).

Relatou-se que a irradiação causa disfunção endotelial, mas poupa células do músculo liso vascular no fase
15 inicial pós-irradiação. A radiação pode danificar diretamente o DNA, levando à menor regeneração destas células e desnudamento da membrana basal no vasos capilares e túbulos glomerulares. Como este insulto inicial leva, eventualmente, à glomerulosclerose, atrofia do túbulo e fibrose intersticial
20 é incerto. Postula-se que a degeneração da camada da célula endotelial pode resultar em trombose intravascular em vasos capilares e em arteríolas menores. Então, esta angiopatia interna explicará a fibrose renal progressiva e a hipertensão que caracterizam a nefrite por radiação. Um estudo recente de rins de camundongo irradiados mostrou um aumento de
25 leucócitos no córtex renal dependente da dose, sugerindo um papel para os processos inflamatórios em nefrite induzida por radiação.

Em outras doenças renais, a microvasculatura do rim é envolvida em distúrbios autoimunes, tal como esclerose sistêmica (escleroderma). O envolvimento renal em esclerose sistêmica se manifesta como uma doença renal crônica lentamente progressiva ou como crise renal do escleroderma (SRC),
5 que é caracterizada pela hipertensão maligna e azotemia aguda. Postula-se que SRC é causada por um fenômeno tipo Raynaud no rim. Vasospasmo severo leva à isquemia cortical e maior produção de renina e angiotensina II que, por sua vez,
10 perpetua a vasoconstrição renal. Mudanças hormonais (gravidez), tensão física e emocional, ou baixa temperatura podem disparar o vasospasmo arterial tipo Raynaud. O papel do sistema renina-angiotensina na perpetuação da isquemia renal é ressaltado pelo significativo benefício de inibidores ACE no
15 tratamento da SRC. Em pacientes com SRC que avança para severa insuficiência renal, apesar do tratamento anti-hipertensivo, a diálise se torna uma necessidade. Tanto diálise peritoneal quanto hemodiálise foram empregadas. Um relatório da Rede da Doença Renal em Estágio Terminal (ESRD)
20 sobre 311 pacientes com ESRD induzida por esclerose sistêmica dialisados entre 1983 e 1985 revelou uma taxa de sobrevivência de 33 % em 3 anos.

A microcirculação renal também pode ser afetada na doença da célula falciforme, à qual o rim é particularmente
25 suscetível em virtude da baixa tensão de oxigênio alcançada nos vasos profundos da medula renal em decorrência da transferência de oxigênio contracorrente ao longo do vasa recta. As artérias renais e arteríolas menores também podem ser o

sítio da lesão tromboembólica do material que contém colesterol desalojado das paredes dos grandes vasos.

Tomadas como um grupo, doenças que causam oclusão transitória ou permanente da microvasculatura renal resultam
5 uniformemente na interrupção da perfusão glomerular e, portanto, da taxa de filtração glomerular, desse modo, constituindo uma séria ameaça a homeostase sistêmica.

Falha Renal Aguda (ARF)

ARF pode ser causada por doença microvascular ou
10 macrovascular (oclusão da artéria renal principal ou severa doença aórtica abdominal). Frequentemente, as doenças microvasculares clássicas apresentam hemólise microangiopática e Falha Renal Aguda que ocorrem em virtude da trombose ou oclusão do vaso capilar glomerular, frequentemente, com trom-
15 bocitopenia associada. Exemplos típicos destas doenças incluem:

a) Púrpura trombótica trombocitopênica - O elemento pentavalente clássico na púrpura trombótica trombocitopênica inclui febre, mudanças neurológicas, falha renal, anemia microangiopática hemolítica e trombocitopenia.
20

b) Síndrome hemolítica urêmica - A síndrome hemolítica urêmica é similar à púrpura trombótica trombocitopênica, mas não apresenta mudanças neurológicas.

c) Síndrome HELLP (hemólise, elevados níveis de
25 enzimas do fígado e baixos níveis de plaquetas sanguíneas).
A síndrome HELLP é um tipo de síndrome hemolítica urêmica que ocorre em mulheres grávidas com a adição de elevações de transaminase.

A falha renal aguda pode estar presente em todos os ambientes médicos, mas é predominantemente adquirida em hospitalais. A condição se desenvolve em 5 por cento dos pacientes hospitalizados, e aproximadamente 0,5 por cento dos pacientes hospitalizados exigem diálise. Durante os últimos 40 anos, a taxa de sobrevivência para a falha renal aguda não melhorou, primariamente, em virtude de os pacientes afetado ser, agora, mais velhos e ter mais distúrbios comórbidos. A infecção é responsável por 75 por cento das mortes em pacientes com falha renal aguda, e complicações cardiorespiratórias são a segunda causa mais comum de morte. Dependendo da severidade da falha renal, a taxa de mortalidade pode variar de 7 por cento até tão alto quanto 80 por cento. A falha renal aguda pode ser dividida em três categorias: ARF pré-renal, intrínseca e pós-renal. A ARF intrínseca é subdividida em quatro categorias: doença tubular, doença glomerular, doença vascular (inclui microvascular) e doença intersticial.

Doença Renal Progressiva

Há evidência de que a doença renal progressiva é caracterizada por uma progressiva perda da microvasculatura. A perda da microvasculatura correlaciona-se diretamente com o desenvolvimento de cicatrizes glomerulares e tubulointersticiais. O mecanismo é mediado, em parte, por uma redução na resposta proliferativa endotelial, e esta debilitação no reparo do vaso capilar é mediada pela alteração na expressão local tanto dos fatores angiogênicos (fator de crescimento endotelial vascular) quanto antiangiogênico (trombospondina 1) no rim. A alteração no equilíbrio dos fatores de cresci-

mento angiogênicos é mediada tanto por citocinas associadas a macrófago (interleucina-1 β) quanto por mediadores vasoativos. Finalmente, há evidência intrigante de que o estímulo do reparo da angiogênese e/ou do vaso capilar pode estabilizar a função renal e retardar a progressão e de que este benefício ocorre independentemente dos efeitos no BP ou proteinúria.

Para informação adicional, veja Brenner & Rector's The Kidney, 7th ed., Copyright © 2004 Elsevier. Chapter 33 - Microvascular diseases of the kidney e também Tiwari and Vikrant Journal of Indian Academy of Clinical Medicine Vol.5, No.1 Review Article-Sepsis and the Kidney.

Distúrbio dos ouvidos

Ototoxicidade induzida por produtos químicos

Freqüentemente, os efeitos tóxicos de vários medicamentos ototóxicos terapêuticos nas células auditivas e neurônios do gânglio espiral são o fator limitante para suas utilidades terapêuticas. A maior parte dos medicamentos ototóxicos inclui o agente quimioterápico amplamente usado cisplatina e seus análogos, antibióticos aminoglicosídeo comumente usados, por exemplo, gentamicina, para o tratamento de infecções causadas por bactérias gram negativo, quinina e seus análogos, salicilato e seus análogos, e diuréticos de alça.

Por exemplo, aminoglicosídeos antibacterianos, tais como gentamicinas, estreptomicina, canamicinas, tobramicinas e congêneres são conhecidos por ter séria toxicidade, particularmente, ototoxicidade e nefrotoxicidade, que

reduzem a utilidade de tais agentes antimicrobianos (veja Goodman e Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 6th ed., A. Goodman Gilman et al., eds; Macmillan Publishing Co., Inc., New York, pp. 1169-71 (1980)). Certamen-

5 te, a ototoxicidade é um efeito colateral limitador de dose de administração de antibiótico. De 4 a 15 % dos pacientes que recebem 1 grama por dia por mais do que 1 semana desenvolve perda de audição mensurável, que, lentamente, se torna pior e pode levar à completa surdez permanente se o trata-

10 mento continuar.

Ototoxicidade também é um sério efeito colateral limitador de dose para cisplatina, um complexo de coordenação de platina, que se provou efetivo em uma variedade de cânceres humanos, incluindo câncer testicular, ovariana, na

15 bexiga, e na cabeça e no pescoço. Cisplatina (Platinol®) danifica os sistemas auditivo e vestibular. Salicilatos, tal como aspirina, são os medicamentos terapêuticos mais comumente usados por seus efeitos antiinflamatório, analgésico, antipirético e antitrombótico. Infelizmente, eles também têm

20 efeitos colaterais ototóxicos. Frequentemente, eles levam a tinido ("zumbido nos ouvidos") e perda de audição temporária. Além do mais, se o medicamento for usado em grandes doses por um período prolongado, a debilidade auditiva pode se tornar persistente e irreversível.

25 Dessa maneira, existe uma necessidade de dispositivo para impedir, reduzir ou tratar a incidência e/ou severidade dos distúrbios do ouvido interno e deficiências auditivas que envolvem o tecido do ouvido interno, particular-

mente, células de cabelo do ouvido interno. De interesse particular são aqueles distúrbios que surgem como efeito colateral indesejável dos medicamentos terapêuticos ototóxicos que incluem cisplatina e seus análogos, antibióticos de aminoglicosídeo, salicilato e seus análogos, ou diuréticos de alça. Além do mais existe uma necessidade de métodos que permitirão maior e, assim, mais efetiva, dosagem com estes medicamentos farmacêuticos que induzem ototoxicidade, impedindo ou reduzindo concomitantemente os efeitos citotóxicos causados por estes medicamentos. O que é necessário é um método que forneça um dispositivo seguro, efetivo e prolongado para o tratamento profilático ou curativo das deficiências auditivas relacionadas ao dano, perda ou degeneração do tecido do ouvido interno, particularmente, induzidos por ototoxina, e, particularmente, envolvendo células de cabelo do ouvido interno. Além do mais, é exigido um método e composição para o tratamento de dano e surdez resultantes do trauma no ouvido interno (trauma acústico).

Sem ser limitado pela teoria, acredita-se que medicamentos de cisplatina e outros medicamentos que induzem ototoxicidade (tal como antibióticos aminoglicosídeo), bem como trauma acústico, podem induzir os efeitos ototóxicos por meio de morte celular programado ou apoptose no tecido do ouvido interno, particularmente, células de cabelo do ouvido interno (Zhang et al., Neuroscience 120 (2003) 191-205; Wang et al., J. Neuroscience 23((24):8596-8607)). Em mamíferos, células de cabelo auditivas são produzidas somente durante o desenvolvimento embrionário e não regeneram se perdi-

das durante a vida pós-natal, portanto, uma perda de células de cabelo resultará em profunda e irreversível surdez. Infelizmente, nos dias de hoje, não há terapias efetivas para tratar a cóclea e reverter esta condição. Assim, uma terapia
5 efetiva para impedir a morte celular de células de cabelo auditivas será de grande valor terapêutico.

Úlceras de pressão

Inflamações de pressão ou úlceras de pressão são áreas de pele e tecido danificados que se desenvolvem quando
10 pressão prolongada (usualmente de uma cama ou cadeira de rodas) interrompe a circulação a partes vulneráveis do corpo, especialmente a pele das nádegas, coxa e calcanhar. A falta de fluxo sanguíneo adequado leva à necrose isquêmica e à ulceração do tecido afetado. Úlceras de pressão ocorrem mais
15 freqüentemente em pacientes com sensação reduzida ou ausente ou que são debilitados, macilentos, paralisados, ou que estão acamados há muito tempo. Tecidos sobre o sacro, ísquio, trocânteres maiores, maléolo externo e calcanhar são especialmente suscetíveis. Outros sítios podem ser envolvidos de-
20 pendendo da posição do paciente.

Úlceras de pressão são ferimentos que, normalmente, curam apenas muito lentamente e, especialmente tais casos, uma cura melhor e mais rápida é, certamente, de grande importância para o paciente. Além do mais, os custos envol-
25 vidos no tratamento de pacientes que sofrem de tais ferimentos são acentuadamente reduzidos quando a cura é melhor e ocorre mais rapidamente.

Condições Isquêmicas

Lesão isquêmica é a expressão clínica mais comum de lesão celular por falta de oxigênio. Os modelos mais usados para estudar a lesão isquêmica envolvem a completa oclusão de uma das artérias em um órgão (por exemplo, uma artéria coronária) e exame do tecido (por exemplo, músculo cardíaco) em áreas supridas pela artéria. Complexas mudanças patológicas ocorrem em diversos sistemas celulares durante a isquemia. Até um certo ponto, por uma duração que varia entre diferentes tipos de células, a lesão pode ser fácil de reparar, e as células afetadas podem recuperar se oxigênio e substratos metabólicos são novamente tornados disponíveis pela restauração de fluxo sanguíneo. Com prorrogação adicional da duração isquêmica a estrutura celular continua a deteriorar devido à severa progressão mecanismos de lesão existentes. Com o tempo, o mecanismo energético da célula - a usina de força oxidativa da mitocôndria e a rota glicólica ficam irreparavelmente danificadas, e a restauração de fluxo sanguíneo (reperfusão) não pode salvar a célula danificada. Mesmo se o mecanismo energético celular tivesse que permanecer intacto, dano irreparável ao genoma ou às membranas celulares garantirá um resultado letal independente da reperfusão. Esta lesão irreversível é usualmente manifestada como necrose, mas apoptose também pode desempenhar um papel. Sob certas circunstâncias, quando o fluxo sanguíneo for restaurado em células que se tornaram previamente isquêmicas, mas não morreram, freqüentemente, a lesão é paradoxicalmente exacerbada e prossegue em um ritmo acelerado - isto é, lesão por reperfusão.

Lesão por reperfusão pode ocorrer em uma variedade de distúrbios, especialmente durante intervenção médica, incluindo, mas sem limitações, angioplastia, cirurgia cardíaca ou trombose; transplante de órgão (pulmão, coração, rim, fígado, etc.), que, possivelmente, resulta em rejeição do transplante em decorrência de isquemia-reperfusão seguinte à renovação do fluxo sanguíneo ao órgão transplantado; em decorrência de cirurgia plástica; durante severa síndrome do compartimento; durante reanexação de membros amputados; em decorrência de síndrome da falência múltipla dos órgãos; no cérebro em decorrência de derrame cerebral ou trauma cerebral; em conjunto com ferimentos crônicos, tais como uma úlcera de pressão, uma úlcera venosa e uma úlcera diabética; durante isquemia do músculo esquelético ou transplante de membro; em decorrência de isquemia mesentérica ou doença isquêmica do intestino aguda; falha respiratória em decorrência de isquemia do torso inferior que leva à hipertensão pulmonar, hipoxemia e edema pulmonar não cardiogênico; falha renal aguda observada depois do transplante renal, grande cirurgia, trauma, e séptico, bem como choque hemorrágico, sepsia, isquemia retinal que ocorre em decorrência de oclusão vascular aguda que leva à perda de visão em inúmeras doenças oculares, tais como glaucoma agudo, retinopatia diabética, retinopatia hipertensiva e oclusão vascular retinal; isquemia cóclear; falha de presilha em cirurgia microvascular para defeitos da cabeça e do pescoço; fenômeno de Raynaud e as lesões isquêmicas digitais associadas no escleroderma, lesão da medula espinhal, cirurgia vascular, rabdomi-

ólise traumática (síndrome do esmagamento); e mioglobínúria.

Adicionalmente, isquemia / reperfusão podem estar envolvidas nos seguintes distúrbios: hipertensão, doença vascular cerebral hipertensiva, ruptura de aneurisma, uma
5 constrição ou obstrução de um vaso sanguíneo - como ocorre no caso de um angioma do trombo ou do êmbolo, discrasias sanguínea, qualquer forma de função cardíaca comprometida, incluindo parada ou falha cardíaca, hipotensão sistêmica, parada cardíaca, choque cardiogênico, choque séptico, trauma
10 da medula espinhal, trauma na cabeça, convulsão, sangramento de um tumor, e doenças, tais como derrame cerebral, doença de Parkinson, epilepsia, depressão, ALS, doença de Alzheimer, doença de Huntington e qualquer outra, demência induzida por doença (tal como demência induzida por HIV, por exem-
15 plo).

Adicionalmente, um episódio isquêmico pode ser ocasionado por uma lesão mecânica no Sistema Nervoso Central, tal como resultado de uma pancada na cabeça ou na espinha. O trauma pode envolver um insulto de tecido, tais como uma a-
20 brasão, incisão, contusão, punção, compressão, etc., tal como pode surgir do contato traumático de um objeto estranho com qualquer local da cabeça, pescoço ou coluna vertebral ou pertinente a elas. Outras formas de lesão traumática podem surgir da constrição ou compressão de tecido CNS por um acú-
25 mulo inapropriado de fluido (por exemplo, um bloqueio ou disfunção de fluido cerebrospinal normal ou produção do fluido humor vítreo, modificação, ou regulação de volume, ou um hematoma ou edema subdural ou intracraniano). Similarmen-

te, constrição ou compressão traumática podem surgir da presença de uma massa de tecido anormal, tais como um tumor metastático ou primário.

Concluindo, modos de terapia atuais para o impedimento e/ou tratamento da COPD, doença microvasculares de degeneração macular e condições ototóxicas são insatisfatórias e, portanto, há uma necessidade de desenvolver compostos inéditos com este propósito. Também há uma necessidade de desenvolver uma terapia e um medicamento que podem tratar os efeitos ototóxicos atualmente associados com certos medicamentos e distúrbios, em particular, com agentes quimioterapêuticos de cisplatina e certos antibióticos sem sacrificar a efetividade dos medicamentos. Adicionalmente, há uma necessidade de desenvolver uma terapia e medicamento que podem tratar os efeitos ototóxicos associados com trauma acústico ou trauma mecânico no ouvido interno. Além do mais, há uma necessidade de desenvolver uma terapia e um medicamento para o tratamento de úlceras de pressão, isquemia e distúrbios relacionados à isquemia-reperfusão. Todas as doenças e indicações aqui divulgadas anteriormente, bem como outras doenças e distúrbios aqui descritos, tal como MI, também podem ser tratadas pelos compostos inéditos desta invenção.

RTP801

O gene RTP801, foi relatado pela primeira vez por um co-requerente do presente pedido. As patentes US 6.455.674, 6.555.667 e 6.740.738, todas atribuídas a um dos correquerentes do presente pedido, divulgam e reivindicam por si mesmas o polinucleotídeo e polipeptídeo RTP801, e an-

ticorpos direcionados ao polipeptídeo. RTP801 representa um alvo genético exclusivo para fator-1 indutível por hipóxia (HIF-1) que pode regular patogênese induzida por hipóxia independente de fatores de crescimento, tal como VEGF.

5 Os seguintes pedidos de patente e publicações dão aspectos de informação de fundo.

O WO 2001070979 diz respeito a marcadores de ácido nucléico que são sobre-expressos em células com câncer de ovário.

10 A US 6.673.549 divulga uma combinação que compreende DNAs que são diferentemente expressados em resposta ao tratamento de esteróide.

15 O pedido US 2003165864 diz respeito a DNAs que são diferentemente expressados em células tratadas com um agente desmetilante de DNA.

O pedido US 2003108871 diz respeito a uma composição que compreende diversos DNAs que são diferentemente expressados em culturas de célula de fígado humano C3A tratado.

20 O pedido US 2002119463 divulga uma nova composição usada para tratar e diagnosticar câncer de próstata, a dita composição compreendendo DNAs humanos que são diferentemente expressados em câncer de próstata.

25 WO 2004018999 divulga um método for avaliar, caracterizar, monitorar, impedir, e tratar câncer cervical.

EP 1394274 diz respeito a um método para testar asma brônquica ou doença obstrutiva pulmonar crônica pela comparação do nível de expressão de um gene marcador em uma

amostra biológica de um sujeito com o nível de expressão do gene em uma amostra de um sujeito saudável.

WO 2002101075 diz respeito a uma molécula de ácido nucléico isolado usada para detectar, caracterizar, impedir e tratar cânceres cervicais humanos.

WO 2003010205 diz respeito a inibir angiogênese para tratar cura de ferimento, retinopatia, isquemia, inflamação, microvasculopatia, ferimento ósseo e inflamação da pele.

10 WO 2002046465 diz respeito a identificar um gene envolvido na doença para tratar condições reguladas por hipóxia.

WO 2002031111 diz respeito a polipeptídeos e suas proteínas codificadas e, portanto, muitos usos são fornecidos.

WO 2001012659 diz respeito a ácidos nucléicos usados em metodologias de DNA recombinante.

WO 2001077289 divulga seiscentos e vinte e três polinucleotídeos derivados de uma variedade de fontes de tecido humano.

WO 2003101283 diz respeito a uma combinação que compreende muitos DNAs e proteínas.

JP 2003259877 diz respeito a muitos marcadores da doença de fibrose hepática.

25 Tzipora Shoshani, et al. Identification of a Novel Hypoxia-Inducible Factor 1-Responsive Gene, RTP801, Involved in Apoptosis. MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, Apr. 2002, p. 2283-2293; este documento, de co-autoria dos inventores da

presente invenção, detalha a descoberta do gene RTP801 (a então gene dependente de HIF-1 inédito.

Anat Brafman, et al. Inhibition of Oxygen-Induced Retinopathy in RTP801-Deficient Mice. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2004 Oct; 45 (10): 3796-805; também de co-autoria dos inventores da presente invenção, este documento demonstra que em camundongos knock out com RTP801, hiperóxia não ocasiona a degeneração da rede de vasos capilares retinais.

Leif W. Ellisen, et al. REDD1, a Developmentally Regulated Transcriptional Target of p63 and p53, Links p63 to Regulation of Reactive Oxygen Species. Molecular Cell, Vol. 10, 995-1005, November, 2002; este documento demonstra que a sobreexpressão de RTP801 (aqui chamada de REDD1) leva à maior produção de espécies reativas ao oxigênio.

Richard DR, Berra E, e Pouyssegur J. Non-hypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1 alpha in vascular smooth muscle cells. J Biol. Chem. 2000, Sep1; 275(35): 26765-71. Este documento demonstra que transcrição dependente de HIF-1 pode ser induzida pela excessiva produção de espécies reativas ao oxigênio.

Rangasami T, et al., Genetic ablation of Nrf2 enhances susceptibility to cigarette smoke-induced emphysema in mice. Submetido ao Journal of Clinical Investigation. Este trabalho diz respeito a camundongos com uma defesa antioxidante comprometida.

Sumário da invenção

A presente invenção fornece métodos e composições inéditos para tratar distúrbios microvasculares, degeneração

macular, distúrbios respiratórios, e lesão ou doença da medula espinhal.

Em uma modalidade, são fornecidas moléculas inéditas que inibem RTP801 e podem ser usadas para tratar várias
5 doenças e indicações.

Em uma outra modalidade, a presente invenção fornece um método para tratar um paciente que sofre de um distúrbio microvascular, degeneração macular ou um distúrbio respiratório, compreendendo administrar ao paciente uma composição farmacêutica que compreende um inibidor de RTP801.
10

Uma outra modalidade da presente invenção diz respeito a um método para tratar um paciente que sofre de COPD, compreendendo administrar ao paciente uma composição farmacêutica que compreende uma quantidade terapeuticamente efetiva de um inibidor de RTP801. Em uma modalidade, o inibidor é uma molécula de RNAsi, uma molécula anti-sentido, um anticorpo (tal como um anticorpo neutralizante), um peptídeo negativo dominante ou um ribossomo.
15

Uma outra modalidade da presente invenção diz respeito a um método para tratar um paciente que sofre de degeneração macular, compreendendo administrar ao paciente uma composição farmacêutica que compreende uma quantidade terapeuticamente efetiva de um inibidor de RTP801. Em uma modalidade, o inibidor é uma molécula de RNAsi, uma molécula anti-sentido, um anticorpo (tal como um anticorpo neutralizante), um peptídeo negativo dominante ou um ribossomo.
20
25

Uma outra modalidade da presente invenção diz respeito a um método para tratar um paciente que sofre de um

distúrbio microvascular, compreendendo administrar ao paciente uma composição farmacêutica que compreende uma quantidade terapêuticamente efetiva de um inibidor de RTP801. Em uma modalidade, o inibidor é uma molécula de RNAsi, uma molécula anti-sentido, um anticorpo (tal como um anticorpo neutralizante), um peptídeo negativo dominante ou um ribossomo.

Uma modalidade adicional da presente invenção fornece o uso de uma quantidade terapêuticamente efetiva de um inibidor de RTP801 para a preparação de um medicamento para promover a recuperação em um paciente que sofre de um distúrbio respiratório. Em uma modalidade, o distúrbio respiratório é COPD e o inibidor é, preferivelmente, um RNAsi.

Uma modalidade adicional da presente invenção fornece o uso de uma dose terapêuticamente efetiva de um inibidor de RTP801 para a preparação de um medicamento para promover a recuperação em um paciente que sofre de degeneração macular. Em uma modalidade, a degeneração macular é AMD e o inibidor é, preferivelmente, um RNAsi.

Uma modalidade adicional da presente invenção fornece o uso de uma quantidade terapêuticamente efetiva de um inibidor de RTP801 para a preparação de um medicamento para promover a recuperação em um paciente que sofre de um distúrbio microvascular. Em uma modalidade, o distúrbio microvascular é retinopatia diabética e o inibidor é, preferivelmente, um RNAsi.

A presente invenção diz respeito, no geral, a métodos e composições para tratar ou impedir a incidência ou a

severidade de debilidade auditiva (ou debilidade do equilíbrio), particularmente, debilidade auditiva associada com a morte celular das células de cabelo do ouvido interno. Os métodos e composições envolvem administrar em um mamífero
5 com necessidade de tal tratamento uma quantidade profilática ou terapêuticamente efetiva de um ou mais compostos que infra-regulam a expressão do gene RTP801, particularmente, pequenos RNAs interferentes (RNAsis) inéditos.

Mais especificamente, a presente invenção fornece
10 métodos e composições para tratar um paciente que sofre de debilidade auditiva ou outras otopatologias associadas com a morte celular de células de cabelo do ouvido interno. Tais otopatologias podem ser o resultado de trauma acústico, trauma mecânico, ou perda de audição induzida por ototoxina.
15 Os métodos da invenção que compreendem administrar ao paciente um ou mais compostos que infra-regulam a expressão do gene RTP801, particularmente, RNAsis que inibem RTP801 tipicamente como uma composição farmacêutica, em uma dose terapêuticamente efetiva para, desse modo, tratar o paciente.

20 Em uma modalidade, a presente invenção fornece melhores composições e métodos para tratamentos que exigem a administração de um medicamento farmacêutico com um efeito colateral ototóxico debilitador da audição em combinação com uma quantidade terapêuticamente efetiva de uma ou mais molé-
25 culas de RNAsi que inibem RTP801 para tratar ou impedir a ototoxicidade induzida pelo medicamento farmacêutico. As composições da invenção podem ser administradas em um(s) intervalo(s) adequado(s) anterior, subsequente ou subs-

tancialmente concorrente com a administração do medicamento ototóxico debilitador da audição que induz dano ao tecido apoptótico do ouvido interno. Similarmente, este tratamento pode ser efetivo como um tratamento profilático anterior ou
5 em conjunto com distúrbios que causam trauma acústico.

Dessa maneira, é um objetivo da invenção fornecer uma melhor composição que contém uma quantidade terapêuticamente efetiva de uma ou mais moléculas de RNAsi que inibem RTP801 em combinação com um medicamento farmacêutico ototóxico debilitador da audição para administração em um mamífero. A dita combinação de medicamentos pode ser administrada separadamente; então, as moléculas de RNAsi que inibem RTP801 serão administradas localmente, enquanto que o medicamento farmacêutico ototóxico debilitador da audição é ad-
10 ministrado sistematicamente. As moléculas de RNAsi podem ser administradas anterior, simultaneamente ou subsequente ao medicamento ototóxico. Tal combinação de composições pode conter adicionalmente um carreador farmacêuticamente aceitável. A composição farmacêutica terá ototoxicidade inferior do que o agente farmacêutico ototóxico sozinho e, preferi-
20 velmente, terá uma maior dosagem do agente farmacêutico ototóxico do que é tipicamente usado. Exemplos de tais melhores composições incluem cisplatina ou outro agente neoplástico ototóxico ou um(s) antibiótico(s) aminoglicosídeo em combinação com a quantidade terapêuticamente efetiva de uma ou
25 mais moléculas de RNAsi que inibem RTP801.

Ainda adicionalmente, a invenção diz respeito ao uso das composições da invenção em casos em que diuréticos

são necessários. A presente invenção fornece uma solução para a tecnologia que tem procurado há muito tempo uma terapia e um medicamento que podem tratar os efeitos ototóxicos atualmente associados com certos diuréticos e, em particular, com os diuréticos de alça mais populares e mais comumente
5 usados sem sacrificar suas efetividades diuréticas.

Ainda adicionalmente, a invenção diz respeito ao use de composições da invenção em casos em que quinina ou compostos tipo quinina são necessários. A presente invenção
10 fornece uma solução para a tecnologia que tem procurado há muito tempo uma terapia e um medicamento que podem tratar os efeitos ototóxicos atualmente associados com certas quininas sem sacrificar suas efetividades.

A presente invenção diz respeito adicionalmente a métodos e composições para tratar ou impedir a incidência ou
15 severidade de úlceras de pressão. Os métodos e composições envolvem administrar em um mamífero com necessidade de tal tratamento uma quantidade profilática ou terapeuticamente efetiva de um ou mais compostos que infra-regulam a expressão do gene RTP801, particularmente, pequenos RNAs interfe-
20 rentes (RNAsis) inéditos.

Adicionalmente, a presente invenção diz respeito a métodos e composições para o tratamento de todas as lesões ou distúrbios isquêmicos ou de isquemia-reperfusão, como a-
25 qui descrito. Os ditos métodos e composições envolvem administrar em um mamífero com necessidade de tal tratamento uma quantidade profilática ou terapeuticamente efetiva de um ou mais compostos que infra-regulam a expressão do gene RTP801,

particularmente, pequenos RNAs interferentes (RNAsis) inéditos.

Descrição detalhada da invenção

A presente invenção, em algumas de suas modalidades, diz respeito à inibição do gene RTP801 ou polipeptídeo para o tratamento de doenças oculares, distúrbios respiratórios, distúrbios microvasculares, distúrbio dos ouvidos e distúrbios isquêmicos, entre outros. Como será aqui descrito, os inibidores preferidos que serão usados com a presente invenção são moléculas biológicas.

Sem ser limitado pela teoria, os inventores da presente invenção descobriram que RTP801 está envolvido em vários estados da doença, incluindo distúrbios microvasculares, doenças oculares, distúrbios respiratórios, distúrbio dos ouvidos, úlceras de pressão, distúrbios isquêmicos e lesão e doença da medula espinhal, e será benéfico inibir RTP801 a fim de tratar todas as ditas doenças ou distúrbios. Métodos, moléculas e composições que inibem RTP801 são aqui detalhadamente discutidos, e todas as ditas moléculas e/ou composições podem ser benéficamente empregadas no tratamento de um paciente que sofre de qualquer um dos ditos distúrbios.

A presente invenção fornece métodos e composições para inibir a expressão do gene RTP801 in vivo. No geral, o método inclui administrar oligoribonucleotídeos, tal como pequenos RNAs interferentes (isto é, RNAsis) que são alvejados a um RNAm particular e hibridiza com ele, ou material de ácido nucléico que pode produzir RNAsis em uma célula em uma

quantidade suficiente para infra-regular a expressão de um gene alvo por um mecanismo de interferência do RNA. Em particular, o presente método pode ser usado para inibir expressão do gene RTP801 para o tratamento de distúrbios respiratórios, distúrbios microvasculares, distúrbios oculares e deficiências auditivas.

Assim, em uma modalidade, a presente invenção fornece um método para tratar um paciente que sofre de uma condição selecionada de um distúrbio microvascular, uma doença ocular, um distúrbio respiratório, um distúrbio do ouvido, úlceras de pressão ou uma lesão ou outro ferimento da medula espinhal, compreendendo administrar ao paciente uma composição farmacêutica que compreende um inibidor de RTP801 em uma quantidade terapeuticamente efetiva para, desse modo, tratar o paciente. A invenção fornece adicionalmente um método para tratar um paciente que sofre de um distúrbio microvascular, uma doença ocular, um distúrbio respiratório, um distúrbio do ouvido, úlceras de pressão ou uma lesão ou outro ferimento da medula espinhal, compreendendo administrar ao paciente uma composição farmacêutica que compreende um inibidor de RTP801 em uma dosagem e durante um período de tempo suficiente para promover a recuperação. A doença ocular pode ser degeneração macular, tal como degeneração macular relacionada à idade (AMD), entre outros. O distúrbio microvascular pode ser retinopatia diabética ou falha renal aguda, entre outros. O distúrbio respiratório pode ser doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD), enfisema, bronquite crônica, asma e câncer do pulmão, entre outros. O distúrbio do ouvido pode

ser trauma acústico ou surdez induzida por cisplatina, entre outros. O inibidor de RTP801 pode ser selecionado de uma grande variedade de moléculas, incluindo, mas sem limitações, compostos tais como polinucleotídeos, fragmentos anti-sentido, Moléculas de RNA que alvejam o RNAm do gene RTP801, tais como ribozimas ou RNAsis (tais como os RNAsis das Tabelas A-D e, em particular, RNAsi Nos: 14, 22, 23, 25, 27, 39, 41, 42, 49 e 50 da Tabela A ou RNAsi Nos: 257, 260-262 e 264-268 da Tabela D), ou os vetores de expressão que os compreendem; polipeptídeos tais como os negativos dominantes, anticorpos (tal como um anticorpo que se liga especificamente em um epítopo presente em um polipeptídeo que compreende aminoácidos consecutivos, o cuja sequência é apresentada na Figura 2 (SEQ ID No:2)), ou, em alguns casos, enzimas. Adicionalmente, o inibidor de RTP801 pode ser um inibidor químico, tal como uma pequena molécula, por exemplo, moléculas químicas com um baixo peso molecular, por exemplo, um peso molecular abaixo de 2.000 daltons. Inibidores específicos de RTP801 são dados a seguir.

A presente invenção fornece adicionalmente um método para tratar um paciente que sofre de degeneração macular, COPD, retinopatia diabética ou surdez induzida por trauma acústico, compreendendo administrar ao paciente uma composição farmacêutica que compreende uma dose terapêuticamente efetiva de um inibidor de RTP801 que compreende um polinucleotídeo que hibridiza especificamente com RNAm transcrito do gene RTP801 e infra-regula a expressão do gene RTP801 para, desse modo, tratar o paciente. O polinucleotí-

deo pode ser um RNAsi que compreende nucleotídeos consecuti-
vos com uma sequência idêntica a qualquer sequência apresen-
tada nas Tabelas A-D (SEQ ID NOs:3-536) e, em particular,
RNAsi Nos: 14, 22, 23, 25, 27, 39, 41, 42, 49 e 50 da Tabela
5 A ou RNAsi Nos: 257, 260-262, e 264268 da Tabela D.

Adicionalmente, uma modalidade adicional da pre-
sente invenção diz respeito a um método para tratar um paci-
ente que sofre de um distúrbio microvascular, um doença ocu-
lar, um distúrbio respiratório, um distúrbio do ouvido, úl-
ceras de pressão ou uma lesão ou outro ferimento da medula
10 espinhal, compreendendo administrar ao paciente uma composi-
ção farmacêutica que compreende uma dose terapeuticamente
efetiva de um inibidor de RTP801 que compreende uma molécula
de RNAsi, opcionalmente, uma molécula de RNAsi detalhada em
qualquer uma das Tabelas A-D, em uma dosagem e durante um
15 período de tempo para, desse modo, tratar o paciente.

É fornecido um método adicional para tratar um pa-
ciente que sofre de um distúrbio microvascular, uma doença
ocular, um distúrbio respiratório, um distúrbio do ouvido,
20 úlceras de pressão ou uma lesão ou outro ferimento da medula
espinhal, compreendendo administrar ao paciente uma composi-
ção farmacêutica que compreende uma dose terapeuticamente
efetiva de uma Molécula de RNA que alveja o RNAm do gene
RTP801 em uma dosagem e durante um período de tempo para,
25 desse modo, tratar o paciente. A molécula de RNA pode ser
uma molécula de RNAsi, tal como uma molécula de RNAsi deta-
lhada nas Tabelas A-D e, em particular, RNAsi Nos:14, 22,
23, 25, 27, 39, 41, 42, 49 e 50 da Tabela A ou RNAsi Nos:

257, 260-262, e 264-268 da Tabela D, ou um ribossomo.

A presente invenção fornece adicionalmente um método para tratar um paciente que sofre de um distúrbio microvascular, um doença ocular, um distúrbio respiratório, um
5 distúrbio do ouvido, úlceras de pressão ou uma lesão ou outro ferimento da medula espinhal ou qualquer um dos distúrbios aqui divulgados, compreendendo administrar ao paciente uma composição farmacêutica que compreende uma dose terapeuticamente efetiva de uma molécula de RNAsi que alveja o RNAm
10 do gene RTP801, opcionalmente, uma molécula de RNAsi detalhada nas Tabelas A-D, em uma dosagem e durante um período de tempo para, desse modo, tratar o paciente. Adicionalmente, a doença ocular pode ser degeneração macular, tal como degeneração macular relacionada à idade (AMD); o distúrbio
15 microvascular pode ser retinopatia diabética ou falha renal aguda; o distúrbio respiratório pode ser COPD e os aspectos da COPD que são tratados podem compreender, mas sem limitações, enfisema, bronquite crônica ou ambos; e o distúrbio auditivo pode ser surdez induzida por trauma acústico.

20 A presente invenção diz respeito adicionalmente ao uso dos RNAsis inéditos aqui divulgados no tratamento de debilidade auditiva na qual a inibição da expressão de RTP801 é benéfica. Em uma modalidade, a presente invenção constitui um método para tratar um mamífero com uma debilidade auditiva
25 (ou de equilíbrio) ou propenso a ela, ou para tratar profilaticamente um mamífero em distúrbios em que a inibição da expressão de RTP801 é benéfica. O método desta modalidade da presente invenção impedirá ou reduzirá a ocorrência ou seve-

ridade de uma debilidade auditiva (ou de equilíbrio) que resulta da lesão, perda, ou degeneração de célula do ouvido interno, em particular, causadas por trauma acústico ou por um agente ototóxico. Nesta modalidade, o método da invenção
5 inclui administrar uma quantidade terapeuticamente efetiva de um ou mais compostos que infra-regulam a expressão do gene RTP801, particularmente, os RNAsis inéditos da presente invenção.

Em uma modalidade, o objetivo da presente invenção
10 é fornecer um método para tratar um mamífero, para impedir, reduzir ou tratar uma debilidade, distúrbio ou desequilíbrio auditivos, preferivelmente, trauma acústico ou uma condição auditiva induzida por ototoxina, pela administração a um mamífero, com necessidade de tal tratamento, de uma composição
15 da invenção. Uma modalidade é um método para tratar um distúrbio ou debilidade do ouvido em que o trauma acústico resulta de uma única exposição a um som extremamente alto ou de exposição contínua a um ambiente ruidoso que pode causar surdez com o passar do tempo. A debilidade auditiva também
20 pode ser causada por trauma físico ao ouvido. Uma outra modalidade é um método para tratar um distúrbio ou debilidade do ouvido em que a ototoxicidade resulta da administração de uma quantidade terapeuticamente efetiva de um medicamento farmacêutico ototóxico. Medicamentos ototóxicos típicos são
25 agentes quimioterapêuticos, por exemplo, agentes antineoplásticos e antibióticos. Outros possíveis candidatos incluem diuréticos de alça, quininas ou um composto tipo quinina, e salicilato ou compostos tipo salicilato. Estes métodos são

especialmente efetivos quando o composto ototóxico é um antibiótico, preferivelmente um antibiótico aminoglicosídeo. Antibióticos aminoglicosídeo ototóxicos incluem, mas sem limitações, neomicina, paromomicina, ribostamicina, lividomicina, canamicina, amicacina, obramicina, viomicina, gentamicina, sisomicina, netilmicina, estreptomicina, dibecacina, fortimicina e diidroestreptomicina, ou combinações destes. Antibióticos particulares incluem neomicina B, canamicina A, canamicina B, gentamicina C1, gentamicina C1a e gentamicina C2. Os métodos da invenção também são efetivos quando o composto ototóxico for um agente neoplástico, tais como vincristina, vinblastina, cisplatina e compostos tipo cisplatina, e taxol e compostos tipo taxol.

Em algumas modalidades voltadas para o tratamento ou impedimento de um distúrbio do ouvido, a composição da invenção é co-administrado com uma ototoxina. Por exemplo, é fornecido um melhor método para o tratamento de infecção de um mamífero pela administração de um antibiótico aminoglicosídeo, a melhoria compreendendo administrar uma quantidade terapêuticamente efetiva de um ou mais compostos que regulam a expressão do gene RTP801, particularmente, RNAsis inéditos, no paciente com necessidade de tal tratamento para reduzir ou impedir debilidade auditiva induzida por ototoxina associada com o antibiótico. Preferivelmente, os compostos que reduzem ou impedem a debilidade auditiva induzida por ototoxina, particularmente, os RNAsis inéditos, são administrados localmente no ouvido interno, opcionalmente, por injeção transtimpânica.

Em uma ainda outra modalidade é fornecido um melhor método para o tratamento de câncer em um mamífero pela administração de um composto quimioterapêutico, a melhoria compreendendo administrar uma quantidade terapeuticamente efetiva de uma composição da invenção no paciente com necessidade de tal tratamento para reduzir ou impedir debilidade auditiva induzida por ototoxina associada com o medicamento quimioterapêutico. Em uma outra modalidade, os métodos de tratamento são aplicados às deficiências auditivas resultantes da administração de um agente quimioterápico para tratar seus efeitos colaterais ototóxicos. Agentes quimioterapêuticos ototóxicos tratáveis pelos métodos da invenção incluem, mas sem limitações, um agente antineoplástico, incluindo cisplatina ou compostos tipo cisplatina, taxol ou compostos tipo taxol, e outros agentes quimioterapêuticos que, acredita-se, causam deficiências auditivas induzidas por ototoxina, por exemplo, vincristina, um medicamento antineoplástico usado para tratar malignidades hematológicas e sarcomas. Compostos tipo cisplatina incluem carboplatina (Paraplatina ®) tetraplatina, oxaliplatina, aroplatina e transplatina, entre outros. Em uma outra modalidade, os métodos da invenção são aplicados a deficiências auditivas que resultam da administração de quinina e seus substitutos sintéticos usados, tipicamente, no tratamento da malária para tratar seus efeitos colaterais ototóxicos. Em uma outra modalidade, os métodos da invenção são aplicados a deficiências auditivas resultantes da administração de um diurético. Diuréticos, particularmente, diuréticos "de alça", isto é, aqueles que

agem primariamente na Alça de Henle, são ototoxinas candidatas. Exemplos ilustrativos, não limitantes do método da invenção, incluem furosemida, ácido etacrílico, e mercuriais. Tipicamente, diuréticos são usados para impedir ou eliminar edema. Diuréticos também são usados em estados não edematosos, por exemplo, hipertensão, hipercalcemia, hipercalciúria idiopática e diabetes nefrogênica insípida.

Em uma outra modalidade, os métodos da invenção são aplicados ao tratamento ou impedimento da incidência ou severidade de úlceras de pressão. Os métodos e composições envolvem administrar em um mamífero com necessidade de tal tratamento uma quantidade profilática ou terapeuticamente efetiva de um ou mais compostos que infra-regulam a expressão do gene RTP801, particularmente, pequenos RNAs interferentes (RNAsis) inéditos. Preferivelmente, os compostos que tratam ou impedem a incidência ou severidade de úlceras de pressão, particularmente, os RNAsis inéditos são administrados localmente na área danificada. Os métodos e composições da presente invenção são efetivos no tratamento e impedimento de úlceras de pressão ou úlceras de pressão desenvolvidas quando pressão prolongada (usualmente de uma cama ou cadeira de rodas) interrompe a circulação a partes vulneráveis do corpo. Os métodos e composições são efetivos em pacientes com sensação reduzida ou ausente ou que são debilitados, macilentos, paralisados, ou que estão acamados há muito tempo. As composições da presente invenção também são efetivas para melhorar a cura de úlceras de pressão usando as composições. As composições podem ser usadas em qualquer estágio particu-

lar do processo de cura, incluindo o estágio antes que alguma cura tenha iniciado ou mesmo antes que uma úlcera específica seja formada (tratamento profilático).

Outros tipos de ferimentos a ser tratados de acordo com a invenção também incluem i) ferimentos gerais, tais como, por exemplo, ferimentos cirúrgicos, traumáticos, infecciosos, isquêmicos, térmicos, químicos e em bolhas; ii) ferimentos específicos da cavidade oral tais como, por exemplo, ferimentos pós-extração, ferimentos endodônticos, especialmente, em conjunto com o tratamento de cistos e abscessos, úlceras e lesões de origem bacteriana, viral ou autoimunológica, ferimentos mecânicos, químicos, térmicos, infecciosos e liquenóide; úlceras de herpes, estomatite aftosa, gengivite ulcerativa necrosante aguda e síndrome da queimadura bucal são específico exemplos; e iii) ferimentos na pele tais como, por exemplo, neoplasma, queimaduras (por exemplo, química, térmica), lesões (bacterianas, virais, autoimunológicas), mordidas e incisões cirúrgicas.

Os métodos e composições da presente invenção também são efetivos no tratamento e impedimento de qualquer ferimento crônico incluindo, entre outros, úlceras de pressão, úlceras venosas e úlceras diabéticas. Em todos estes tipos de ferimento crônico, o evento de precipitação fundamental é um período de isquemia seguido por um período de reperfusão. Usualmente, estes eventos de isquemia-reperfusão são repetitivos, o que significa que os efeitos deletérios de isquemia-reperfusão são potencializados e, eventualmente, suficientes para causar ulceração. Tanto para úlceras de pressão

quanto para úlceras diabéticas do pé, o evento isquêmico é o resultado de pressão prolongada suficiente para impedir a perfusão do tecido, e quando a pressão for finalmente aliviada, a lesão por reperfusão ocorre. As presentes composições
5 são efetivas para inibir o dano causado por isquemia-reperfusão em ferimentos crônicos.

As presentes composições também são efetivas em outros distúrbios associados com isquemia-reperfusão, tais como, mas sem limitações: transplante de órgão, anastomoses
10 intestinal e do cólon, operações em grandes vasos sanguíneos, pontos em membros amputados, angioplastia balão ou qualquer cirurgia cardíaca, derrame cerebral ou trauma cerebral, transplante de membro, hipertensão pulmonar, hipoxemia, e edema pulmonar não cardiogênico, falha renal aguda,
15 glaucoma agudo, retinopatia diabética, retinopatia hipertensiva, oclusão vascular retinal, isquemia cóclear, cirurgia microvascular e lesões isquêmicas em escleroderma.

Os métodos e composições da presente invenção também são efetivos no tratamento de trauma acústico ou trauma
20 mecânico, preferivelmente, traumas acústico ou mecânico que levam à perda de célula de cabelo do ouvido interno. O trauma acústico a ser tratado na presente invenção pode ser causado por uma única exposição a um som extremamente alto, ou seguinte a uma exposição de longo prazo a sons altos diários
25 acima de cerca de 85 decibéis. Por exemplo, o trauma mecânico do ouvido interno a ser tratado na presente invenção é o trauma do ouvido interno seguinte a uma operação de inserção de dispositivo no ouvido interno. As composições da presente

invenção impedem ou minimizam o dano às células de cabelo do ouvido interno associado com a operação. Preferivelmente, os compostos que reduzem ou impedem a debilidade auditiva induzida por ototoxina, particularmente os RNAsis inéditos, são
5 administrados localmente no ouvido interno, opcionalmente, por injeção transtimpânica.

Adicionalmente, o composto da presente invenção pode ser usado para tratar qualquer condição na qual a isquemia está envolvida, opcionalmente, isquemia-reperfusão.
10 Tal condição inclui isquemia ou isquemia-reperfusão resultante de uma angioplastia, cirurgia cardíaca ou trombose; transplante de órgão; em decorrência de cirurgia plástica; durante severa síndrome do compartimento; durante reanexação de membros amputados; em decorrência de síndrome da falência
15 múltipla dos órgãos; no cérebro em decorrência de derrame cerebral ou de trauma cerebral; em conjunto com ferimento crônicos tais como úlceras de pressão, úlceras venosas e úlceras diabéticas; durante isquemia do músculo esquelético ou transplante de membro; em decorrência de isquemia mesentérica ou doença isquêmica do intestino aguda; falha respiratória em decorrência de isquemia do torso inferior que leva à hipertensão pulmonar, hipoxemia, e edema pulmonar não cardiogênico; falha renal aguda observada depois de transplante renal, grande cirurgia, trauma, e choque séptico bem como
20 choque hemorrágico; sepsia; isquemia retinal que ocorre em decorrência de oclusão vascular aguda que leva à perda de visão em inúmeras doenças oculares, tais como glaucoma agudo, retinopatia diabética, retinopatia hipertensiva e oclu-

são vascular retinal; isquemia cóclear; falha de presilha em cirurgia microvascular para defeitos da cabeça e pescoço; fenômeno de Raynaud e as lesões isquêmicas digitais associadas no escleroderma; lesão da medula espinhal; cirurgia vascular; rabdomiólise traumática (síndrome do esmagamento); e mioglobínúria. Adicionalmente, isquemia/reperfusão pode estar envolvida nos seguintes distúrbios: hipertensão, doença vascular cerebral hipertensiva, ruptura de aneurisma, uma constrição ou obstrução de um vaso sanguíneo - como ocorre no caso de um trombo ou êmbolo, angioma, discrasias sanguínea, qualquer forma de função cardíaca comprometida incluindo parada ou falha cardíaca, hipotensão sistêmica, parada cardíaca, choque cardiogênico, choque séptico, trauma da medula espinhal, trauma na cabeça, convulsão, sangramento de um tumor; e doenças tais como derrame cerebral, doença de Parkinson, epilepsia, depressão, ALS, doença de Alzheimer, doença de Huntington e qualquer outra demência induzida por doença (tal como demência induzida por HIV, por exemplo). Adicionalmente, um episódio isquêmico pode ser causado por uma lesão mecânica ao Sistema Nervoso Central, tal como resulta de uma pancada na cabeça ou na espinha. O trauma pode envolver um insulto no tecido tais como uma abrasão, incisão, contusão, punção, compressão, etc., tal como pode surgir do contato traumático de um objeto estranho com qualquer local da cabeça, pescoço, ou coluna vertebral ou anexo a elas. Outras formas de lesão traumática podem surgir da constrição ou compressão do tecido por um acúmulo inapropriado de fluido (por exemplo, um bloqueio ou disfunção da produção

normal de fluido cerebrospinal ou fluido humor vítreo, modificação, ou regulação de volume, ou um hematoma ou edema subdural ou intracarniana). Similarmente, a constrição ou compressão traumática podem surgir da presença de uma massa
5 de tecido anormal, tais como um tumor metastático ou primário.

"Tratar uma doença" diz respeito a administrar uma substância terapêutica efetiva para melhorar os sintomas associados com uma doença, para reduzir a severidade ou para
10 curar a doença, ou para impedir que a doença ocorra. "Tratamento" diz respeito tanto a tratamento terapêutico quanto a medidas profiláticas ou preventivas, em que o objetivo é impedir ou desacelerar (reduzir) uma doença ou distúrbio.

Uma "dose terapeuticamente efetiva" diz respeito a
15 uma quantidade de um composto ou composição farmacêutico que é efetivo para alcançar uma melhoria em um paciente ou em seus sistemas fisiológicos incluindo, mas sem limitações, maior taxa de sobrevivência, recuperação mais rápida, ou melhoria ou eliminação de sintomas, e outros indicadores que
20 são selecionados como apropriados pelos versados na técnica para determinar medidas.

Os métodos para tratar as doenças aqui divulgados e incluídos na presente invenção podem incluir administrar um inibidor de RTP801 em conjunto com um inibidor de RTP801
25 adicional, uma substância que melhora as propriedades farmacológicas do ingrediente ativo como detalhado a seguir, ou um composto adicional conhecido por ser efetivo no tratamento da doença a ser tratada, tais como degeneração macular,

COPD, ARF, DR, surdez induzida por cisplatina ou trauma acústico, entre outros. "Em conjunto com" significa anterior, simultaneamente ou subsequente. Detalhes adicionais sobre terapias associadas exemplares são dados a seguir.

5 Em uma outra modalidade, a presente invenção fornece o uso de uma dose terapeuticamente efetiva de um inibidor de RTP801 para a preparação de um medicamento para promover a recuperação em um paciente que sofre de degeneração macular, COPD, ARF, DR, surdez induzida por cisplatina ou
10 trauma acústico ou qualquer outra doença ocular, condição microvascular ou respiratória ou distúrbio auditivo como detalhado anteriormente, e o uso de uma dose terapeuticamente efetiva de um inibidor de RTP801 para a preparação de um medicamento para tratar as ditas doenças e distúrbios. Nesta
15 modalidade, o inibidor de RTP801 pode compreender um polinucleotídeo que compreende nucleotídeos consecutivos com uma sequência que compreende uma sequência anti-sentido em relação à sequência apresentada na Figura 1 (SEQ ID No: 1). Adicionalmente, o inibidor de RTP801 pode ser um vetor de expressão que compreende um polinucleotídeo com uma sequência
20 que é uma sequência anti-sentido em relação à sequência apresentada na Figura 1 (SEQ ID No:1). O inibidor de RTP801 de acordo com os ditos usos também pode ser um anticorpo, tal como um anticorpo neutralizante que se liga especificamente a um epítopo presente em um polipeptídeo que compreende aminoácidos consecutivos, cuja sequência é apresentada na
25 Figura 2 (SEQ ID No:2). Adicionalmente, o inibidor de RTP801 pode ser uma molécula de RNA que alveja o RNAm do gene

RTP801, opcionalmente um RNAsi, opcionalmente um RNAsi que compreende nucleotídeos consecutivos com uma sequência idêntica a qualquer sequência apresentada nas Tabelas A-D (SEQ ID Nos:3-536) e, em particular, RNAsi Nos: 14, 22, 23, 25, 27, 39, 41, 42, 49 e 50 da Tabela A ou RNAsi Nos: 257, 260-262, e 264-268 de Tabela D, ou um ribossomo.

Assim, de acordo com a informação aqui divulgada, o inibidor de RTP801 a ser usado com qualquer um dos métodos aqui divulgados, em qualquer um dos usos aqui divulgados e em qualquer uma das composições farmacêuticas aqui divulgadas, pode ser selecionado do grupo que consiste em um RNAsi, um vetor que compreende um RNAsi, um vetor que expressa um RNAsi e qualquer molécula que é endogenamente processada em um RNAsi. Como aqui detalhado, preferivelmente, o dito RNAsi é um RNAsi que compreende nucleotídeos consecutivos com uma sequência idêntica a qualquer sequência apresentada nas Tabelas A-D (SEQ ID Nos:3-536) e, em particular, RNAsi Nos:14, 22, 23, 25, 27, 39, 41, 42, 49 e 50 da Tabela A ou RNAsi Nos: 257, 260-262, e 264-268 da Tabela D.

"Distúrbio respiratório" diz respeito a distúrbios, doenças ou síndromes do sistema respiratório que incluem, mas sem limitações, distúrbios pulmonares de todos os tipos incluindo doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD), enfisema, bronquite crônica, asma e câncer do pulmão, entre outros. Enfisema e bronquite crônica podem ocorrer como parte da COPD ou independentemente.

"Distúrbio microvascular" diz respeito a qualquer condição que afeta os vasos capilares e sistema linfático

microscópicos, em particular, doenças vasospásticas, doenças vasculíticas e doenças oclusivas linfáticas. Exemplos de distúrbios microvasculares incluem, entre outros: distúrbios oculares tais como Amaurose Fugaz (embólica ou secundária em relação a SLE), síndrome da apla, deficiência Prot CS e ATI-II, patologias microvasculares causadas pelo uso de medicamento IV, disproteinemia, arterite temporal, neuropatia ótica isquêmica anterior, neurite ótica (primária ou secundária em relação a doenças autoimunes), glaucoma, síndrome de Von Hippel Lindau, doença de córnea, rejeição do transplante de córnea por catarata, doença de Eales, angiite de ramificação congelada, operação de encurvamento circundante, uveíte que inclui pars planitis, melanoma coroidal, hemangioma coroidal, aplasia do nervo ótico; distúrbios retinais, tais como oclusão da artéria retinal, oclusão da veia retinal, retinopatia da prematuridade, retinopatia do HIV, retinopatia de Purtscher, retinopatia de vasculite sistêmica e de doenças autoimunes, retinopatia diabética, retinopatia hipertensiva, retinopatia por radiação, oclusão de ramificação de artéria ou veia retinal, vasculite retinal idiopática, aneurismas, neuroretinite, embolização retinal, necrose retinal aguda, retinocoroidopatia birdshot, descolamento prolongado da retina; distúrbios sistêmicos tais como diabetes mellitus, retinopatia diabética (DR), patologias microvasculares relacionadas à diabetes (como aqui detalhado), síndromes de hiperviscosidade, síndromes do arco aórtico e síndrome isquêmica ocular, fístula carótida cavernosa, esclerose múltipla, lupus eritematoso sistêmico, arteriolite com autoanticorpo

SS-A, vasculite hemorrágica multifocal aguda, vasculite resultante de infecção, vasculite resultante da doença de Behçet, sarcoidose, coagulopatias, neuropatias, nefropatias, doenças microvasculares do rim e distúrbios isquêmicos microvasculares, entre outros.

Distúrbios microvasculares podem compreender um elemento neovascular. O termo "distúrbio neovascular" diz respeito àqueles distúrbios em que a formação de vasos sanguíneos (neovascularização) é nociva ao paciente. Exemplos de neovascularização ocular incluem: doenças retiniais (retinopatia diabética, Edema Macular diabético, glaucoma crônico, descolamento da retina e retinopatia da célula falciforme); rubeose da íris; vitreorretinopatia proliferativa; doenças inflamatórias; uveíte crônica; neoplasmas (retinoblastoma, pseudoglioma e melanoma); iridociclite heterocrômica de Fuchs; glaucoma neovascular; neovascularização corneana (hipoplasia inflamatória, de transplante e desenvolvida da íris); neovascularização após uma vitrectomia e lensectomia combinadas; doenças vasculares (isquemia retinal, insuficiência vascular coroidal, trombose coroidal e isquemia da artéria carótida); neovascularização do nervo ótico; e neovascularização em função de penetração do olho ou de lesão ocular contusiva. Todas estas condições neovasculares podem ser tratadas usando os compostos e composições farmacêuticos da presente invenção.

"Doença ocular" diz respeito a distúrbios, doenças ou síndromes do olho incluindo, mas sem limitações, quaisquer distúrbios que envolvem neovascularização coroidal

(CNV), AMD úmida e seca, síndrome da histoplasmosse ocular, estrias angióides, rupturas na membrana de Bruch, degeneração miópica, tumores oculares, doenças degenerativas da retina e oclusão da veia retinal (RVO). Algumas condições aqui
5 divulgadas, tal como DR, que pode ser tratada de acordo com os métodos da presente invenção, foram consideradas tanto como um distúrbio microvascular quanto como uma doença ocular, ou ambas, sob as definições aqui apresentadas.

Debilidades auditivas relevantes para a invenção
10 podem ser em função de lesões do órgão final que envolvem as células de cabelo do ouvido interno, por exemplo, trauma acústico, labirintite endolinfática viral, doença de Meniere. Deficiências auditivas incluem tinido, que é uma percepção de som na ausência de um estímulo acústico, e pode ser in-
15 termitente ou contínuo, em que é diagnosticada uma perda sensorioneural. A perda de audição pode ser em função de infecção bacteriana ou viral, tal como in herpes zoster oticus, labirintite purulenta que surge a de otite média aguda, meningite purulenta, otite média crônica, surdez súbita in-
20 cluindo aquela de origem viral, por exemplo, labirintite endolinfática viral causada por vírus que incluem caxumba, sarampo, gripe, catapora, mononucleose e adenovírus. A perda de audição pode ser congênita, tal como aquela causada por rubéola, anoxia durante o nascimento, sangramento no ouvido
25 interno em função de trauma durante distribuição de medicamentos ototóxicos administrados à mãe, eritroblastose fetal e distúrbios hereditários incluindo síndrome de Waardenburg e síndrome de Hurler. A perda de audição pode ser induzida

por ruído, no geral, em função de um ruído maior do que cerca de 85 decibéis (db) que danifica o ouvido interno. Preferivelmente, a perda de audição é causada por trauma acústico ou por um medicamento ototóxico que impacta a parte auditiva do ouvido interno, particularmente, células de cabelo do ouvido interno. Os capítulos 196, 197, 198 e 199 do The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 14th Edition, (1982), Merck Sharp & Dome Research Laboratories, N.J. e capítulos correspondentes da 16ª edição mais recente, (incluindo capítulos 207 e 210) que dizem respeito à descrição e ao diagnóstico de debilidade auditiva e de equilíbrio são aqui incorporados pela referência.

Preferivelmente, sem ser limitado pela teoria, distúrbios ou debilidades dos ouvidos (ou debilidade do equilíbrio) a ser tratados ou impedidos no contexto da presente invenção são dano apoptótico às células de cabelo do ouvido interno induzido por ototoxina ou por trauma. Aqueles com necessidade de tratamento incluem aqueles que já passaram por uma debilidade auditiva, aqueles propensos a ter a debilidade e aqueles nos quais a debilidade deve ser impedida. Sem ser limitado pela teoria, as debilidades auditivas pode ser em função de dano ou perda de célula apoptótica de cabelo do ouvido interno, em que o dano ou a perda são causados por infecção, lesão mecânica, com alto, envelhecimento, ou ototoxicidade induzida por produtos químicos. Ototoxinas incluem medicamentos terapêuticos que incluem agentes antineoplásticos, salicilatos, quininas, e antibióticos aminoglicosídeo, contaminantes em comidas ou medicamentos, e

poluentes ambientais ou industriais. Tipicamente, tratamento é realizado para impedir ou reduzir a ototoxicidade ou trauma acústico, especialmente resultantes ou supostos que se resultem da administração de medicamentos terapêuticos ou da

5 exposição a ambientes que induzem trauma acústico. Preferivelmente, uma composição terapêuticamente efetiva é dada imediatamente depois da exposição para impedir ou reduzir o efeito ototóxico ou o efeito traumático. Mais preferivelmente, o tratamento é fornecido profilaticamente, tanto por ad-

10 ministração da composição anterior ou concomitantemente com o produto farmacêutico ototóxico ou com a exposição à ototoxina ou ao ambiente que induz trauma acústico.

A debilidade auditiva pode ser induzida por quimioterapia. Com mais detalhes, a debilidade auditiva pode ser

15 causada por agentes quimioterapêuticos, tais como etoposídeo, 5-FU (5-fluoruracila), cis-platina, doxorubicina, um alcalóide vinca, vincristina, vinblastina, vinorelbina, taxol, ciclofosfamida, ifosfamida, clorambucila, bussulfano, mecloretamina, mitomicina, dacarbazina, carboplatina, tiotepa,

20 pa, daunorrubicina, idarrubicina, mitoxantro, bleomicina, esperamicina A1, dactinomicina, plicamicina, carmustina, lomustina, tauromustina, estreptozocina, melfalana, dactinomicina, procarbazona, dexametasona, prednisona, 2-clorodeoxiadenosina, citarabina, docetaxel, fludarabina, gemcitabina,

25 herceptina, hidroxiuréia, irinotecano, metotrexato, oxaliplatina, rituxina, semustina, epirubicina, etoposídeo, tomudex e topotecano ou um análogo químico de um destes agentes quimioterapêuticos. Os agentes quimioterapêuticos mais pro-

váveis de causar debilidade auditiva são cis-platina (cis-platina) e compostos tipo cisplatina

Por "ototoxina", no contexto da presente invenção, entende-se uma substância que por meio de suas lesões por
5 ação química, debilita ou inibe a atividade dos receptores de som do sistema nervoso relacionada à audição que, por sua vez, debilita a audição (e/ou o equilíbrio). No contexto da presente invenção, a ototoxicidade inclui um efeito deletério nas células de cabelo do ouvido interno. Agentes ototó-
10 xicos que causam deficiências auditivas incluem, mas sem limitações, agente neoplásticos tais como vincristina, vinblastina, cisplatina e compostos tipo cisplatina, taxol e compostos tipo taxol, compostos dideoxi, por exemplo, dideoxiinosina; álcool; metais; toxinas industriais envolvidas na
15 exposição ocupacional ou ambiental; contaminantes de alimentos ou medicamentos; e sobredoses de vitaminas ou de medicamentos terapêuticos, por exemplo, antibióticos tais como penicilina ou cloranfenicol, e megadoses de vitaminas A, D, ou B6, salicilatos, quininas e diuréticos de alça. Por "exposi-
20 ção a um agente ototóxico" entende-se que o agente ototóxico é tornado disponível a um mamífero ou entra em contato com ele. A exposição a um agente ototóxico pode ocorrer pela administração direta, por exemplo, pela ingestão ou administração de um alimento, medicamento ou agente terapêutico,
25 por exemplo, um agente quimioterápico, por contaminação acidental ou por exposição ambiental, por exemplo, exposição aérea ou aquosa.

"Gene RTP801" diz respeito ao quadro de leitura

aberta de seqüência de codificação de RTP801 mostrado na figura 1 (SEQ ID NO:1), ou qualquer seqüência homóloga deste com, preferivelmente, pelo menos 70 % de identidade, mais preferivelmente 80 % de identidade, ainda mais preferivelmente 90 % ou 95 % de identidade. Isto abrange todas as seqüências derivadas de SEQ ID NO:1 que passaram pelas mutações, alterações ou modificações aqui descritas. Assim, em uma modalidade preferida, RTP801 é codificado por uma seqüência de ácido nucléico de acordo com SEQ. ID. NO. 1. Também está na presente invenção o fato de que os ácidos nucléicos de acordo com a presente invenção são somente complementares e idênticos, respectivamente, a uma parte do ácido nucléico que codifica para RTP801 como, preferivelmente, o primeiro trecho e a primeira fita são, tipicamente, mais curtos do que o ácido nucléico de acordo com a presente invenção. Também reconhece-se que, com base na seqüência de aminoácidos de RTP801, a codificação de qualquer seqüência ácido nucléico para tal seqüência de aminoácido pode ser percebida pelos versados na técnica com base no código genético. Entretanto, em função do modo de ação considerado do ácido nucléico de acordo com a presente invenção, é mais preferido que a codificação do ácido nucléico para RTP801, preferivelmente o seu RNAm, seja aquela presente no organismo, tecido e/ou célula, respectivamente, onde a expressão de RTP801 deve ser reduzida.

"Polipeptídeo de RTP801" diz respeito ao polipeptídeo do gene RTP801, e entende-se que inclui, com os propósitos da presente invenção, os termos "RTP779", "REDD1",

"Ddit4", "FLJ20500", "Dig2" e "PRF1", derivados de qualquer organismo, opcionalmente macho, variantes de recombinação e seus fragmentos que retêm atividade biológica, e seus homólogos, preferivelmente, com pelo menos 70 %, mais preferivelmente pelo menos 80 %, ainda mais preferivelmente pelo menos 90 % ou 95 % de homologia em relação a eles. Além do mais, entende-se que este termo abrange polipeptídeos que resultam de alterações menores da sequência de codificação do RTP801, tais como, entre outras, mutações, substituições, deleções e inserções de ponto que podem causar uma diferença em uns poucos aminoácidos entre o polipeptídeo resultante e o RTP801 de ocorrência natural. Polipeptídeos codificados pelas sequências de ácido nucléico que se ligam na sequência de codificação do RTP801 ou sequência genômica sob distúrbios de hibridização altamente rigorosa, que são bem conhecidas na tecnologia (por exemplo, Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley e Sons, Baltimore, Maryland (1988), atualizado em 1995 e 1998), também são abrangidas por este termo. RTP801 quimicamente modificado ou fragmentos de RTP801 quimicamente modificados também são incluídos no termo, contanto que a atividade biológica seja retida. Preferivelmente, RTP801 tem ou abrange uma sequência de aminoácido de acordo com SEQ. ID. NO. 2. Reconhece-se que pode haver diferenças na sequência de aminoácido entre vários tecidos de um organismo e entre diferentes organismos de uma espécie ou entre diferentes espécies na qual o ácido nucléico de acordo com a presente invenção pode ser aplicado em várias modalidades da presente invenção. Entretanto, com

base no preceito técnico aqui fornecido, a respectiva sequência pode ser tomada em consideração dessa maneira durante o desenho de qualquer um dos ácidos nucleicos de acordo com a presente invenção. Fragmentos de RTP801 em particular
5 incluem os aminoácidos 1-50, 51-100, 101-150, 151-200 e 201-232 da sequência mostrada na figura 2. Fragmentos de RTP801 em particular adicionais incluem os aminoácidos 25-74, 75-124, 125-174, 175-224 e 225-232 da sequência mostrada na figura 2.

10 RTP801 aqui usado é um proteína descrita, entre outros, em WO 99/09046. RTP801 que também é chamado de RTP801, foi descrito como um alvo transcricional de HIF-1 α por Shoshani T et al. (Shoshani et al., 2002, Mol Cell Biol, 22, 2283-93). Adicionalmente, o estudo de Ellisen et al.
15 (Ellisen et al., Mol Cell, 10, 995-1005) identificou RTP801 como um gene de resposta ao dano de DNA dependente de p53 e como um gene dependente de p63 envolvidos na diferenciação epitelial. Também, RTP801 reflete o padrão específico de tecido do elemento da família p53 p63, é efetivo similar ou em
20 adição ao TP 63, é um inibidor de diferenciação in vitro e está envolvido na regulação de espécies reativas ao oxigênio. Além disto, RTP801 é responsivo ao fator indutível por hipóxia 1 (HIF-1) do fator de transcrição responsivo a hipóxia e, tipicamente, é supra-regulado durante a hipóxia tanto
25 in vitro quanto in vivo em um modelo de animal com derrame cerebral isquêmico. RTP801 parece funcionar na regulação de espécies reativas ao oxigênio (ROS) e tanto níveis ROS quanto reduzida sensibilidade à tensão oxidante aumentam após

expressão ectópica de RTP801 (Ellisen et al. 2002, supra; Soshani et al. 2002, supra). Preferivelmente, RTP801 é uma proteína de RTP801 biologicamente ativa que, preferivelmente, exibe pelo menos uma destas características, preferivelmente, duas ou mais e mais preferivelmente cada uma e todas estas características.

Sem ser limitado pela teoria, RTP801, sendo um proteína indutível por tensão (respondendo À hipóxia, tensão oxidante, tensão térmica, tensão ER) é um fator que age no ajuste fino da resposta da célula ao desequilíbrio energético. Como tal, ele é um alvo adequado para o tratamento de qualquer doença em que as células devem ser salvas da apoptose em função de distúrbios por tensão (por exemplo, doenças acompanhadas pela morte de células normais) ou em que células, que são adaptadas a distúrbios com tensão em função de mudanças na expressão de RTP801 (por exemplo, células cancerosas), devem ser mortas. Neste último caso, RTP801 pode ser visto como um fator de sobrevivência para células cancerosas e seus inibidores podem tratar câncer como uma monoterapia ou como medicamentos sensibilizantes em conjunto com quimioterapia ou radioterapia.

O termo "polinucleotídeo" diz respeito a qualquer molécula composta por nucleotídeos de DNA, nucleotídeos de RNA ou um combinação de ambos os tipos, isto é, que compreende duas ou mais das bases guanidina, citosina, timidina, adenina, uracila ou inosina, entre outros. Um polinucleotídeo pode incluir nucleotídeos naturais, nucleotídeos quimicamente modificados e nucleotídeos sintéticos, ou seus aná-

logos químicos. O termo inclui "oligonucleotídeos" e abrange "ácidos nucleicos".

O termo "aminoácido" diz respeito a uma molécula que consiste em qualquer um dos 20 aminoácidos de ocorrência
5 natura, aminoácidos que foram quimicamente modificados (veja abaixo) ou aminoácidos sintéticos.

O termo "polipeptídeo" diz respeito a uma molécula composta por dois ou mais resíduos de aminoácidos. O termo inclui peptídeos, polipeptídeos, proteínas e peptideomiméticos.
10 cos.

Um "peptideomimético" é um composto que contém elementos estruturais não peptídicos que podem imitar a(s)
ação(s) biológica(s) de um peptídeo pai natural. Normalmente, algumas das características do peptídeo clássico, tais
- como ligações peptídicas enzimaticamente quebráveis não estão presentes em um peptideomimético.
15

Pelo termo "peptídeo negativo dominante" entende-se um polipeptídeo codificado por um fragmento de DNAc que codifica para uma parte de uma proteína (veja Herskowitz I.:
20 Functional inactivation of genes by dominant negative mutations. Nature. 1987 Sep 17-23;329(6136):219-22. Review; Roninson IB et al., Genetic suppressor elements: new tools for molecular oncology-thirteenth Cornelius P. Rhoads Memorial Award Lecture. Cancer Res. 1995 Sep 15;55(18):4023). Este
25 peptídeo pode ter uma função diferente da proteína da qual ele foi derivado. Ele pode interagir com a proteína completa e inibir sua atividade ou ele pode interagir com outras proteínas e inibir suas atividades em resposta à proteína de

comprimento completo (pai). Negativo dominante significa que o peptídeo pode superar a proteína pai natural e inibir sua atividade para dar à célula uma característica diferente, tais como resistência ou sensibilização à morte ou qualquer
 5 fenótipo celular de interesse. Para intervenção terapêutica, o próprio peptídeo pode ser distribuído como o ingrediente ativo de uma composição farmacêutica, ou o DNAC pode ser distribuído à célula utilizando métodos conhecidos.

Preparação de peptídeos e polipeptídeos

10 Polipeptídeos podem ser produzidos por meio de diversos métodos, por exemplo:

1) Sinteticamente:

Polipeptídeos sintéticos podem ser feitos usando uma máquina comercialmente disponível, usando a seqüência de
 15 RTP801 conhecida ou uma parte desta.

2) Métodos Recombinantes:

Um método preferido para fazer os polipeptídeos de RTP801 dos seus fragmentos é clonar um polinucleotídeo que compreende o DNAC do gene RTP801 em um vetor de expressão e
 20 fazer cultura da célula que hospeda o vetor para expressar o polipeptídeo codificado e, então, purificar o polipeptídeo resultante, tudo realizado usando métodos conhecidos na tecnologia como descrito, por exemplo, em Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization. A
 25 laboratory course manual". CSHL Press (1996). (além do mais, veja Bibl Haematol. 1965; 23:1165-74 Appl Microbiol. 1967 Jul; 15(4): 851-6; Can J Biochem. 1968 May; 46(5): 441-4; Biochemistry. 1968 Jul; 7(7):2574-80; Arch Biochem Biophys.

1968 Sep 10;126(3):746-72; Biochem Biophys Res Commun. 1970 Feb 20;38(4):825-30).).

O vetor de expressão pode incluir um promotor para controlar a transcrição do material heterólogo e pode ser
5 tanto um promotor constitutivo quanto indutível para permitir transcrição seletiva. Intensificadores que podem ser exigidos para obter níveis de transcrição necessários podem ser opcionalmente incluídos. O veículo de expressão também pode incluir um gene de seleção.

10 Vetores podem ser introduzidos em células ou tecidos por qualquer um de uma variedade de métodos conhecidos na tecnologia. Tais métodos podem ser encontrados descritos no geral em Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory, New York (1989,
15 1992), em Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989), Vega et al., Gene Targeting, CRC Press, Ann Arbor, MI (1995), Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, Butterworths, Boston MA (1988) e Gilboa et al. (1986).

20 3) Purificação de fontes naturais:

O polipeptídeo de RTP801, ou seus fragmentos de ocorrência natural, pode ser purificado de fontes naturais (tais como tecidos) usando muitos métodos conhecidos pelos versados na técnica, tais como, por exemplo: imunoprecipita-
25 ção com anticorpo anti-RTP801, ou cromatografia de afinidade ligada em matriz com qualquer molécula conhecido por se ligar em RTP801. A purificação de proteína é realizada como é conhecido na tecnologia como descrito, por exemplo, em Mar-

shak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization. A laboratory course manual." CSHL Press (1996).

Por "efeito biológico de RTP801" ou "atividade biológica de RTP801" entende-se o efeito de RTP801 em distúrbios respiratórios, que pode ser direto ou indireto, e inclui, sem ser limitado pela teoria, o efeito de RTP801 na apoptose de células alveolares induzidas por distúrbios hipóxicos ou hiperóxicos. Os efeitos indiretos incluem, mas sem limitações, RTP801 se ligando a diversas moléculas que estão envolvidas em uma cascata de transdução de sinal que resulta em apoptose ou tendo um efeito sobre elas.

"Apoptose" diz respeito a um tipo fisiológico de morte celular que resulta da ativação de certos mecanismos celulares, isto, é morte que é controlada pelo mecanismo da célula. Por exemplo, a apoptose pode ser o resultado da ativação do mecanismo da célula por um disparador externo, por exemplo, uma citocina ou anticorpo anti-FAS que leva à morte celular, ou por um sinal interno. O termo "morte celular programada" também pode ser usado intercambiavelmente com "apoptose".

"Doença relacionada à apoptose" diz respeito a uma doença cuja etiologia está relacionada tanto completamente quanto parcialmente ao processo de apoptose. A doença pode ser causada tanto por uma disfunção do processo apoptótico (tais como no câncer em uma doença autoimune) ou por superatividade do processo apoptótico (tais como em certas doenças neurodegenerativas). Muitas doenças nas quais o RTP801 está

envolvido são doenças relacionadas à apoptose. Por exemplo, apoptose é um mecanismo significativo na AMD seca, através da qual ocorre lenta atrofia do fotorreceptor e das células epiteliais de pigmento, primariamente, na região central (macular) da retina. Apoptose neurorretinal também é um mecanismo significativo na retinopatia diabética.

Um "inibidor" é um composto que pode inibir a atividade de um gene ou do produto de tal gene até uma quantidade suficiente para alcançar um efeito biológico ou fisiológico desejado. Um "inibidor de RTP801" é um composto que pode inibir a atividade do gene RTP801 ou do produto do gene RTP801, particularmente, o gene ou o produto do gene RTP801 humano. Tais inibidores incluem substâncias que afetam a transcrição ou tradução do gene, bem como substâncias que afetam a atividade do produto do gene. Um inibidor de RTP801 também pode ser um inibidor do Promotor de RTP801. Exemplos de tais inibidores podem incluir, entre outros: polinucleotídeos, tais como fragmentos AS, RNAsi, ou vetores que os compreendem; polipeptídeos tais como negativos dominantes, anticorpos, e enzimas; RNAs catalíticos, tais como ribozimas; e moléculas químicas com um baixo peso molecular, por exemplo, um peso molecular abaixo de 2.000 daltons. Inibidores de RTP801 específicos são dados a seguir.

"Vetor de expressão" diz respeito a um vetor que tem a capacidade de incorporar e expressar fragmentos de DNA heterólogos em uma célula estrangeira. Muitos vetores de expressão procarióticos e eucarióticos são conhecidos e/ou comercialmente disponíveis. A seleção de vetores de expressão

apropriados é de conhecimento dos versados na técnica.

O termo "anticorpo" diz respeito a anticorpos IgG, IgM, IgD, IgA, e IgE, entre outros. A definição inclui anticorpos policlonais ou anticorpos monoclonais. Este termo diz
5 respeito a anticorpos completos ou fragmentos de anticorpos que compreendem um domínio que se liga a antígeno, por exemplo, anticorpos sem a parte Fc, anticorpos de cadeia única, mini-anticorpos, fragmentos que consistem, essencialmente, somente do domínio que se liga a antígeno variável do anticorpo, etc. O termo "anticorpo" também pode dizer respeito a
10 anticorpos contra seqüências de polinucleotídeo obtidos por vacinação de DNAc. O termo também abrange fragmentos de anticorpo que retêm a capacidade de se ligar seletivamente com seus antígenos ou receptores e são exemplificados como segue, entre outros:

(1) Fab, o fragmento que contém um fragmento monovalente que se liga a antígeno de um molécula de anticorpo que pode ser produzida pela digestão de todo o anticorpo com o enzima papaína para produzir uma cadeia leve e uma parte
20 da cadeia pesada;

(2) $(\text{Fab}')_2$, o fragmento do anticorpo que pode ser obtido pelo tratamento de todo o anticorpo com a enzima pepsina sem subsequente redução; $\text{F(ab}'_2)$ é um dímero de dois fragmentos Fab mantidos juntos por duas ligações dissulfeto;

25 (3) Fv, definido como um fragmento geneticamente construído que contém a região variável da cadeia leve e a região variável da cadeia pesada expressadas como duas cadeias; e

(4) Anticorpo de cadeia única (SCA), definido como uma molécula geneticamente construída que contém a região variável da cadeia leve e a região variável da cadeia pesada ligadas por um ligador de polipeptídeo adequado como uma molécula de cadeia única geneticamente fundida.

Minicorpos e Microcorpos também são incluídos neste termo. Microcorpos são proteínas muito pequenas (tipicamente, cerca de 28-45 aminoácidos) com estruturas pseudonó, que são altamente seletivos e estáveis. Portanto, qualquer uma das aplicações e compostos inéditos aqui divulgados que incluem anticorpos pode incluir, como substituição, um minicorpo ou microcorpo como a parte de anticorpo da molécula.

Pelo termo "epítopo", como usado nesta invenção, entende-se um determinante antigênico em um antígeno no qual o anticorpo se liga. Usualmente, determinantes epitópicos consistem de agrupamentos de moléculas com superfície quimicamente ativa, tais como aminoácidos ou cadeias laterais de açúcar e, usualmente, têm características estruturais tridimensionais específicas, bem como, características de carga específicas.

Preparação de anticorpos anti-RTP801

Anticorpos que se ligam em RTP801 ou em um fragmento derivado dele podem ser preparados usando um polipeptídeo intacto ou fragmentos que contêm polipeptídeos menores como o antígeno imunizante. Por exemplo, pode ser desejável produzir anticorpos que se ligam especificamente a N- ou C-terminais ou a quaisquer outros domínios adequados do RTP801. O polipeptídeo usado para imunizar um animal pode

ser derivado de DNAC traduzido ou de síntese química e pode ser conjugado a uma proteína carreadora, se desejado. Tais carreadores comumente usados que são quimicamente acoplados no polipeptídeo incluem hemocianina de lapa californiana (K-LH), tiroglobulina, albumina sérica bovina (BSA) e toxóide do tétano. Então, o polipeptídeo acoplado é usado para imunizar o animal.

Se desejado, anticorpos policlonais ou monoclonais podem ser adicionalmente purificados, por exemplo, pela ligação em uma matriz na qual o polipeptídeo ou um peptídeo no qual os anticorpos foram destacados é ligado e pela eluição dela. Versados na técnica conhecem várias técnicas comuns em imunologia para a purificação e/ou concentração de anticorpos policlonais bem como monoclonais (Coligan et al, Unit 9, Current Protocols in Immunology, Wiley Interscience, 1994).

Métodos para fazer anticorpos de todos os tipos, incluindo fragmentos, são conhecidos na tecnologia (veja, por exemplo, Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1988)). Métodos de imunização, incluindo todas as etapas necessárias para preparar o imunógeno em um adjuvante adequado, para determinar a ligação de anticorpo, isolamento de anticorpos, métodos para obter anticorpos monoclonais, e humanização de anticorpos monoclonais são todos conhecidos pelos versados na técnica.

Os anticorpos podem ser anticorpos humanizado ou anticorpos humanos. Anticorpos podem ser humanizados usando uma variedade de técnicas conhecidas na tecnologia, incluindo

do enxerto CDR (EP 239,400: publicação PCT WO91/09967; patente US 5.225.539, 5.530.101 e 5.585.089, entalhe ou resurgimento (EP 592.106; EP 519.596; Padlan, Molecular Immunology 28(4/5):489-498 (1991); Studnicka et al., Protein Engineering 7(6):805-814 (1994); Roguska et al., PNAS 91:969-973 (1994)), e embaralhamento de cadeias (patente US 5.565.332).

Os anticorpos monoclonais definidos incluem anticorpos derivados de uma espécie (tais como murino, coelho, cabra, rato, humano, etc.), bem como anticorpos derivados de duas (ou mais) espécies, tais como anticorpos quiméricos e humanizados.

Anticorpos completamente humanos são particularmente desejáveis para o tratamento terapêutico de pacientes humanos. Anticorpos humanos podem ser feitos por uma variedade de métodos conhecidos na tecnologia, incluindo métodos de exibição de fago que usam bibliotecas de anticorpo derivadas de seqüências de imunoglobulina humana. Veja, também, patente US 4.444.887 e 4.716.111 e publicações PCT WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735, e WO 91/10741, cada uma das quais é aqui incorporada pela referência em suas íntegras.

Informação adicional considerando todos os tipos de anticorpos, incluindo anticorpos humanizados, anticorpos humanos e fragmentos de anticorpos, pode ser encontrada em WO 01/05998, que é aqui incorporada pela referência em sua íntegra.

Anticorpos neutralizantes podem ser preparados pe-

los métodos discutidos anteriormente, possivelmente, com uma etapa adicional de triagem para atividade neutralizante, por exemplo, por um ensaio de sobrevivência.

Os termos "composto químico", "pequena molécula",
5 "molécula química" "pequena molécula química" e "pequeno composto químico" são aqui usados intercambiavelmente e são entendidos por dizer respeito a frações químicas de qualquer tipo em particular que pode ser sinteticamente produzido ou obtido de fontes naturais e, usualmente, têm um peso molecu-
10 lar de menos de 2.000 daltons, menos de 1.000 daltons ou ainda menos do que 600 daltons.

A presente invenção também diz respeito a ácidos nucleicos funcionais que compreendem uma estrutura de fita dupla, seus usos para a fabricação de um medicamento, uma
15 composição farmacêutica que compreende tais ácidos nucleicos funcionais e um método para o tratamento de um paciente.

Hipóxia foi reconhecida como um elemento chave no patomecanismo de um grande número de doenças, tais como derrame cerebral, enfisema e infarto que são associados com
20 disponibilidade de oxigênio e respostas ao dano do tecido em relação às condições de hipóxia subideais. Em tecidos de crescimento rápido, incluindo tumor, uma disponibilidade de oxigênio subideal é compensada por neoangiogênese indesejada. Portanto, pelo menos no caso de doenças do câncer, o
25 crescimento de vasculatura é indesejado.

Em vista disto, a inibição de angiogênese e do crescimento vascular, respectivamente, são objetos de intensa pesquisa. Hoje em dia, já estão disponíveis alguns com-

postos que inibem angiogênese e crescimento vascular indesejados. Alguns dos compostos mais proeminentes são aqueles que inibem VEGF e o receptor de VEGF. Em ambos os casos, o efeito de VEGF é evitado tanto pelo bloqueio de VEGF como
5 tal, por exemplo, pelo uso de um anticorpo direcionado contra VEGF, tal como perseguido por AVASTIN de Genentech (AB monoclonal específico para VEGF) (Ferrara N.; Endocr Rev. 2004 Aug; 25(4):581-611), quanto pelo bloqueio do receptor correspondente, isto é o receptor de VEGF (Trailer P; Cancer
10 Res. 2004 Jul 15;64(14):4931-41; ou Stadler WM et al., Clin Cancer Res. 2004 May 15;10(10):3365-70).

Entretanto, já que a angiogênese e o crescimento de vasculatura é um processo muito básico e vital em qualquer animal e ser humano, o efeito deste tipo de composto
15 deve ser focalizado no sítio em particular onde a angiogênese e o crescimento vascular é realmente indesejado, que produz alvejamento apropriado ou distribui um assunto crítico em conjunto com este tipo de abordagem terapêutica.

Assim, é um objetivo da presente invenção fornecer
20 dispositivo adicionalmente para o tratamento de doenças que envolvem crescimento de vasculatura e angiogênese indesejados, respectivamente.

Por "pequeno RNA interferente" (RNAi) entende-se uma molécula de RNA que diminui ou silencia (impede) a ex-
25 pressão de um gene / RNAm de suas contrapartes celulares endógenas. Entende-se que o termo abrange "interferência de RNA" (RNAi). Interferência de RNA (RNAi) diz respeito ao processo de silenciamento genético pós-transcricional espe-

cífico de sequência em mamíferos mediado por pequenos RNAs interferentes (RNAsis) (Fire et al, 1998, Nature 391, 806). O processo correspondente em plantas é comumente chamado de silenciamento genético ou silenciamento de RNA pós-transcricional específico, e também é chamado de repressão em fungos. A resposta da interferência de RNA pode apresentar um complexo de endonuclease que contém um RNAsi, comumente chamado de um complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), que media a clivagem de RNA de fita única com sequência complementar à fita anti-sentido do duplex RNAsi. A clivagem do RNA alvo pode ocorrer no meio da região complementar à fita anti-sentido do duplex RNAsi (Elbashir et al 2001, Genes Dev., 15, 188). Para informação recente sobre estes termos e mecanismos propostos, veja Bernstein E., Denli AM., Hannon GJ: The rest is silence. RNA. 2001 Nov; 7(11): 1509-21; e Nishikura K.: A short primer on RNAi: RNA-directed RNA polymerase acts as a key catalyst. Cell. 2001 Nov 16; 107(4):415-8. Exemplos de moléculas de RNAsi que podem ser usados na presente invenção são dados nas Tabelas A-D.

Durante os anos atuais, RNAi surgiu como um dos métodos mais eficientes para a inativação de genes (Nature Reviews, 2002, v.3, p.737-47; Nature, 2002, v.418,p.244-51). Como um método, ele é baseado na disponibilidade da espécie de RNAds entrar em um complexo de proteína específico, onde, então, ela é alvejada ao RNA celular complementar e o degrada especificamente. Com mais detalhes, RNAdss são digeridos em curtos (17-29 bp) RNAs inibidores (RNAsis) pelos RNases

tipo III (DICER, Drosha, etc.) (Nature, 2001, v.409, p.363-6; Nature, 2003, 425, p.415-9). Estes fragmentos e RNAm complementar são reconhecidos pelo complexo RISC específico da proteína. O processo completo é culminado pela clivagem com endonuclease do RNAm alvo (Nature Reviews, 2002, v.3, p.737-47; Curr Opin Mol Ther. 2003 Jun; 5(3):217-24).

Para a divulgação de como projetar e preparar RNA-si para genes conhecidos, veja, por exemplo, Pei & Tuschl On the Art of Identifying Effective and Specific siRNAs Nature Methods 3 No. 9 September 2006; Chalk AM, Wahlestedt C, Sonhammer EL. Improved and automated prediction of effective siRNA Biochem. Biophys. Res. Commun. 2004 Jun 18; 319(1):264-74; Sioud M, Leirdal M., Potential design rules and enzymatic synthesis of siRNAs, Methods Mol Biol. 2004; 252:457-69; Levenkova N, Gu Q, Rux JJ.: Gene specific siRNA selector Bioinformatics. 2004 Feb 12; 20(3):430-2. e Ui-Tei K, Naito Y, Takahashi F, Haraguchi T, Ohki-Hamazaici H, Juni A, Ueda R, Saigo K., Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference Nucleic Acids Res. 2004 Feb 9; 32(3):936-48. Veja também Liu Y, Braasch DA, Nulf CJ, Corey DR. Efficient and isoformselective inhibition of cellular gene expression by peptide nucleic acids Biochemistry, 2004 Feb 24; 43(7):1921-7. Veja também publicações PCT WO 2004/015107 (Atugen) e WO 02/44321 (Tuschl et al), e também Chiu YL, Rana TM. siRNA function in RNAi: a chemical modification analysis, RNA 2003 Sep; 9(9):1034-48 e patentes US 5.898.031 e 6.107.094 (Crooke) para a produção de RNAsis modificados / mais estáveis.

Foram desenvolvidos vetores com base em DNA que podem gerar RNAsi em células. No geral, o método envolve a transcrição de curtos RNAs tipo alça que são eficientemente processados para forma RNAsis nas células. Paddison et al. PNAS 2002, 99:1443-1448; Paddison et al. Genes & Dev 2002, 16:948-958; Sui et al. PNAS 2002, 8:5515-5520; e Brummelkamp et al. Science 2002, 296:550-553. Estes relatórios descrevem métodos para gerar RNAsis que podem alvejar especificamente inúmeros genes endógena e exogenamete expressados.

Para distribuição de RNAsis, veja, por exemplo, Shen et al (FEBS letters 539: 111-114 (2003)), Xia et al., Nature Biotechnology 20: 1006-1010 (2002), Reich et al., Molecular Vision 9: 210-216 (2003), Sorensen et al. (J.Mol.Biol. 327: 761-766 (2003), Lewis et al., Nature Genetics 32: 107-108 (2002) e Simeoni et al., Nucleic Acids Research 31, 11: 2717-2724 (2003). RNAsi foi recentemente usado com sucesso para inibição em primatas; para detalhes adicionais, veja Tolentino et al., Retina 24(1) February 2004 pp 132-138.

RNAsis da presente invenção

Especificações gerais dos RNAsis da presente invenção

No geral, os RNAsis usados na presente invenção compreendem um ácido ribonucléico que compreende uma estrutura de fita dupla, em que a estrutura de fita dupla compreende uma primeira fita e uma segunda fita, em que a primeira fita compreende um primeiro trecho de nucleotídeos contíguos e em que o dito primeiro trecho é pelo menos parcialmente

complementar a um ácido nucléico alvo, e a segunda fita compreende um segundo trecho de nucleotídeos contíguos e em que o dito segundo trecho é pelo menos parcialmente idêntico a um ácido nucléico alvo, em que a dita primeira fita e/ou a dita segunda fita compreende uma pluralidade de grupos de nucleotídeos modificados com uma modificação na posição 2', em que, na fita, cada grupo de nucleotídeos modificados é flanqueado em um ou em ambos os lados por um grupo de flanqueamento de nucleotídeos, em que os nucleotídeos de flanqueamento que formam o grupo de flanqueamento de nucleotídeos é tanto um nucleotídeo não modificado quanto um nucleotídeo com uma modificação diferente da modificação dos nucleotídeos modificados. Adicionalmente, a dita primeira fita e/ou a dita segunda fita podem compreender a dita pluralidade de nucleotídeos modificados e podem compreender a dita pluralidade de grupos de nucleotídeos modificados.

O grupo de nucleotídeos modificados e/ou o grupo de nucleotídeos de flanqueamento pode compreender um número de nucleotídeos de acordo como qual o número é selecionado do grupo que compreende um nucleotídeo até 10 nucleotídeos. Em conjunto com qualquer uma das faixas aqui especificadas, entende-se que cada faixa divulga qualquer número inteiro individual entre as respectivas figuras usadas para definir a faixa que inclui as ditas duas figuras que definem a dita faixa. Assim, no caso atual, o grupo compreende um nucleotídeo, dois nucleotídeos, três nucleotídeos, quatro nucleotídeos, cinco nucleotídeos, seis nucleotídeos, sete nucleotídeos, oito nucleotídeos, nove nucleotídeos e dez nucleotí-

deos.

O padrão de nucleotídeos modificados da dita primeira fita pode ser o mesmo padrão de nucleotídeos modificados da dita segunda fita, e pode alinhar com o padrão da dita segunda fita. Adicionalmente, o padrão da dita primeira fita pode ser deslocado em um ou mais nucleotídeos em relação ao padrão da segunda fita.

As modificações discutidas anteriormente podem ser selecionadas do grupo que compreende amina, flúor, metóxi e alquila.

A estrutura de fita dupla do RNAsi pode ter extremidade cega em um ou em ambos os lados. Mais especificamente, a estrutura de fita dupla pode ter extremidade cega no lado da estrutura de fita dupla que é definido pela extremidade 5' da primeira fita e pela extremidade 3' da segunda fita, ou a estrutura de fita dupla pode ter extremidade cega no lado da estrutura de fita dupla que é definido pela extremidade 3' da primeira fita e pela extremidade 5' da segunda fita.

Adicionalmente, pelo menos uma das duas fitas pode ter uma abundância de pelo menos um nucleotídeo na extremidade 5'; a abundância pode consistir de pelo menos um desoxiribonucleotídeo. Opcionalmente, pelo menos uma das fitas também pode ter uma abundância de pelo menos um nucleotídeo na extremidade 3'.

Tipicamente, o comprimento da estrutura de fita dupla do RNAsi é de cerca de 17 a 21, e mais preferivelmente, 18 ou 19 bases. Adicionalmente, o comprimento da dita

primeira fita e/ou o comprimento da dita segunda fita pode, independentemente um do outro, ser selecionado do grupo que compreende as faixas de cerca de 15 até cerca de 23 bases, 17 a 21 bases e 18 ou 19 bases.

5 Adicionalmente, a complementaridade entre a dita primeira fita e o ácido nucléico alvo pode ser perfeita, ou o duplex formado entre a primeira fita e o ácido nucléico alvo pode compreender pelo menos 15 nucleotídeos em que há uma não correspondência ou duas não correspondências entre a
10 dita primeira fita e o ácido nucléico alvo que forma a dita estrutura de fita dupla.

 Em alguns casos, tanto a primeira fita quanto a segunda fita, cada qual, compreende pelo menos um grupo de nucleotídeos modificados e pelo menos um grupo de flanqueamento de nucleotídeos, em que cada grupo de nucleotídeos mo-
15 dificados compreende pelo menos um nucleotídeo e em que cada grupo de flanqueamento de nucleotídeos compreendendo pelo menos um nucleotídeo com cada grupo de nucleotídeos modifi- cados da primeira fita sendo alinhado com um grupo de flan-
20 queamento de nucleotídeos na segunda fita, de acordo com qual o nucleotídeo mais S'-terminal da primeira fita é um nucleotídeo do grupo de nucleotídeos modificados, e o nucleotídeo mais 3'-terminal da segunda fita é um nucleotídeo do grupo de flanqueamento de nucleotídeos. Cada grupo de nucle-
25 otídeos modificados pode consistir de um único nucleotídeo e/ou cada grupo de flanqueamento de nucleotídeos pode consistir de um único nucleotídeo.

 Adicionalmente, é possível que, na primeira fita,

o nucleotídeo que forma o grupo de flanqueamento de nucleotídeos seja um nucleotídeo não modificado que é arranjado em uma direção 3' em relação ao nucleotídeo que forma o grupo de nucleotídeos modificados, e, na segunda fita, o nucleotídeo que forma o grupo de nucleotídeos modificados seja um nucleotídeo modificado que é arranjado na direção 5' em relação ao nucleotídeo que forma o grupo de flanqueamento de nucleotídeos.

Adicionalmente, a primeira fita do RNAsi pode compreender oito a doze, preferivelmente, nove a onze grupos de nucleotídeos modificados, e a segunda fita pode compreender sete a onze, preferivelmente, oito a dez grupos de nucleotídeos modificados.

A primeira fita e a segunda fita podem ser ligadas por uma estrutura de laço, que pode ser composta por um polímero de ácido não nucléico, tais como, entre outros, polietilenoglicol. Alternativa, a estrutura de laço pode ser composta por um ácido nucléico.

Adicionalmente, o 5'-terminal da primeira fita do RNAsi pode ser ligado ao 3'-terminal da segunda fita, ou a extremidade 3' da primeira fita pode ser ligado ao 5'-terminal da segunda fita, a dita ligação sendo por meio de um ligador de ácido nucléico, tipicamente, com um comprimento entre 10 - 2.000 nucleobases.

Especificações em particular de RNAsis da presente invenção

A invenção fornece um composto com a estrutura (estrutura A):

5' (N)_x-Z3' (fita anti-sentido)

3'Z'-(N')_y 5' (fita sentido)

em que cada N e N' é um ribonucleotídeo que pode ser modificado ou não modificado em seu resíduo de açúcar e

5 (N)_x e (N')_y, são oligômeros nos quais cada N ou N' consecutivo é unido ao próximo N ou N' por uma ligação covalente;

em que cada um de x e y é um número inteiro entre 19 e 40;

em que cada um de Z e Z' pode estar presente ou
10 ausente, mas se presente pode ser dTdT e covalentemente anexado no 3'-terminal da fita na qual ele está presente;

e em que a sequência de (N)_x compreende uma sequência complementar ao DNAC do gene RTP801.

Em particular, a invenção fornece o composto anterior,
15 rior, em que a sequência de (N)_x compreende uma ou mais das sequências anti-sentido presentes nas Tabelas A, B, C e D, em particular, Tabela D.

Em particular, a invenção fornece o composto anterior em que a ligação covalente é uma ligação fosfodiéster,
20 em que x = y, preferivelmente, em que x = y = 19, em que Z e Z' estão ambos ausentes, em que pelo menos um ribonucleotídeo é modificado em seu resíduo de açúcar na posição 2', em que a fração na posição 2' é metóxi (2'-O-metila), em que ribonucleotídeos alternados são modificados tanto na fita
25 anti-sentido quanto na fita sentido, e em que ribonucleotídeos nos 5' e 3'-terminais do fita anti-sentido são modificados em seus resíduos de açúcar, e os ribonucleotídeos nos 5' e 3'-terminais da fita sentido não são modificados em

seus resíduos de açúcar.

Em particular, o RNAsi usado na presente invenção é um oligoribonucleotídeo em que uma fita compreende nucleotídeos consecutivos com, de 5' a 3', a sequência apresentada em SEQ ID NOs: 3-52 ou nas SEQ ID NOs: 103-174 ou nas SEQ ID NOs: 247-295 ou nas SEQ ID NOs 345-440 (que são fitas sentido), em que uma pluralidade de bases pode ser modificada, preferivelmente por uma modificação 2-O-metila ou por um homólogo desta, em que em até 2 dos nucleotídeos em cada região terminal uma base é alterada.

Adicionalmente, a presente invenção fornece um método para tratar um paciente que sofre de um distúrbio respiratório, de uma doença ocular, de um distúrbio microvascular, de um distúrbio do ouvido, de úlceras de pressão ou de outros ferimentos da carne associados ao acamamento ou de uma lesão ou doença da medula espinhal, compreendendo administrar ao paciente uma composição farmacêutica que compreende um composto da estrutura exposta (A) (com qualquer uma das especificações supramencionadas) em uma quantidade terapêuticamente efetiva para, desse modo, tratar o paciente. Adicionalmente, a invenção fornece o uso de uma quantidade terapêuticamente efetiva da estrutura exposta (A) (com qualquer uma das especificações supramencionadas) para a preparação de um medicamento para promover a recuperação em um paciente que sofre de um distúrbio respiratório, de uma doença ocular, de um distúrbio microvascular, de um distúrbio do ouvido, de úlceras de pressão ou de outros ferimentos da carne associados ao acamamento ou de lesão ou doença da me-

dula espinhal.

Um aspecto adicional da presente invenção fornece uma composição farmacêutica que compreende um composto da estrutura exposta (A) para o tratamento de qualquer uma das
5 doenças e distúrbios aqui mencionados.

Adicionalmente, este aspecto fornece uma composição farmacêutica que compreende dois ou mais compostos da estrutura exposta (A) para o tratamento de qualquer uma das doenças e distúrbios aqui mencionados, em que os ditos dois
10 compostos podem ser fisicamente misturados juntamente na composição farmacêutica em quantidades que geram atividade benéfica igual ou de outra forma benéfica, ou podem ser covalentemente ou não covalentemente ligados, ou unidos por um ligador de ácido nucleico de um comprimento que varia de 2-
15 100, preferivelmente, 2-50 ou 2-30 nucleotídeos. Portanto, tais moléculas de RNAsi são compostas por estrutura de ácido nucleico de fita dupla como aqui descrito, em que duas seqüências de RNAsi selecionadas das Tabelas A-D, e preferivelmente da Tabela A, ID Nos: 14, 22, 23, 25, 27, 39, 41,
20 42, 49 e 50 ou RNAsi Nos: 257, 260-262, e 264-268 da Tabela D são covalentemente ou não covalentemente ligados ou unidos por um ligador para formar uma molécula acoplada de RNAsi. Tipicamente, tais moléculas acopladas de RNAsi compreendendo duas seqüências de RNAsi terão 38-150 nucleotídeos de comprimento, mais preferivelmente 38 ou 40-60 nucleotídeos de
25 comprimento, e maior, dessa maneira, se mais do que duas seqüências de RNAsi forem incluídas na molécula acoplada. Uma molécula acoplada maior composta por duas ou mais seqüências

maiores que codificam RNAsi produzido por meio de processamento celular interno, por exemplo, grandes RNAdss, também é concebida, como é uma molécula acoplada que codifica dois ou mais RNAsi. Tais molécula acopladas também são consideradas
5 uma parte da presente invenção, e informação adicional as considerando é dada a seguir.

As ditas estruturas combinadas ou acopladas têm a vantagem de que a toxicidade e/ou efeitos fora do alvo de cada RNAsi são minimizados, enquanto que a eficácia aumenta.

10 Em particular, o RNAsi usado nos exemplos foi do mesmo modo modificado de maneira tal que um grupo 2'-O-Me estava presente nos primeiro, terceiro, quinto, sétimo, nono, décimo primeiro, décimo terceiro, décimo quinto, décimo sétimo e décimo nono nucleotídeos da fita anti-sentido, em que
15 exatamente a mesma modificação, isto é, um grupo 2'-O-Me estava presente nos segundo, quarto, sexto, oitavo, décimo, décimo segundo, décimo quarto, décimo sexto e décimo oitavo nucleotídeo da fita sentido. Adicionalmente, percebe-se que no caso destes ácidos nucléicos em particular de acordo com
20 a presente invenção, o primeiro trecho é idêntico à primeira fita e o segundo trecho é idêntico à segunda fita e que estes ácidos nucléicos também têm extremidade cega. O RNAsi usado foi fosforilado, mas percebe-se que uma versão fosforilada pode ser mais simples de preparar em grande escala e
25 descobriu-se que o dito REDD14 desfosforilado, chamado REDD-14NP, é exatamente tão biologicamente ativo quanto REDD-14 em um modelo CNV (veja Exemplo 6). A sequência deste RNAsi usado nos experimentos dos Exemplos 6-8 é aquela do REDD14,

isto é, a sequência com referência interna No. 14 (veja Tabela A). Os RNAsis usados nos experimentos do Exemplo 14 são chamados 801_1 e 801_4; 801_1 tem número de referência interno 257 na Tabela D (SEQ ID NO: 429 [sentido] e 525 [anti-sentido]) e 801_4 tem número de referência interno 260 na Tabela D (SEQ ID NO: 432 [sentido] e 528 [anti-sentido]) (veja Tabela D).

Tais RNAs também podem ser fosforilados ou desfosforilados.

10 A região terminal do oligonucleotídeo diz respeito às bases 1-4 e/ou 16-19 nas sequências 19-mer (Tabelas A, B e D a seguir) e às bases 1-4 e/ou 18-21 nas sequências 21-mer (Tabela C a seguir).

Adicionalmente, os RNAsis usados na presente invenção são oligoribonucleotídeos em que uma fita compreende nucleotídeos consecutivos com, de 5' a 3', a sequência apresentada SEQ ID NOS: 53-102 ou SEQ ID NOS: 175-246 ou SEQ ID NOS: 296-344 ou SEQ ID NOS: 441-536 (fitas anti-sentido) ou um homólogo destes em que em até 2 dos nucleotídeos em cada
20 região terminal uma base é alterada.

Assim, em aspectos em particular, o oligonucleotídeo compreende uma estrutura de fita dupla, em que tal estrutura de fita dupla compreende uma primeira fita e uma segunda fita, em que a primeira fita compreende um primeiro
25 trecho de nucleotídeos contíguos e a segunda fita compreende um segundo trecho de nucleotídeos contíguos, em que o primeiro trecho é tanto complementar quanto idêntico a uma sequência de ácido nucléico que codifica para o gene RTP801 e

em que o segundo trecho é tanto idêntico quanto complementar a uma sequência de ácido nucléico que codifica para RTP801. O dito primeiro trecho compreende pelo menos 14 nucleotídeos, preferivelmente pelo menos 18 nucleotídeos, e ainda mais preferivelmente 19 nucleotídeos ou mesmo pelo menos 21 nucleotídeos. Em uma modalidade, o primeiro trecho compreende de cerca de 14 a 40 nucleotídeos, preferivelmente de cerca de 18 a 30 nucleotídeos, mais preferivelmente de cerca de 19 a 27 nucleotídeos, e ainda mais preferivelmente de cerca de 19 a 23 nucleotídeos. Em uma modalidade, o segundo trecho compreende de cerca de 14 a 40 nucleotídeos, preferivelmente de cerca de 18 a 30 nucleotídeos, mais preferivelmente de cerca de 19 a 27 nucleotídeos, e ainda mais preferivelmente de cerca de 19 a 23 nucleotídeos ou mesmo cerca de 19 a 21 nucleotídeos. Em uma modalidade, o primeiro nucleotídeo do primeiro trecho corresponde a um nucleotídeo da sequência de ácido nucléico que codifica para RTP801, em que o último nucleotídeo do primeiro trecho corresponde a um nucleotídeo da sequência de ácido nucléico que codifica para RTP801. Em uma modalidade o primeiro trecho compreende uma sequência de pelo menos 14 nucleotídeos contíguos de um oligonucleotídeo, em que tal oligonucleotídeo é selecionado do grupo que compreende SEQ. ID. Nos. 3-536, preferivelmente do grupo que compreende os oligoribonucleotídeos com a sequência de qualquer um dos números seriais 14, 22, 23, 25, 27, 39, 41, 42, 49 e 50 na Tabela A ou 260-262, e 264-268 na Tabela D. Adicionalmente, especificações das moléculas de RNAsi usadas na presente invenção podem fornecer um oligoribonucleotídeo em

que o dinucleotídeo dTdT é covalentemente anexado no 3'-terminal, e/ou em pelo menos um nucleotídeo um resíduo de açúcar é modificado, possivelmente, com uma modificação compreendendo uma modificação 2'-O-metila. Adicionalmente, o grupo 2'OH pode ser substituído por um grupo ou fração selecionados dos grupos que compreendem -H-OCH₃, -OCH₂CH₃, -OCH₂CH₂CH₃, -NH₂, e F. Adicionalmente, os compostos preferíveis da presente invenção divulgados anteriormente podem ser fosforilados ou desfosforilados.

Adicionalmente, o RNAsi usado na presente invenção pode ser um oligoribonucleotídeo em que em nucleotídeos alternados, açúcares modificados estão localizados em ambas as fitas. Particularmente, o oligoribonucleotídeo pode compreender uma das fitas sentido em que o açúcar não é modificado nos nucleotídeos 5' e 3'- terminal, ou uma das fitas anti-sentido fitas em que o açúcar é modificado nos nucleotídeos 5' e 3'- terminal.

Adicionalmente, ácidos nucléicos adicionais a ser usados na presente invenção compreende pelo menos 14 nucleotídeos contíguos de qualquer uma das SEQ. ID. NO. 3 a 536, e mais preferivelmente 14 pares base de nucleotídeos contíguos em qualquer final da estrutura de fita dupla composta pelo primeiro trecho e pelo segundo trecho, como exposto. Versados na técnica entendem que dado o comprimento potencial do ácido nucléico de acordo com a presente invenção e, particularmente, dos trechos individuais que formam tal ácido nucléico de acordo com a presente invenção, alguns deslocamentos em relação à sequência de codificação do gene RTP801 de-

talhados na SEQ ID NO:1 para cada lado é possível, em que tais deslocamentos podem ser de até 1, 2, 3, 4, 5 e 6 nucleotídeos em ambas as direções, e em que a assim gerada molécula de ácidos nucléicos de fita dupla também devem estar na
5 presente invenção.

Um aspecto adicional da presente invenção diz respeito a um ácido nucléico funcional que compreende uma estrutura de fita dupla, em que tal estrutura de fita dupla compreende:

10 uma primeira fita e uma segunda fita, em que
 a primeira fita compreende um primeiro trecho de nucleotídeos contíguos e a segunda fita compreende um segundo trecho de nucleotídeos contíguos, em que
 o primeiro trecho é tanto complementar quanto i-
15 dêntico a um seqüência de ácido nucléico que codifica para RTP801 e em que o segundo trecho é tanto idêntico quanto complementar a uma seqüência de ácido nucléico que codifica para RTP801.

Em uma modalidade, o ácido nucléico é infraregulador do RTP801, em que a infra-regulação de RTP801 é selecionada do grupo que compreende infra-regulação da função RTP801, infra-regulação da proteína de RTP801 e infra-regulação de expressão de RNAm de RTP801.
20

Em uma modalidade, o primeiro trecho compreende
25 pelo menos 14 nucleotídeos, preferivelmente pelo menos 18 nucleotídeos e ainda mais preferivelmente 19 nucleotídeos.

Em uma modalidade, o primeiro trecho compreende de cerca de 14 a 40 nucleotídeos, preferivelmente de cerca de

18 a 30 nucleotídeos, mais preferivelmente de cerca de 19 a 27 nucleotídeos e ainda mais preferivelmente de cerca de 19 a 23 nucleotídeos.

Em uma modalidade, o segundo trecho compreende de cerca de 14 a 40 nucleotídeos, preferivelmente de cerca de 18 a 30 nucleotídeos, mais preferivelmente de cerca de 19 a 27 nucleotídeos e ainda mais preferivelmente de cerca de 19 a 23 nucleotídeos.

Em uma modalidade, o primeiro nucleotídeo do primeiro trecho corresponde a um nucleotídeo da sequência de ácido nucléico que codifica para RTP801, em que o último nucleotídeo do primeiro trecho corresponde a um nucleotídeo da sequência de ácido nucléico que codifica para RTP801.

Em uma modalidade, um trecho compreende uma sequência de pelo menos 14 nucleotídeos contíguos de uma sequência de ácido nucléico, em que tal sequência de ácido nucléico é selecionada das sequências divulgadas nas Tabelas A-D, preferivelmente do grupo que compreende SEQ. ID. NOS 53, 66, 67, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 91, 92, 93, 94, 96, 101 102, 525, 528, 529, 530, 532, 533, 534, 535 e 536, mais preferivelmente selecionado do grupo que compreende SEQ. ID. Nos 66, 75, 79, 91, 94, 101, 102, 525 e 528, e ainda mais preferivelmente selecionado do grupo que compreende SEQ. ID. Nos 66, 74, 75, 79, 525 e 528.

Em uma modalidade, o outro trecho compreende uma sequência de pelo menos 14 nucleotídeos contíguos de uma sequência de ácido nucléico, em que tal sequência de ácido nucléico é selecionada das sequências divulgadas nas Tabelas

A-D, preferivelmente do grupo que compreende SEQ. ID. NOs. 3, 16, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 29, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 51, 52, 429, 432, 433, 434, 436, 437, 438, 439, e 440, mais preferivelmente selecionada do grupo que compreende SEQ. ID.

5 Nos 16, 24, 25, 29, 41, 44, 51, e 52, e ainda mais preferivelmente selecionada do grupo que compreende SEQ. ID. Nos 16, 24, 25 e 29.

Em uma modalidade:

10 o primeiro trecho tem uma sequência de acordo com SEQ. ID. NO. 53 e o segundo trecho tem uma sequência de acordo com SEQ. ID. NO. 3;

o primeiro trecho tem uma sequência de acordo com SEQ. ID. NO. 66 e o segundo trecho tem uma sequência de acordo com SEQ. ID. NO. 16;

15 o primeiro trecho tem uma sequência de acordo com SEQ. ID. NO. 67 e o segundo trecho tem uma sequência de acordo com SEQ. ID. NO. 17;

20 o primeiro trecho tem uma sequência de acordo com SEQ. ID. NO. 72 e o segundo trecho tem uma sequência de acordo com SEQ. ID. NO. 22;

o primeiro trecho tem uma sequência de acordo com SEQ. ID. NO. 73 e o segundo trecho tem uma sequência de acordo com SEQ. ID. NO. 23;

25 o primeiro trecho tem uma sequência de acordo com SEQ. ID. NO. 74 e o segundo trecho tem uma sequência de acordo com SEQ. ID. NO. 24;

o primeiro trecho tem uma sequência de acordo com SEQ. ID. NO. 75 e o segundo trecho tem uma sequência de a-

cordo com SEQ. ID. NO. 25;

o primeiro trecho tem uma sequência de acordo com SEQ. ID. NO. 76 e o segundo trecho tem uma sequência de acordo com SEQ. ID. NO. 26;

5 o primeiro trecho tem uma sequência de acordo com SEQ. ID. NO. 77 e o segundo trecho tem uma sequência de acordo com SEQ. ID. NO. 27;

o primeiro trecho tem uma sequência de acordo com SEQ. ID. NO. 79 e o segundo trecho tem uma sequência de acordo com SEQ. ID. NO. 29;

o primeiro trecho tem uma sequência de acordo com SEQ. ID. NO. 91 e o segundo trecho tem uma sequência de acordo com SEQ. ID. NO. 41;

15 o primeiro trecho tem uma sequência de acordo com SEQ. ID. NO. 92 e o segundo trecho tem uma sequência de acordo com SEQ. ID. NO. 42;

o primeiro trecho tem uma sequência de acordo com SEQ. ID. NO. 93 e o segundo trecho tem uma sequência de acordo com SEQ. ID. NO. 43;

20 o primeiro trecho tem uma sequência de acordo com SEQ. ID. NO. 94 e o segundo trecho tem uma sequência de acordo com SEQ. ID. NO. 44;

o primeiro trecho tem uma sequência de acordo com SEQ. ID. NO. 95 e o segundo trecho tem uma sequência de acordo com SEQ. ID. NO. 45;

25 o primeiro trecho tem uma sequência de acordo com SEQ. ID. NO. 96 e o segundo trecho tem uma sequência de acordo com SEQ. ID. NO. 46;

o primeiro trecho tem uma sequência de acordo com SEQ. ID. NO. 101 e o segundo trecho tem uma sequência de acordo com SEQ. ID. NO. 51;

o primeiro trecho tem uma sequência de acordo com
5 SEQ. ID. NO. 102 e o segundo trecho tem uma sequência de acordo com SEQ. ID. NO. 52.

Em uma modalidade, o primeiro trecho tem uma sequência de ácido nucléico que é selecionada do grupo que compreende SEQ. ID. NO. 53, 66, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 79,
10 91, 92, 93, 94, 95, 96, 101, 102, 525, 528, 529, 530, 532, 533, 534, 535 e 536.

Entende-se que, embora os termos "primeiro" e "segundo" trechos sejam usados em conjunto com os ácidos nucléicos da presente invenção, eles são usados somente a título de conveniência, e qualquer molécula de ácido nucléico
15 da invenção que é descrita com um primeiro trecho com a sequência X e com um segundo trecho com a sequência Y, também pode, igualmente, ser descrito com um primeiro trecho com a sequência Y e com um segundo trecho com a sequência X, con-
20 tanto que entenda-se que um trecho está incluído na fita anti-sentido, que deve ser anti-sentido em relação a uma parte da sequência de codificação do gene RTP801, e que o outro trecho está incluído na fita sentido, que deve ser complementar (embora não 100 % complementar) à fita anti-sentido,
25 tudo de acordo com as definições e especificações aqui apresentadas.

Em uma modalidade, a primeiro e/ou a segunda fitas compreendem pelo menos um nucleotídeo em abundância na ex-

tremidade 3' que é complementar ou idêntico ao nucleotídeo correspondente de uma seqüência de ácido nucléico que codifica para RTP801.

Em uma modalidade, a primeira e/ou a segunda fitas
5 compreendem de 1 a 15 nucleotídeos em abundância na extremidade 3', preferivelmente a primeira e/ou a segunda fitas compreendem de 1 a 10 nucleotídeos em abundância na extremidade 3', mais preferivelmente a primeira e/ou a segunda fitas compreendem de 1 a 5 nucleotídeos em abundância na ex-
10 tremidade 3', e ainda mais preferivelmente a primeira e/ou a segunda fitas compreendem de 1 a 2 nucleotídeos em abundância na extremidade 3'.

Em uma modalidade, a primeira fita e/ou a segunda fita compreendem pelo menos um nucleotídeo em abundância que
15 é diferente do nucleotídeo correspondente da seqüência de ácido nucléico que codifica para RTP801.

Em uma modalidade, a primeira fita compreende dois nucleotídeos em abundância que são diferentes do nucleotídeo correspondente de uma seqüência de ácido nucléico que codi-
20 fica para RTP801.

Em uma modalidade, a primeira fita consiste do primeiro trecho somente.

Em uma modalidade, a segunda fita consiste do segundo trecho somente.

25 Em uma modalidade, o primeiro trecho e/ou a primeira fita compreende(s) ribonucleotídeos.

Em uma modalidade, o segundo trecho e/ou a segunda fita compreende(s) ribonucleotídeos.

Em uma modalidade, o primeiro trecho e/ou a segunda fita consiste(s) de ribonucleotídeos.

Em uma modalidade, alguns ou todos os nucleotídeos são modificados.

5 Em uma modalidade preferida, tal modificação está relacionada à fração de nucleobase do nucleotídeo, À fração de açúcar do nucleotídeo e/ou à fração de fosfato do nucleotídeo.

10 Em uma modalidade mais preferida, a modificação é um modificação de uma fração de açúcar e a modificação é uma modificação na posição 2', em que o grupo 2'OH é substituído por um grupo ou fração selecionados do grupo que compreende -H-OCH₃, -OCH₂CH₃, -OCH₂CH₂CH₃, -NH₂, e -F.

15 Em uma modalidade, a modificação é uma modificação da fração de nucleobase e a modificação ou nucleobase modificado é selecionado do grupo que compreende inosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metila, 2-propila e outras alquiladeninas, 5-halo uracila, 5-halocitosina, 5-halo citosina, 6-azacitosina, 6-aza timina, pseudo-uracila, 4-
20 tiouracila, 8-halo adenina, 8-aminoadenina, 8-tiol adenina, 8-tiolalquil adeninas, 8-hidroxil adenina e outras adeninas 8-substituídas, 8-halo guaninas, 8-amino guanina, 8-tiol guanina, 8-tioalquil guanina, 8-hidroxilguanina e outras guaninas substituídas, outras aza- e deaza adeninas, outras
25 aza- e deaza guaninas, 5-trifluormetil uracila e 5-triflúor citosina.

Em uma modalidade, a modificação é uma modificação da fração de fosfato, em que a fração de fosfato modificada

é selecionada do grupo que compreende fosfotioato.

Em uma modalidade, o primeiro trecho e/ou o segundo trecho compreendem uma pluralidade de grupos de nucleotídeos modificados com uma modificação na posição 2', em que,
5 no trecho, cada grupo de nucleotídeos modificados é flanqueado em um ou em ambos os lados por m grupo de flanqueamento de nucleotídeos, de acordo com qual os nucleotídeos de flanqueamento que formam o grupo de flanqueamento de nucleotídeos são tanto um nucleotídeo não modificado quanto um nucleotídeo com uma modificação diferente da modificação dos
10 nucleotídeos modificados.

Em uma modalidade preferida, o primeiro trecho e/ou o segundo trecho consistem de ribonucleotídeos.

Em uma modalidade mais preferida, o primeiro e o
15 segundo trechos compreendem uma pluralidade de grupos de nucleotídeos modificados.

Em uma modalidade, o primeiro trecho compreende a dita pluralidade de grupos de nucleotídeos modificados.

Em uma modalidade, o segundo trecho compreende a
20 dita pluralidade de grupos de nucleotídeos modificados.

Em uma modalidade, cada grupo de nucleotídeos modificados e/ou cada grupo de nucleotídeos de flanqueamento compreendem inúmeros nucleotídeos, em que o número é selecionado do grupo que compreende de um nucleotídeo a dez nucleotídeos.
25

Em uma modalidade, o primeiro trecho compreende um primeiro padrão de nucleotídeos modificados e o segundo trecho compreende um segundo padrão de nucleotídeos modifica-

dos.

Em uma modalidade, o primeiro padrão é o mesmo padrão do segundo padrão.

Em uma outra modalidade, o primeiro padrão se alinha com o segundo padrão.

Em uma modalidade preferida, o primeiro padrão é deslocado em um ou mais nucleotídeos em relação ao segundo padrão.

Em uma modalidade, cada um dos grupos de nucleotídeos modificados consiste de um nucleotídeo modificado e cada um dos grupos de nucleotídeos de flaqueamento consiste de um nucleotídeo não modificado ou de um nucleotídeo com uma modificação que é diferente da modificação dos nucleotídeos modificados.

Em uma modalidade preferida, o nucleotídeo modificado tem um grupo -OMe na posição 2'.

Em uma modalidade preferida, o nucleotídeo de flaqueamento é um ribonucleotídeo que tem um grupo 2'OH.

Em uma modalidade, o primeiro trecho começa com um nucleotídeo modificado na extremidade 5' e todos os outros nucleotídeos do trecho também são um nucleotídeo modificado, enquanto que um segundo nucleotídeo que começa da extremidade 5' e todos os outros nucleotídeos são um nucleotídeo não modificado ou um nucleotídeo com uma modificação que é diferente da modificação do(s) nucleotídeo(s) modificado(s).

Em uma modalidade, o primeiro trecho está em orientação anti-sentido em relação à sequência de ácido nucléico que codifica para RTP801.

Um aspecto adicional da presente invenção diz respeito a uma composição farmacêutica que compreende um ácido nucléico de acordo com o primeiro aspecto da presente invenção e/ou um vetor de acordo com o segundo aspecto da presente invenção e, preferivelmente, um carreador farmacêuticamente aceitável. A dita composição sendo, opcionalmente, para administração sistêmica ou local.

Em uma modalidade, a composição é para o tratamento de uma doença, em que a doença é selecionada do grupo que compreende doenças de tumor.

Em um aspecto adicional, o problema fundamental da presente invenção é resolvido por um método para o impedimento e/ou tratamento de um paciente com necessidade de tais impedimento e/ou tratamento que compreendem a administração de um ácido nucléico de acordo com a presente invenção e/ou do vetor de acordo com a presente invenção e/ou de uma composição farmacêutica de acordo com a presente invenção.

Em uma modalidade adicional, um ácido nucléico de acordo com a presente invenção e/ou um vetor de acordo com a presente invenção são usados para a fabricação de um medicamento. O medicamento pode ser para o impedimento e/ou tratamento de uma doença, em que tal doença é selecionada do grupo que compreende doenças de tumor. A doença de tumor pode ser selecionada do grupo que compreende tumores sólidos, tumores metastáticos incluindo tumores PTEN negativo, tumores que são resistentes a medicamentos e tumores em que a inibição de RTP801 pode ser usada para sensibilização. Adicionalmente, a doença de tumor pode ser um doença de tumor em es-

tágio avançado ou pode envolver células que são supressoras negativas de tumor. O dito supressor pode ser PTEN.

Um aspecto adicional da presente invenção é resolvido por um método para desenhar ou para triar um ácido nucleico que é adequado para infra-regular RTP801, compreendendo as seguintes etapas:

a) desenhar ou triar um ácido nucleico que é adequado para infra-regular RTP801;

b) avaliar o defeito de um ácido nucleico de acordo com qualquer um dos aspectos expostos da presente invenção; e

c) comparar o efeito do ácido nucleico da etapa a) com o efeito do ácido nucleico da etapa b).

Em uma modalidade, o efeito é a infra-regulação de RTP801.

Um aspecto adicional da presente invenção é o uso de um ácido nucleico de acordo com a presente invenção como um sensibilizador, particularmente, como um sensibilizador no tratamento de uma doença, em que tal doença é selecionada, preferivelmente, do grupo que compreende tumor e, mais particularmente, tumores que são resistentes a um tratamento usando produtos quimioterapêuticos e/ou radioterapêuticos. Doenças adicionais para as quais um ácido nucleico da presente invenção pode servir como um sensibilizador são aqui divulgadas.

Este pedido divulga que um ácido nucleico que compreende uma estrutura de fita dupla que é específica para RTP801 é um dispositivo adequado para inibir angiogênese /

crescimento de vasculatura e vazamento vascular, (tanto da vasculatura existente quanto da vasculatura desenvolvida). Adicionalmente, este pedido divulga (sem ser limitado pela teoria) que RTP801, sendo uma proteína indutível por tensão (induzida por hipóxia, tensão oxidante, tensão térmica, tensão ER), é um fator que age no ajuste fino da resposta celular ao desequilíbrio energético. Assim, a inibição de RTP801 por tal ácido nucléico de fita dupla é adequada para o tratamento de qualquer doença em que as células devem ser salvas da apoptose em função de distúrbios de tensão (por exemplo, doenças acompanhadas pela morte de células normais) ou em que células adaptadas a distúrbios por tensão em função de mudanças na expressão de RTP801 devem ser mortas (por exemplo, células de tumor). Neste último caso, mediante a inibição de RTP801 por meio de tal ácido nucléico de fita dupla, este fator de sobrevivência com função antiapoptótica nas células hipóxicas, mais particularmente, células cancerosas hipóxicas, fica inefetivo, assim, permitindo que as células desprovidas de proteção mediada por RTP801 sejam levadas à apoptose. Isto pode ocorrer, adicionalmente, quando outros fatores de promoção de apoptose estão presentes. Tais outros fatores de promoção de apoptose incluem, entre outros, quimioterapia e radioterapia. Em outras palavras, o ácido nucléico de fita dupla de acordo com a presente invenção pode ser efetivo sozinho no tratamento do câncer (monoterapia) e também como uma terapia complementar.

Tal estrutura de fita dupla compreende uma primeira fita e uma segunda fita, em que a primeira fita compreen-

de um primeiro trecho de nucleotídeos contíguos e a segunda fita compreende um segundo trecho de nucleotídeos contíguos, em que o primeiro trecho é tanto complementar quanto idêntico a uma sequência de ácido nucléico que codifica para RTP801 e em que o segundo trecho é tanto idêntico quanto complementar a uma sequência de ácido nucléico que codifica para RTP801. Assim, particularmente, pelo uso de RTP801 como um alvo para tal tipo de ácido nucléico de fita dupla, também é possível abordar imediatamente um alvo na cascata envolvida no crescimento e desenvolvimento da vasculatura e da angiogênese, respectivamente, e, assim, de uma maneira diferente, comparado com a rota usada por inibidores VEGF, tais como anticorpos VEGF. Sem desejar ser limitado por nenhuma teoria, os presentes inventores consideram que o ácido nucléico de acordo com a presente invenção pode exercer sua função naquelas células que fornecem um ambiente que está envolvido com qualquer doença em que ocorre angiogênese induzida por hipóxia e/ou crescimento ou desenvolvimento de vasculatura particularmente indesejados ou que é observado em conjunto com elas. Este entendimento é suportado pelo achado de que camundongos knock-out expostos a RTP801 não exibem nenhum fenótipo diferente dos camundongos tipo selvagem sob distúrbios não hipóxicos. Somente mediante indução de hipóxia como observado em uma condição de doença, tal como, por exemplo, crescimento de tumor, o knock-out relacionado a RTP801 resulta em uma patologia similar àquela observada em humanos que sofrem deste tipo de doença.

Entende-se que, preferivelmente, o ácido nucléico

de acordo com a presente invenção é um ácido nucléico funcional. Como aqui usado, preferivelmente, o termo ácido nucléico funcional significa um ácido nucléico cuja função é diferente de ser ativo na célula como um modelo para a transcrição de qualquer RNAhn, RNAm, ou qualquer outro produto de transcrição, em que ambos os ditos RNAhn, RNAm ou qualquer outro produto de transcrição, respectivamente, ou o ácido nucléico de acordo com a presente invenção são sujeitos a um processo de tradução, preferivelmente, um processo de tradução celular que resulta em uma proteína de RTP801 biologicamente ativa. Reconhece-se que um ácido nucléico funcional, como aqui preferivelmente usado, pode reduzir a expressão de um ácido nucléico alvo. Mais preferivelmente, tal redução é baseada em um processo de silenciamento genético pós-transcricional do ácido nucléico alvo. Ainda mais preferivelmente, tal redução é baseada na interferência de RNA. Uma forma mais preferida do ácido nucléico funcional é uma molécula de RNAsi ou qualquer molécula adicional com o mesmo efeito de uma molécula de RNAsi. Tal molécula adicional é selecionada do grupo que compreende RNAsis, RNAsis sintéticos, RNAshs e RNAshs sintéticos. Da forma aqui usada, RNAsis podem compreender adicionalmente RNAsis derivados de vetor de expressão, em que o vetor de expressão é, em uma modalidade preferida, um vírus, tais como Adenovírus, vírus Adenoassociados, Herpesvírus e Lentivírus. Da forma aqui usada, preferivelmente, RNAsi significa RNAs tipo alça. Tal RNAsi pode ser feito sinteticamente ou pode ser gerado usando sistemas de expressão codificados por vetor, preferivel-

mente, usando promotores de polimerase III de RNA. Em conjunto com isto, percebe-se que o ácido nucléico funcional de acordo com a presente invenção é direcionado ao RTP801 que também é preferivelmente aqui chamado de o alvo e o ácido nucléico que codifica para o dito alvo como o ácido nucléico alvo.

Da forma preferivelmente aqui usada, a estrutura de fita dupla do ácido nucléico de acordo com a presente invenção compreende qualquer estrutura de fita dupla, em que tal estrutura de fita dupla é preferivelmente gerada pelo primeiro trecho e pelo segundo trecho fornecidos pelo ácido nucléico com o desenho básico. A estrutura de fita dupla pode compreender uma ou diversas não correspondências. Tal estrutura de fita dupla é formada pelo pareamento Watson-Crick-base e/ou pelo pareamento Hoogsteen base e/ou por mecanismos de pareamento de base similares. Com base no desenho básico do ácido nucléico de acordo com a presente invenção, é preferido que um trecho esteja em orientação anti-sentido em relação a uma seqüência de ácido nucléico que codifica para RTP801 ou a uma parte desta, enquanto que o outro trecho esteja na orientação sentido em relação a uma seqüência de ácido nucléico que codifica para RTP801 ou a uma parte desta. Em virtude disto, um trecho é complementar a uma seqüência de ácido nucléico que codifica para RTP801 ou para uma parte deste, e o outro trecho é idêntico a uma seqüência de ácido nucléico que codifica para RTP801 ou para uma parte deste. Em conjunto com isto, percebe-se que o termo idêntico, certamente, também significa parcialmente idên-

tico, em que a identidade, expressa como homologia, é de pelo menos 80 %, preferivelmente 90 %, mais preferivelmente 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % ou 100 %. Similar à definição da identidade, complementaridade pode ser definida em termos de homologia, em que tal homologia é da mesma faixa de identidade se a fita complementar for traduzida em fita idêntica de acordo com as regras do pareamento Watson-Crick base. Em uma modalidade alternativa, um trecho é idêntico a uma sequência de ácido nucléico que codifica para RTP801 ou a uma parte deste, e o outro trecho é complementar a uma sequência de ácido nucléico que codifica para RTP801 ou a uma parte deste.

Em uma modalidade preferida, o ácido nucléico de acordo com a presente invenção consiste de função infraregulador de RTP801. Preferivelmente, a função de infraregulação de RTP801 acontece pela redução no nível de expressão no nível da proteína e/ou no nível do RNAm, em que tal reduzido nível de expressão, preferivelmente, no nível da proteína, pode ser tão pequeno quanto 5 % e pode ser tão alto quanto 100 %, em relação a uma expressão sob condições em que o ácido nucléico de acordo com a presente invenção não é administrado ou não está funcionalmente ativo. Preferivelmente, tais condições são as condições de um sistema de expressão, ou como presentes neles, preferivelmente, um sistema de expressão para RTP801. Preferivelmente, tal sistema de expressão é um sistema de tradução que pode ser um sistema de tradução in vitro, mais preferivelmente uma célula, órgão e/ou organismo. É mais preferível que o organismo seja

um organismo multicelular, mais preferivelmente um mamífero, em que tal mamífero seja selecionado, preferivelmente, do grupo que compreende homem, macaco, camundongo, rato, porquinho da índia, coelho, gato, cachorro, carneiro, vaca, cavalo, gado e porco. Em conjunto com a infra-regulação, percebe-se que a dita infra-regulação pode ser em função do tempo, isto é, o efeito da infra-regulação não é, necessariamente, observado imediatamente mediante a administração ou a ativação funcional dos ácidos nucléicos de acordo com a presente invenção, mas pode ser atrasado no tempo bem como no espaço, isto é, em várias células, tecidos e/ou órgãos. Tal atraso pode variar de 5 % - 100 %, preferivelmente de 10 a 50 %. Versados na técnica percebem que uma redução de 5 % para um maior período de tempo pode ser tão efetiva quanto uma redução de 100 % durante um menor período de tempo. Versados na técnica também percebem que tal atraso depende fortemente ácido nucléico funcional em particular realmente usado, bem como da população celular alvo e, assim, em última análise, da doença a ser tratada e/ou impedida de acordo com o preceito técnico do presente pedido. Até um certo ponto, uma redução de 5 % durante um maior período de tempo pode ser tão efetiva quanto uma redução de 100% durante um menor período de tempo. Versados na técnica também percebem que o atraso pode ocorrer em qualquer nível como delineado anteriormente, isto é, um atraso na função, em que tal função é qualquer função exibida por RTP801, um atraso na expressão de proteína ou um atraso no nível de expressão de RNAm.

Em uma modalidade preferida, o primeiro trecho

compreende pelo menos 14 nucleotídeos, preferivelmente 14 nucleotídeos contíguos. Versados na técnica percebem que o primeiro trecho deve ter um comprimento que seja adequado para permitir abordar especificamente uma sequência de ácido

5 nucléico que codifica para RTP801 e, mais especificamente, o ácido nucléico que codifica para RTP801 presente no sistema de tradução em que a expressão de RTP801 deve ser reduzida. Novamente, sem desejar ser limitado por nenhuma teoria nem por nenhum modo de ação do ácido nucléico de acordo com a

10 presente invenção, parece que há uma interação entre o ácido nucléico de acordo com a presente invenção e a sequência de ácido nucléico que codifica para RTP801, preferivelmente no nível de transcrição, isto é, mediante a geração de um RNAm da respectiva sequência de ácido nucléico que codifica para

15 RTP801. Assim, em função da probabilidade de que alguma sequência do ácido nucléico de acordo com a presente invenção seja idêntica ou complementar a uma sequência contida no genoma ou no transcriptoma do sistema de tradução, o comprimento do primeiro trecho deve ser tão longo quanto necessá-

20 rio para a certeza de que, sob a consideração de que algum tipo de pareamento de base entre o ácido nucléico que codifica para RTP801 e uma das fitas do ácido nucléico de acordo com a presente invenção realmente ocorre, somente a sequência que codifica para RTP801, mas nenhuma outra sequência de

25 codificação, certamente nenhuma outra sequência de codificação essencial, do genoma ou do transcriptoma é abordada para tal pareamento de base ou por ele. Por este comprimento, a ocorrência de efeitos fora do alvo pode ser reduzida e, pre-

ferivelmente, eliminada. Para aumentar o rigor deste tipo de RTP801 especificamente abondante e a sequência de ácido nucléico que codifica para ele, preferivelmente, o primeiro trecho tem um comprimento de pelo menos 18 ou 19 nucleotídeos. Preferivelmente, o limite superior para o comprimento do primeiro trecho é menor do que 50 nucleotídeos, entretanto, o comprimento pode ser significativamente maior e pode compreender 100, 200 ou mesmo 500 nucleotídeos ou qualquer comprimento entre estes. Além disto, versados na técnica preferirão ter um primeiro trecho especialmente curto, particularmente, no caso em que o ácido nucléico de acordo com a presente invenção é quimicamente sintetizado, quanto mais curta for a sequência, o mais rápido e com menos consumo de material sua síntese ocorrerá e mais inferior será a taxa na qual nucleotídeos incorretos são inseridos na respectiva sequência. Um outro fator que deve ser levado em consideração em conjunto com a fixação do comprimento do primeiro trecho é o fato de que, tipicamente, em um comprimento além de 50 ou mais nucleotídeos, uma resposta de interferon não específica pode ser observada. Depende da condição em particular a ser tratada se este tipo de resposta de interferon não específica deve ser tolerada ou não. Por exemplo, uma resposta de interferon pode ser tolerada se a resposta de interferon e/ou a expressão dos genes de interferon puderem ser limitados às células patogênicas.

Em vista disto, comprimentos mais preferidos do primeiro trecho são de cerca de 14 a 40 nucleotídeos, de 18 a 30 nucleotídeos, de 19 a 27 nucleotídeos, de 21 a 25 nu-

cleotídeos e de 19 a 23 nucleotídeos.

As mesmas considerações delineadas anteriormente para o primeiro trecho são aplicáveis ao segundo trecho que, assim, pode compreender qualquer comprimento aqui descrito em conjunto com o primeiro trecho. Também está na presente invenção o fato de que o comprimento do primeiro trecho é diferente do comprimento do segundo trecho, entretanto, é preferido que ambos os trechos tenham o mesmo comprimento.

De acordo com o desenho básico do ácido nucléico, o primeiro trecho e segundo trecho são partes da primeira fita e da segunda fita, respectivamente, do ácido nucléico de acordo com a presente invenção. Percebe-se que em ambas as extremidades, isto é, na extremidade 5' bem como na extremidade 3', a primeira fita e/ou a segunda fita podem compreender um ou diversos nucleotídeos, preferivelmente, nucleotídeos adicionais, em qualquer combinação.

Em conjunto com isto, percebe-se que aqueles nucleotídeos da fita individual que vão além da(s) extremidade(s) do trecho correspondente à respectiva fita podem ser usados para contribuir adicionalmente com a complementaridade e com a identidade do trecho, respectivamente, e, assim, com a abordagem específico da seqüência de ácido nucléico que codifica para RTP801.

Percebe-se que, basicamente, com base no preceito técnico aqui fornecido, o ácido nucléico de acordo com a presente invenção pode abordar qualquer parte da seqüência de ácido nucléico que codifica para RTP801, preferivelmente que codifica para RTP801 no sistema de tradução em que a ex-

pressão de RTP801 deve ser reduzida. Até certo ponto, a presente invenção compreende qualquer ácido nucléico com as características aqui definidas, em que as fitas e trechos do ácido nucléico de acordo com a presente invenção complementares e idênticas podem começar, basicamente, de qualquer nucleotídeo da sequência de ácido nucléico que codifica para RTP801. Dessa maneira, sob a condição de que o primeiro trecho do ácido nucléico de acordo com a presente invenção seja complementar à sequência de ácido nucléico que codifica para RTP801, isto é, a sua fita anti-sentido ou que está em orientação anti-sentido a ela, o primeiro nucleotídeo do dito trecho, isto é, o nucleotídeo mais 5'-terminal corresponde, isto é, se alinha, ao último nucleotídeo da sequência que codifica para RTP801 na extremidade 3'. Em uma modalidade adicional, tal nucleotídeo mais 5'-terminal corresponde ao penúltimo nucleotídeo do ácido nucléico que codifica para RTP801, e assim por diante, que seja alcançada a última posição que, dado o comprimento do trecho anti-sentido, ainda permite que a o fita anti-sentido do ácido nucléico de acordo com a presente invenção seja complementar à sequência de ácido nucléico que codifica para RTP801. Até certo ponto, está na presente invenção qualquer ácido nucléico de acordo com a presente invenção que pode ser gerado pela varredura da sequência de ácido nucléico que codifica para RTP801 começando do seu nucleotídeo mais 5'-terminal e cobrindo sobre o desenho básico do ácido nucléico de acordo com a presente invenção e realizando as características para tal ácido nucléico de acordo com a presente invenção. As mesmas conside-

rações são aplicáveis às modalidades aqui divulgadas em que a complementaridade e a identidade do ácido nucléico de acordo com a presente invenção é fornecida não somente pelo primeiro trecho e pelo segundo trecho, respectivamente, mas
5 tais complementaridade e identidade também envolvem um ou mais nucleotídeos além do primeiro trecho e do segundo trecho, respectivamente, sendo, então, parte da primeira fita e da segunda fita, respectivamente.

Dos vários ácidos nucléicos de acordo com a presente invenção aqui divulgados, aqueles com números de referência internos 14, 22, 23, 25, 27, 39, 41, 42, 49 e 50 (veja Tabela A) e 257, 260-262, e 264-268 (veja Tabela D) são particularmente preferidos. Em conjunto com isto, percebe-se que aqueles ácidos nucléicos de acordo com a presente invenção
10 ção que podem ser usados tanto em humano quanto em um modelo animal, tais como rato e/ou camundongo, são particularmente usados. A surpreendente vantagem destes ácidos nucléicos em particular de acordo com a presente invenção reside no fato de que eles são efetivos tanto em humanos quanto em um modelo animal, o que significa que os resultados de teste obtidos no modelo animal pode ser imediatamente transferido do modelo animal ao ser humano, e mais particularmente, sem a necessidade de fazer nenhuma mudança na seqüência humana que, de outra forma, seria necessária no caso em que o ácido
15 nucléico de acordo com a presente invenção fosse projetado tal como para compreender uma(s) seqüência(s) que difere entre as espécies, mais particularmente, a espécie usada para o teste em modelo animal e em homem como os organismos ou
20
25

paciente preferidos definitivos. É adicionalmente preferível que estes ácidos nucléicos tenham uma modificação padrão, também descrita nos exemplos.

Entretanto, também está na presente invenção o fato de que qualquer uma das seqüências de acordo com SEQ. ID. NOS. 3, 16-17, 22-27, 29, 41-46, 51-53, 66-67, 72-77, 79, 91-96 101-102, 525, 528-530, 532-536, e respectivas combinações resultantes na molécula de ácidos nucléicos de acordo com a presente invenção com números de referência internos 14, 22, 23, 25, 27, 39, 41, 42, 49 e 50 (da Tabela A) e 257, 260-262, e 264-268 (da Tabela D) estão somente parcialmente contidas em um ácido nucléico adicional de acordo com a presente invenção. Preferivelmente, os ácidos nucléicos adicionais de acordo com a presente invenção compreendem pelo menos 14 nucleotídeos contíguos do SEQ. ID. NOS 3, 16-17, 22-27, 29, 41-46, 51-53, 66-67, 72-77, 79, 91-96 101-102, 525, 528-530, 532-536, e mais preferivelmente, 14 pares base de nucleotídeos contíguos em qualquer extremidade da estrutura de fita dupla incluída no primeiro trecho e no segundo trecho como delineado na tabela precedente. Versados na técnica também entendem que dado o comprimento em potencial do ácido nucléico de acordo com a presente invenção e, particularmente, dos trechos individuais que formam tal ácido nucléico de acordo com a presente invenção, são possíveis alguns deslocamentos em relação à seqüência de codificação de RTP801 para cada lado, em que tais deslocamentos pode ser de até 1, 2, 3, 4, 5 e 6 nucleotídeos em ambas as direções, e em que a assim gerada molécula de ácidos nucléicos de fita dupla tam-

bém devem estar na presente invenção.

Em uma modalidade preferida da presente invenção, o primeiro trecho e a primeira fita têm o mesmo comprimento. Igualmente, é preferível que a segunda fita tenha o mesmo
5 comprimento do segundo trecho, em que é ainda mais preferível que o primeiro trecho e o segundo trecho tenham o mesmo comprimento. Em uma modalidade ainda mais preferida, a primeira fita compreende somente o primeiro trecho e a segunda fita compreende somente o segundo trecho. Em uma modalidade
10 ainda mais preferida, nem o primeiro trecho, e assim a primeira fita, nem o segundo trecho, e assim a segunda fita, compreendem uma abundância. Em outras palavras, também está na presente invenção o fato de que os ácidos nucleicos de fita dupla de acordo com a presente invenção têm extremidade
15 cega, preferivelmente, em cada extremidade da estrutura de fita dupla dos ácidos nucleicos de acordo com a presente invenção. Tal estrutura com extremidade cega pode ser realizada em conjunto com quaisquer outras modalidades dos ácidos nucleicos de acordo com a presente invenção, particularmente, aquelas modalidades em que os ácidos nucleicos de acordo
20 com a presente invenção têm uma modificação padrão, mais preferivelmente, uma modificação padrão aqui descrita.

Em um aspecto adicional, o ácido nucleico de acordo com a presente invenção tem, assim, um desenho básico que
25 fornece extremidades cegas em ambas as extremidades da estrutura de fita dupla do ácido nucleico de acordo com a presente invenção. Entretanto, também está na presente invenção o fato de que há uma abundância, isto é, um trecho de um ou

mais nucleotídeos que projetam-se da estrutura de fita dupla. A abundância pode ser, em princípio, na extremidade 5' da fita anti-sentido, na extremidade 3' da fita anti-sentido, na extremidade 5' da fita sentido e/ou na extremidade 3' da fita sentido. Percebe-se que a realização de qualquer uma das ditas opções, bem como de qualquer combinação destas, está na presente invenção. É mais preferida uma combinação, em que a abundância está localizada na extremidade 3' da fita anti-sentido e na extremidade 3' da fita sentido. Também está na presente invenção o fato de que a abundância é na extremidade 5' da fita anti-sentido e na extremidade 5' da fita sentido. Além do mais, está na presente invenção o fato de que a abundância é localizada somente na fita anti-sentido da estrutura de fita dupla, mais preferivelmente, na extremidade 3' da fita anti-sentido da estrutura de fita dupla.

Em conjunto com as abundâncias, percebe-se que a abundância mais o trecho formam, preferivelmente, a fita e os comprimentos aqui fornecidos para os trechos se aplicam também a estas modalidades. A abundância individual pode, independente de sua localização, consistir de pelo menos um nucleotídeo. Entretanto, a abundância individual pode compreender tanto quanto 10 e, preferivelmente, tem dois nucleotídeos de comprimento. Está na presente invenção o fato de que o(s) respectivo(s) nucleotídeo(s) que formam a(s) abundância(s) também é(s) complementar(s) à seqüência de ácido nucléico que codifica para RTP801 no caso da primeira fita ser complementar à dita seqüência de ácido nucléico que co-

difica para RTP801, e a abundância sendo na extremidade 3' ou 5' da fita anti-sentido, ou de que a(s) abundância(s) é(s) idêntica(s) à sequência de ácido nucléico que codifica para RTP801 no caso da primeira fita ser idêntica à sequência de ácido nucléico que codifica para RTP801. O mesmo se aplica a qualquer abundâncias localizadas no segundo trecho do desenho básico do ácido nucléico de acordo com a presente invenção, em que percebe-se que o desenho da abundância no segundo trecho pode ser independente do desenho da abundância no primeiro trecho.

Também está na presente invenção o fato de que os nucleotídeos que formam abundância não são nem complementares nem idênticos aos nucleotídeos correspondentes da sequência de ácido nucléico que codifica para RTP801. Da forma aqui usada, e preferivelmente neste modalidade, "correspondente" significa os nucleotídeos respectivos que seguem na extremidade 5' e/ou na extremidade 3' do trecho com uma contraparte de nucleotídeo no ácido nucléico que codifica para RTP801.

Preferivelmente, a primeira fita compreende no seu extremidade 3' dois nucleotídeos, preferivelmente, desoxinucleotídeos, e mais preferivelmente, dois TT e/ou estes tipos de nucleotídeos também na extremidade 3' da segunda fita, em que, mais preferivelmente, o comprimento do primeiro trecho e do segundo trecho é 19 nucleotídeos. Assim, as fitas são incluídas no trecho e na abundância. Nesta modalidade, a estrutura de fita dupla consiste em 19 pares base e uma abundância de dois nucleotídeos em cada final da extremidade 3'

trecho individual.

Em uma modalidade preferida, o primeiro trecho e/ou a primeira fita compreende(s) ribonucleotídeos, em que é particularmente preferível que o primeiro trecho consista, em sua íntegra, de ribonucleotídeos. O mesmo se aplica ao segundo trecho e à segunda fita, respectivamente. Entretanto, em conjunto com isto, cada um e todos os nucleotídeos do primeiro trecho e do segundo trecho, respectivamente, são modificados em uma modalidade preferida. O mesmo se aplica à primeira fita e à segunda fita, respectivamente. Particularmente, os nucleotídeos terminais, independente se eles são ribonucleotídeos ou desoxiribonucleotídeos, podem ter um grupo OH que, como tal, pode ser modificado. Tal grupo OH pode derivar tanto da fração de açúcar do nucleotídeo, mais preferivelmente da posição 5 no caso do grupo 5'OH e/ou da posição 3' no caso do grupo 3'OH, quanto de um grupo fosfato anexado na fração de açúcar do respectivo nucleotídeo terminal. Em princípio, o grupo fosfato pode ser anexado em qualquer grupo OH da fração de açúcar do nucleotídeo. Preferivelmente, o grupo fosfato é anexado no grupo 5'OH da fração de açúcar, no caso do grupo 5'OH livre, e/ou no grupo 3'OH da fração de açúcar, no caso do grupo 3'OH livre, ainda fornecendo o que é aqui chamado de grupo 5' ou 3' OH livre.

Da forma aqui usada com qualquer estratégia para o desenho do RNAi ou com qualquer modalidade de RNAi aqui divulgada, o termo modificação final significa uma entidade química adicionada ao nucleotídeo mais 5' ou 3' das primeira e/ou segunda fitas. Exemplos para tais modificações finais

incluem, mas sem limitações, fosfato 3' ou 5', abásicos (de-soxi) invertidos, amina, flúor, cloro, bromo, CN, CF, metó-xi, imidazola, caboxilato, tioato, alquila C₁ a C₁₀ inferior, alquila inferior substituída, alcarila ou aralquila, OCF₃,
 5 OCN, O-, S- ou N-alquila; O-, S- ou N-alquenila; SOCH₃; SO₂CH₃; ONO₂; NO₂, N₃; heterocicloalquila; heterocicloalcari-la; aminoalquilamino; polialquilamino ou silano substituído, como, entre outros, descritos nas patentes européias EP 0 586 520 B1 ou EP 0 618 925 B1.

10 Da forma aqui usada, alquila ou qualquer termo que compreende "alquila" significa, preferivelmente, qualquer cadeia de átomo de carbono que compreende 1 a 12, preferi-velmente 1 a 6 e mais, preferivelmente 1 a 2 átomos C.

Uma modificação final adicional é um grupo bioti-
 15 na. Preferivelmente, tal grupo biotina pode ser anexado tan-to no nucleotídeo mais 5' quanto no mais 3' das primeira e/ou segunda fitas ou em ambos os finais. Em uma modalidade mais preferida, o grupo biotina é acoplado em um polipeptí-deo ou em uma proteína. Também está no escopo da presente
 20 invenção o fato de que o polipeptídeo ou a proteína são ane-xados por meio de qualquer uma as outras supramencionadas modificações finais. O polipeptídeo ou proteína podem confe-rir características adicionais à molécula de ácidos nucléi-cos de acordo com a presente invenção. Entre outros, o poli-
 25 peptídeo ou a proteína podem agir como um ligante a uma ou-tra molécula. Se a dita outra molécula for um receptor, a função e a atividade do receptor podem ser ativadas pelo li-gante de ligação. O receptor pode mostrar uma atividade de

internalização que permite uma efetiva transfecção das moléculas de ácidos nucleicos ligadas a ligante de acordo com a presente invenção. Um exemplo para o ligante a ser acoplado na molécula de ácido nucleico inventiva é VEGF e o receptor correspondente é o receptor de VEGF.

Várias modalidades possíveis do RNAi da presente invenção com diferente(s) tipo(s) de modificação(s) final(s) são apresentadas na seguinte Tabela 1.

Tabela 1: várias modalidades do ácido ribonucleico interferente de acordo com a presente invenção

	1ª fita / 1º trecho	2ª fita / 2º trecho
1) extremidade 5'	sem OH	sem OH
extremidade 3'	sem OH	sem OH
2) extremidade 5'	sem OH	sem OH
extremidade 3'	modificação final	modificação final
3) extremidade 5'	sem OH	sem OH
extremidade 3'	sem OH	modificação final
4) extremidade 5'	sem OH	sem OH
extremidade 3'	modificação final	sem OH
5) extremidade 5'	sem OH	modificação final
extremidade 3'	sem OH	sem OH
6) extremidade 5'	sem OH	modificação final

extremidade 3'	modificação final	sem OH
7) extremidade 5'	sem OH	modificação final
extremidade 3'	sem OH	modificação final
8) extremidade 5'	sem OH	modificação final
extremidade 3'	modificação final	modificação final

As várias modificações finais aqui divulgadas estão preferivelmente localizadas na fração de ribose de um nucleotídeo do ácido nucléico de acordo com a presente invenção. Mais particularmente, a modificação final pode ser anexada em qualquer um dos grupos OH da fração de ribose, incluindo, mas sem limitações, a posição 2'OH, 3'OH e 5'OH, ou substituí-los, contanto que o nucleotídeo assim modificado seja um nucleotídeo terminal. Abásicos invertidos são nucleotídeos, tanto desoxiribonucleotídeos quanto ribonucleotídeos que não têm uma fração de nucleobase. Este tipo de composto é descrito, entre outros, em Sternberger, M., Schmiedeknecht, A., Kretschmer, A., Gebhardt, F., Leenders, F., Czauderna, F., Von Carlowitz, I., Engle, M., Giese, K., Beigelman, L. & Klippel, A. (2002). Antisense Nucleic Acid Drug Dev, 12, 131-43.

Qualquer uma das supramencionadas modificações finais pode ser usada em conjunto com as várias modalidades de RNAi representadas na Tabela 1. Percebe-se, usualmente, que as modificações finais 5' supramencionadas são presentes somente na fita sentido da molécula de RNAsi.

Modificações adicionais podem estar relacionadas à

fração de nucleobase, à fração de açúcar ou à fração de fosfato do nucleotídeo individual.

Tal modificação da fração de nucleobase pode ser de maneira tal que os derivados de adenina, guanina, citosina e timidina e uracila, respectivamente, sejam modificados. Nucleobases modificados particularmente preferidos são selecionados do grupo que compreende inosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metila, 2-propila e outras alquila-deninas, 5-halo uracila, 5-halocitosina, 5-halo citosina, 6-azacitosina, 6-aza timina, pseudo-uracila, 4-tiouracila, 8-halo adenina, 8-aminoadenina, 8-tiol adenina, 8-tioalquil adeninas, 8-hidroxil adenina e outras adeninas 8-substituídas, 8-halo guaninas, 8-amino guanina, 8-tiol guanina, 8-tioalquil guanina, 8-hidroxilguanina e outras guaninas substituídas, outras aza- e deaza adeninas, outras aza- e deaza guaninas, 5-trifluormetil uracila e 5-trifluor citosina.

Em uma outra modalidade preferida, a fração de açúcar do nucleotídeo é modificada, em que tal modificação está, preferivelmente, na posição 2' das frações de ribose e de desoxiribose, respectivamente, do nucleotídeo. Mais preferivelmente, o grupo 2'OH é substituído por um grupo ou fração selecionados do grupo que compreendendo amina, flúor, alcóxi e alquila. Preferivelmente, alcóxi é tanto metóxi quanto etóxi. Também preferivelmente, alquila significa metila, etila, propila, isobutila, butila e isobutila. É ainda mais preferível que, independente do tipo de modificação, o nucleotídeo seja, preferivelmente, um ribonucleotídeo.

Preferivelmente, a modificação da fração de fosfa-

to é selecionada do grupo que compreende fosfotioatos.

Versados na técnica percebem que o ácido nucléico da presente invenção que consiste de uma multiplicidade de nucleotídeos pode ser assim formado por nucleotídeos que são
5 ligados por meio de uma ligação fosfodiéster ou por meio de uma ligação fosfotioato, ou uma combinação de ambos ao longo do comprimento da sequência de nucleotídeo das fita e trecho individuais, respectivamente.

Uma forma adicional de nucleotídeos usados pode
10 ser, realmente, NAsi que é descrita, entre outros, no pedido de patente internacional WO 03/070918.

Os nucleotídeos que formam o primeiro trecho e a primeira fita, respectivamente, do ácido nucléico de acordo com a presente invenção podem compreender um ou mais nucleotídeos modificados, em que o nucleotídeo modificado individual tem uma modificação que é preferivelmente uma modificação aqui divulgada. Além da modificação em particular, a modificação pode ser ou compreender alguma espécie de rótulo, em que o rótulo é selecionado do grupo de rótulos quimioluminescentes, rótulos fluorescentes e rótulos radioativos.
15 Estes tipos de rótulos são conhecidos pelos versados na técnica e são descritos, por exemplo, em Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland, 1998. O ácido nucléico assim rotulado
20 de acordo com a presente invenção também pode ser usado com propósitos de diagnóstico ou para monitorar o sítio de ação, bem como para a preparação de qualquer tratamento, preferivelmente, relacionados a qualquer uma das doenças aqui di-

vulgadas.

Em uma modalidade preferida, o ácido nucléico de acordo com a presente invenção é modificado de maneira tal que os nucleotídeos pirimidina no trecho ou fita sentido sejam nucleotídeos pirimidina 2'-O-metila e, tanto adicional-
5 mente quanto alternativamente, os nucleotídeos purina no trecho ou fita sentido são nucleotídeos 2'-desoxipurina. Em uma modalidade adicional, os nucleotídeos pirimidina presentes no trecho sentido ou fita sentido são nucleotídeos pirimidina 2'-desoxi-2'-flúor.
10

Em uma modalidade alternativa, a modificação não é baseada na química do nucleotídeo, isto é, a modificação depende se o nucleotídeo a ser modificado é tanto um nucleotídeo purina quanto um nucleotídeo pirimidina, mas é predominantemente baseado no arranjo espacial do nucleotídeo individual na estrutura geral de fita dupla do desenho básico do ácido nucléico de acordo com a presente invenção.
15

Mais particularmente, tanto a primeira fita e o primeiro trecho, respectivamente, quanto a segunda fita e o segundo trecho, respectivamente, mostram um padrão espacial de modificação do nucleotídeos que forma os ditos trechos e fitas, respectivamente.
20

Focalizando no primeiro trecho, há um padrão de grupos de nucleotídeos modificados e grupos de nucleotídeos não modificados. Estes grupos de nucleotídeos não modificados também são aqui chamados de grupos de flanqueamento de nucleotídeos. Mais preferivelmente, o padrão consiste de grupos de nucleotídeos modificados e nucleotídeos não modi-
25

ficados. Ainda mais preferivelmente, o padrão é um padrão regular e, ainda mais preferivelmente, um padrão alternado ao longo do comprimento do primeiro trecho do ácido nucléico de acordo com a presente invenção. O grupo de nucleotídeos
5 modificados pode consistir tanto em um quanto em diversos nucleotídeos que são modificados e que são, preferivelmente, nucleotídeos que são modificados na posição 2', isto é, com uma modificação na fração de açúcar. Mais preferivelmente, esta modificação é uma modificação 2'-O-Me.

10 O grupo de nucleotídeos não modificados pode consistir tanto em um quanto vários nucleotídeos que são tanto não modificados, por meio do que os nucleotídeos não modificados são preferivelmente ribonucleotídeos, quanto os nucleotídeos não modificados são nucleotídeos tendo uma modificação,
15 ção, por meio do que tal modificação é diferente da modificação apresentada pelos nucleotídeos que formam o grupo de nucleotídeos modificados. Ainda mais preferivelmente, os nucleotídeos não modificados são ribonucleotídeos. Pode-se notar que o termo não modificado e nucleotídeo não modificado
20 são utilizados indiferentemente, se não indicado o contrário. O primeiro trecho do ácido nucléico de acordo com a presente invenção pode tanto começar com um grupo de nucleotídeos modificados quanto começar com um grupo de nucleotídeos não modificados da maneira aqui definida. Entretanto, é
25 preferível que o primeiro trecho comece com um grupo de nucleotídeos modificados. Acima de tudo preferivelmente, o grupo de nucleotídeos modificados consiste de um único nucleotídeo. Com relação a esta modalidade, o primeiro trecho

é preferivelmente uma orientação anti-sentido ao ácido nucléico codificado para RTP801. Está também de acordo com a presente invenção que a modificação apresentada pelos nucleotídeos que formam o grupo de nucleotídeos modificados seja a mesma para todos os grupos de nucleotídeos modificados presentes no primeiro trecho. Entretanto, está também de acordo com a presente invenção que algum grupo de nucleotídeos modificados tenha uma modificação diferente de um ou vários grupos de nucleotídeos modificados presente no primeiro trecho.

Na segunda fita de ácido nucléico de acordo com a presente invenção, um padrão descrito para o primeiro trecho pode ser também realizado. As mesmas características descritas com relação ao primeiro trecho podem igualmente ser realizadas em uma modalidade do segundo trecho, por meio do que é preferível que, com a condição que o segundo trecho seja em orientação sentido relativo à seqüência do ácido nucléico que codifica para RTP801, a segunda fita do ácido nucléico de acordo com a presente invenção comece com um grupo de nucleotídeos não modificados.

O ácido nucléico de acordo com a presente invenção, compreendendo uma estrutura de fita dupla, pode compreender um primeiro trecho tendo o padrão de modificação como aqui descrito. Alternativamente, o ácido nucléico de fita dupla, de acordo com a presente invenção, pode compreender um segundo trecho tendo o padrão de modificação como descrito anteriormente. Entretanto, é acima de tudo preferível que o ácido nucléico de fita dupla, de acordo com a presente in-

venção, consista em um primeiro trecho e um segundo trecho, por meio do que tanto o primeiro trecho quanto o segundo trecho tenham um padrão de modificação espacial como aqui descrito.

5 Está de acordo com a presente invenção que as características do padrão de modificação espacial sejam as mesmas em ambos os trechos, em termos de tamanho dos grupos de nucleotídeos modificados e grupos de nucleotídeos não modificados e o tipo de modificação realmente usada. Preferi-
10 velmente, o padrão espacial de modificação no primeiro trecho é deslocado de maneira tal que um grupo de nucleotídeos modificados no primeiro trecho seja oposto a um grupo de nucleotídeos não modificados no segundo trecho e vice-versa. Entretanto, está também de acordo com a presente invenção
15 que os padrões sejam alinhados exatamente, isto é, que um grupo de nucleotídeos modificados no primeiro trecho fique oposto a um grupo de nucleotídeos não modificados no segundo trecho, e um grupo de nucleotídeos não modificados no primeiro trecho fique oposto a um grupo de nucleotídeos não mo-
20 dificados no segundo trecho. Está ainda de acordo com a presente invenção que o padrão espacial de modificação no primeiro trecho e no segundo trecho seja relativamente deslocado um pelo outro, de forma que apenas uma primeira porção de um grupo de nucleotídeos modificados em um trecho fique o-
25 posto a uma porção de um grupo de nucleotídeos não modificados em outro trecho, ao passo que a segunda porção do grupo de nucleotídeos modificados é oposta a um outro grupo de nucleotídeos modificados. Está de acordo com a presente inven-

ção que a revelação aqui provida no padrão espacial de modificação do(s) trecho(s) do ácido nucléico de acordo com a presente invenção aplica também na(s) fita(s) do ácido nucléico de acordo com a presente invenção. Entretanto, é preferível que os trechos do ácido nucléico compreendam o padrão espacial de modificação e as fitas compreendam tais trechos e uma ou mais saliência(s) aqui reveladas. É particularmente preferível que a saliência seja um grupo fosfato na extremidade 3' tanto na fita anti-sentido quanto na fita sentido, quanto em ambas as fitas, por meio do que é mais preferível que o grupo fosfato esteja na extremidade 3' tanto da fita anti-sentido quanto da fita sentido. Em uma modalidade ainda mais preferível, o grupo fosfato é um grupo fosfato tal como aqui definido.

Está também de acordo com a presente invenção que o ácido nucléico de acordo com a presente invenção possa exibir um ligante que conecta a primeira e a segunda fita. Tal ligante é preferivelmente um polímero. O polímero pode ser qualquer polímero sintético ou natural. Possíveis ligantes sintéticos são, entre outros, PEG ou um polinucleotídeo. Tal ligante é preferivelmente projetado de maneira que permita tanto dobra parcial quanto completa do primeiro trecho sobre o segundo trecho e vice-versa.

Finalmente, está de acordo com a presente invenção que o ácido nucléico de acordo com a presente invenção seja um sintético, um quimicamente sintetizado, um isolado, ou um derivado de qualquer fonte natural tal como, por exemplo, preparado por meio de tecnologia recombinante. Com relação à

preparação de qualquer ácido nucléico, de acordo com a presente invenção, qualquer modificação como aqui revelada pode ser introduzida tanto antes, durante, quanto depois da preparação do respectivo ácido nucléico de acordo com a presente invenção como é de conhecimento dos versados na técnica.

O vetor, de acordo com a presente invenção, compreende um ácido nucléico de acordo com a presente invenção. Adicionalmente, o vetor pode incluir elementos para controlar alvejamento, expressão e transcrição do dito ácido nucléico de uma maneira célula seletiva como é de conhecimento na tecnologia. O plasmídeo pode incluir um promotor para controlar a transcrição do material heterólogo, isto é, o ácido nucléico de acordo com a presente invenção, e pode ser tanto um promotor constitutivo quanto um indutível para permitir a transcrição seletiva. Melhoradores que podem ser exigidos para obter níveis de transcrição necessária podem ser incluídos opcionalmente. Melhoradores são, em geral, qualquer sequência de DNA não traduzida que funciona continuamente com a sequência de codificação, assim em cis, para mudança do nível de transcrição basal ditado pelo promotor. A expressão de tais construções é de conhecimento dos versados na técnica e pode ser feita, por exemplo, pela provisão de uma respectiva construção em tandem ou tendo diferentes promotores transcrevendo para a primeira e segunda fita e primeiro e segundo trecho, respectivamente, do ácido nucléico de acordo com a presente invenção.

Quando o ácido nucléico de acordo com a presente invenção é produzido ou expresso, preferivelmente expresso

in vivo, mais preferivelmente em um paciente que precisa do ácido nucléico de acordo com a presente invenção, tal produção ou expressão preferivelmente usa um vetor de expressão, preferivelmente um vetor de expressão de mamífero. Vetores
5 de expressão são conhecidos na tecnologia e, preferivelmente, compreendem plasmídeos, cosmídeos, sistemas de expressão viral. Sistemas de expressão viral preferidos incluem, mas sem limitações, adenovírus, retrovírus e lentivírus.

Na tecnologia são conhecidos métodos para introduzir os vetores em células ou tecidos. Tal método pode ser
10 encontrado em geral descrito em Sambrook et al., Molecular cloning: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbour Laboratory, New York (1983, 1992), ou em Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley e Sons, Baltimore,
15 re, Maryland, 1998.

Métodos adequados compreendem, entre outros, transfecção, lipofecção, eletroporação e infecção com vetores virais recombinantes. Com relação a presente invenção, um recurso adicional do vetor é, em uma modalidade, um recurso de limitação de expressão, tais como um promotor e elemento regulador, respectivamente, que são específicos para o tipo de célula desejada, permitindo assim a expressão da seqüência do ácido nucléico de acordo com a presente invenção, apenas uma vez que seja provido a base que permite a
20 expressão desejada.
25

Em um aspecto adicional, a presente invenção diz respeito a uma composição farmacêutica compreendendo um ácido nucléico de acordo com a presente invenção e/ou um vetor

de acordo com a presente invenção e, opcionalmente, um carreador, diluente ou adjuvantes ou outro(s) veículo(s) farmacêuticamente aceitável. Preferivelmente, tais carreadores, diluentes, adjuvantes e veículos são inertes, e não tóxicos.

5 A composição farmacêutica é, em suas várias modalidades, adaptada para administração de várias maneiras. Tal administração compreende administração sistêmica e local bem como oral, subcutânea, parenteral, intravenosa, intra-arterial, intramuscular, intraperitonal, intranasal e intratecal.

10 É de conhecimento dos versados na técnica que a quantidade da composição farmacêutica e o respectivo ácido nucléico e vetor, respectivamente, dependem da condição clínica do paciente individual, do sítio e métodos de administração, programa de administração, idade do paciente, sexo, peso corporal e outros fatores conhecidos pelos profissionais médicos. A quantidade farmacêuticamente efetiva com
15 propósitos de prevenção e/ou tratamento é assim determinada por considerações tais como aquelas conhecidas pela tecnologia médica. Preferivelmente, a quantidade é efetiva para alcançar melhorias incluindo, mas sem limitações, melhorar a
20 condição da doença ou proporcionar recuperação, melhorias ou eliminação mais rápida dos sintomas e outros indicadores tais como selecionados como medidas apropriadas pelos versados na técnica médica.

25 Em uma modalidade preferida, a composição farmacêutica de acordo com a presente invenção pode compreender outros compostos farmacêuticamente ativos. Preferivelmente, tais outros compostos farmacêuticamente ativos são selecio-

nados do grupo compreendendo compostos que permitem absorção intracelular, compostos que permitem liberação endossomal, compostos que permitem um maior tempo de circulação e compostos que permitem o alvejamento de células endoteliais ou células patogênicas. Compostos preferidos para liberação en-

5 células patogênicas. Compostos preferidos para liberação endossomal são cloroquina e inibidores de bombas de H⁺ dependentes de ATP.

A composição farmacêutica é preferivelmente formulada de maneira a proporcionar uma administração de dosagem

10 única ou uma administração de dosagens múltiplas.

É de conhecimento que a composição farmacêutica de acordo com a presente invenção pode ser usada para qualquer doença que envolve desenvolvimento ou crescimento indesejado de vasculatura, incluindo angiogênese, bem como qualquer das

15 doenças e condições aqui descritas. Preferivelmente, esses tipos de doenças são doenças tumorais. Entre doenças tumorais, os seguintes tumores são acima de tudo preferidos: câncer endometrial, carcinomas coloretais, gliomas, cânceres endometriais, adenocarcinomas, hiperplasia endometrial, síndrome de Cowden, carcinoma coloretal hereditário sem polipose, síndrome de Li-Fraumene, câncer de mama-ovário, câncer de próstata (Ali, I. U., Journal of the National Cancer Institute, Vol. 92, no. 11, June 07, 2000, page 861 - 863), Bannayan-Zonana syndrome, LDD (Lhermitte-Duklos' syndrome)

20 (Macleod, K., supra) doenças hamartoma-macrocefalia incluindo doença de Cow (CD) e síndrome de Bannayan-Ruvalcaba-Riley (BRR), lesões mucocutâneas (por exemplo, triquilemomas), macrocefalia, retardo mental, hamartomas gastrintestinais, li-

25

pomas, adenomas da tireóide, doença fibrocística da mama, gangliocitoma displásico do cerebelo e malignidades da mama e tireóide (Vazquez, F., Sellers, W. R., supra).

Deve-se saber que quaisquer das doenças tumorais a
5 ser tratadas com a composição farmacêutica de acordo com a
presente invenção é preferivelmente uma doença tumoral de
último estágio. Em uma outra modalidade, a doença tumoral
envolve células que são supressoras tumorais negativas, por
meio do que, mais preferivelmente, o supressor de tumor é
10 PTEN.

A composição farmacêutica de acordo com a presente
invenção pode também ser usada em um método para prevenir
e/ou tratar uma doença aqui revelada, por meio do que o mé-
todo compreende a administração de um ácido nucléico de a-
15 cordo com a presente invenção, um vetor de acordo com a pre-
sente invenção ou uma composição farmacêutica ou medicamento
de acordo com a presente invenção, para quaisquer das doen-
ças aqui descritas.

Em um aspecto adicional, a presente invenção diz
20 respeito a um método para projetar ou classificar um ácido
nucléico que é adequado para infraregular RTP801, mais par-
ticularmente para infraregular a função RTP801. Esse método
compreende o uso de uma seqüência de ácido nucléico como a-
qui revelada e a avaliação de tal ácido nucléico em um en-
25 saio adequado. Tal ensaio é conhecido na tecnologia e, por
exemplo, descrito na parte de exemplo deste pedido. Em uma
etapa adicional, um ácido nucléico de fita dupla é projeta-
do, preferivelmente de acordo com os princípios do projeto

aqui estabelecidos, que é adequado para infraregular RTP801, preferivelmente, com relação a um mecanismo de silenciamento de genes pós-transcricional tal como interferência de RNA. Também o ácido nucléico assim obtido, isto é, projetado ou classificado, é avaliado no respectivo ensaio e o resultado, isto é, o efeito tanto do ácido nucléico de acordo com a presente invenção bem como o ácido nucléico recém projetado ou classificado em tal ensaio é comparado. Preferivelmente, o ácido nucléico projetado ou classificado é mais adequado no caso em que ele é tanto mais estável quanto mais efetivo, preferivelmente ambos. É de conhecimento que o método será particularmente efetivo se qualquer dos ácidos nucléicos de acordo com a presente invenção for usado como um ponto de partida. Está assim de acordo com a presente invenção que as inéditas moléculas de ácido nucléico serão projetadas com base nos princípios aqui revelados, por meio do que a sequência alvo do RNAm RTP801 será ligeiramente deslocada em relação à sequência alvo do RNAm RTP801 para o ácido nucléico correspondente de acordo com a presente invenção. Preferivelmente, o novo ácido nucléico será deslocado pelo menos por um ou mais nucleotídeos, em relação ao trecho do RNAm alvo tanto na direção 5' quanto 3' do RNAm que codifica para RTP801. Entretanto, está de acordo com a presente invenção que o deslocamento ocorre em ambas as direções simultaneamente, que significa que o novo ácido nucléico incorpora o ácido nucléico de acordo com a presente invenção usado como um ponto de partida. Está também de acordo com a presente invenção que o alongamento do ácido nucléico de acordo com a

presente invenção e usado como um ponto de partida tende tanto para a extremidade 3' quanto para a extremidade 5'. No caso de tal tendência, tanto a extremidade 3' quanto a extremidade 5' do novo ácido nucléico é maior, isto é, mais extensa que a outra extremidade. Quando a molécula do novo ácido nucléico é gerada estendendo tanto a extremidade 3' quanto a extremidade 5' da fita anti-sentido e/ou da fita sentido, a seqüência seguinte de etapas é tipicamente aplicada. Se o deslocamento é para a extremidade 5' do RNAm de RTP801, a extremidade 3' da fita anti-sentido tem que ser estendida pelo número de nucleotídeos pelo qual a extremidade 5' do RNAm de RTP801 é deslocada. O(s) nucleotídeo(s) assim a ser adicionado(s) na extremidade 3' da fita anti-sentido do novo ácido nucléico é/são complementar(s) a esses nucleotídeos após a extremidade 5' da seqüência alvo no RNAm de RTP801 usado para a molécula de ácido nucléico de acordo com a presente invenção, usado como um ponto de partida. O mesmo tem que ser feito para a fita sentido. Entretanto, os nucleotídeos a ser adicionados na fita sentido tem que corresponder, isto é, ser complementares aos nucleotídeos recém adicionados na extremidade 3' da fita anti-sentido, que significa que eles tem que ser adicionados na extremidade 5' da fita sentido. A última etapa na fita sentido, entretanto, tem que ser feita apenas até o ponto em que, fora da fita anti-sentido, também a fita sentido deve ser deslocada, que é o caso em modalidades preferidas da presente invenção. Embora esse deslocamento possa ser feito até um ponto definido pelos versados na técnica, mais preferivelmente o desloca-

mento deve ser feito de maneira tal que também o novo ácido nucléico ainda contenha um trecho de pelo menos 14 nucleotídeos, preferivelmente 14 nucleotídeos contíguos exibidos por qualquer das moléculas de ácido nucléico aqui reveladas.

5 A síntese de qualquer dos ácidos nucléicos aqui descritos está de acordo com os versados na técnica. Tal síntese está, entre outras, descrita em Beaucage S.L. e Iyer R.P., *Tetrahedron* 1992; 48: 2223-2311, Beaucage S.L. e Iyer R.P., *Tetrahedron* 1993; 49: 6123-6194 e Caruthers M.H. et. al., *Methods Enzymol.* 1987; 154: 287-313, a síntese de tioa-
10 to está, entre outras, descrita em Eckstein F., *Aims. Rev. Biochem.* 1985; 54: 367-402, a síntese de moléculas de RNA está descrita em Sproat B., em *Humana Press* 2005 editado por Herdewijn P.; Kap. 2: 17-31 e respectivos processos à jusan-
15 te estão, entre outros, descritos em Pingoud A. et. al., em *IRL Press* 1989 editado por Oliver R.W.UM.; Kap. 7: 183-208 e Sproat B., em *Human Press* 2005 editado por Herdewijn P.; Kap. 2: 17-31 (supra).

 RNAsi para RTP801 pode ser feito usando métodos
20 conhecidos na tecnologia descrita anteriormente, com base na seqüência conhecida de RTP801 (SEQ ID NO:I), e pode se tornar estável por várias modificações descritas anteriormente. Para informação mais detalhada, ver exemplo 9.

 Adicionalmente, com relação aos métodos da presen-
25 te invenção aqui descritos, moléculas adicionais de RNA podem ser usadas com os ditos métodos, por exemplo, moléculas de RNA inibitórias da presente invenção incluem oligoribonucleotídeos de fita simples, preferivelmente compreendendo

trechos de pelo menos 7-10 nucleotídeos consecutivos presentes nas seqüências detalhadas nas Tabelas A-D, os ditos oligoribonucleotídeos sendo capazes de formar [e/ou compreender] regiões de fita dupla, em particular conformações que
5 são reconhecidas por complexos intracelulares, levando à degradação dos ditos oligoribonucleotídeos em moléculas de RNA menores que são capazes de exercer inibição de seus genes endógenos correspondentes, e moléculas de DNA codificando tais moléculas de RNA. O gene endógeno correspondente é preferivelmente o gene 801 e pode ser adicionalmente o gene VEGF e/ou o gene VEGF-R1. A invenção também fornece uma composição compreendendo o referido oligoribonucleotídeo de fita simples em um carreador, preferivelmente um carreador farmacêuticamente aceitável.

15 Adicionalmente, a presente invenção permite terapia de combinação para todas as condições aqui reveladas e, em particular, condições envolvendo neovascularização coroidal. Na dita terapia de combinação, tanto o gene RTP801 quanto VEGFR são inibidos a fim de aliviar os sintomas da
20 doença que está sendo tratada. Esses genes podem ser inibidos com uma combinação de um ou mais RNAsi ou anticorpos ou aptâmeros. Portanto, a presente invenção também fornece uma composição farmacêutica inédita compreendendo um inibidor RTP801 e um inibidor VEGF ou VEGFR-1, o inibidor RTP801 sendo
25 preferivelmente um RNAsi, mais preferivelmente uma molécula de RNAsi detalhada nas tabelas A-D e, em particular, RNAsi Nos: 14, 22, 23, 25, 27, 39, 41, 42, 49 e 50 da Tabela A ou RNAsi Nos: 257, 260-262, e 264-268 da tabela D, e o i-

nibidor VEGF/ VEGFR-1 sendo opcionalmente um anticorpo ou aptâmero. O uso combinado dos ditos compostos (isto é, RNAsi de RTP801 e anticorpo VEGF ou qualquer outro exemplo combinado aqui revelado) na preparação de um medicamento é também
5 parte da presente invenção.

Assim, RNAsi de RTP801 tal como uma molécula de RNAsi detalhada nas tabelas A-D e, em particular, RNAsi Nos: 14, 22, 23, 25, 27, 39, 41, 42, 49 e 50 da tabela A ou RNAsi Nos: 257, 260-262, e 264-268 da tabela D pode ser adminis-
10 trada em conjunto com agentes que alvejam VEGF ou receptor 1 de VEGF (VEGFR1). Tais agentes atualmente existem no mercado ou em vários estágios de aprovação e funcionam por diferentes mecanismos. Anticorpos e fragmentos de anticorpos tal como ranibizumab (Lucentis, Genentech) anexo ao VEGF libera-
15 do para inibição da ligação de VEGF aos receptores ativos. Um aptâmero que pode agir como um ligante/anticorpo (Macugen, Eyetech/Pfizer, aprovado recentemente pelo FDA para AMD úmida) é também possível. Macugen se liga com VEGF extracelular para bloquear sua atividade. Esses medicamentos são
20 administrados localmente por injeção intravítrea. Compostos baseados no RNAsi anti-VEGF (tal como inibidor Cand5 de VEGF da Acuity ou inibidor 027 de VEGFR-1 da RNAsi) são também disponíveis. Adicionalmente, a pequena molécula de aminosterol Squalamine (Genaera) que é administrada sistemicamente
25 interfere reportadamente em múltiplas facetas do processo angiogênico, incluindo inibição de VEGF e outros fatores de crescimento que sinalizam em células endoteliais.

A administração conjunta de um inibidor RTP801,

preferivelmente um RNAsi, e qualquer dos agentes inibidores VEGF/VEGFR-1 anteriores pode ter um efeito sinérgico, por meio do que o dito tratamento combinado é mais efetivo que o tratamento por qualquer dessas composições individuais, independente da dosagem na opção de terapia única. Esse efeito sinérgico é também suportado por resultados preliminares como detalhado no exemplo 6.

RTP801 tem um mecanismo diferente de ação e é potencialmente sinérgico com inibidores VEGF-VEGFR. Um estudo em Camundongos KO RTP801 indica que o fenótipo protetor em Camundongos KO persiste, a despeito do fato de que a expressão de RNAm VEGF no olho é tão alta quanto em Camundongos WT. Nossos dados preliminares adicionais indicam que inibição do RTP801 pode ser sinérgica com a inibição do eixo regulador do VEGF-VEGFR no tratamento de patologia retinal. Os inventores da presente invenção observaram em experimentos apropriados que administração de RNAsi contra RTP801 em modelo de AMD (ver exemplo 6 a seguir) leva não apenas à infra-regulagem do próprio RTP801, mas também como uma consequência, à supra-regulagem do fator PEDF antiogênico e neuroprotetor, bem como a infra-regulagem de expressão de MCP1, uma proteína quimioatraente de macrófago. Assim, a inibição de RTP801 simultaneamente confere efeitos antiogênicos, neuroprotetores e antiinflamatórios.

Como aqui revelado, aptâmeros podem ser usados também na presente invenção em combinação com o RNAsi inédito aqui revelado. Por exemplo, um aptâmero pode ser usado com qualquer um dos RNAsi aqui revelados em terapia de com-

binação para o tratamento de qualquer uma das condições aqui reveladas. A composição farmacêutica inédita empregada para uma terapia de combinação como esta, que é também parte da presente invenção, pode compreender um RNAsi da presente invenção covalentemente ou não covalentemente anexado a um aptâmero. Aptâmeros são ácidos oligonucleicos de RNA ou DNA de fita simples ou fita dupla que se ligam a uma proteína alvo e geralmente não apresentam efeitos não específicos. Aptâmeros podem ser modificados para estabilidade ou outra qualidade desejada de acordo com qualquer modificação de ácido nucleico aqui revelada, e/ou conhecida pelos versados na técnica. Modificações nos aptâmeros podem ser introduzidas em qualquer local na molécula, tais como os terminais 5' ou 3', ou em qualquer sítio de modificação definido internamente. Por exemplo, aptâmeros de RNA podem ser estabilizados com pirimidinas modificadas 2'-Fluor ou 2'-amino. Aptâmeros podem também ser ligados nas moléculas reportadoras ou compostos químicos ligantes e podem ser anexados à contas ou outro suporte sólido se necessário (por exemplo, grupos de 5' ou 3' amino, tiol éster ou biotina). Tioaptâmeros são aptâmeros que contêm modificação de enxofre em sítios específicos de internucleosídeo fosforila, e podem possuir uma melhor estabilidade, resistência à nuclease, afinidade e/ou seletividade ao alvo. Exemplos de tioaptâmeros incluem oligodeóxi tioaptâmeros de fosforomonotioato (S-ODN) e fosforditioato (S2-ODN). Para informação mais detalhada a respeito de aptâmeros e tioaptâmeros ver patentes U.S. 5.218.088 e 6.423.493.

Deve-se entender que, no contexto da presente invenção, qualquer das moléculas de RNAsi aqui reveladas, ou quaisquer moléculas de RNA de fita dupla compridas (tipicamente 25-500 nucleotídeos de comprimento) que são processadas por complexos celulares endógenos (tal como DICER - ver anteriormente) para formar as moléculas de RNAsi aqui reveladas, ou moléculas que compreendem as moléculas de RNAsi aqui reveladas, podem ser empregadas no tratamento das doenças ou desordens aqui descritas.

Desordens adicionais que podem ser tratadas pelas moléculas e composições da presente invenção incluem todos os tipos de neovascularização coroidal (CNV), que ocorrem não apenas em AMD úmida, mas também em outras patologias oculares, tais como síndrome da histoplasiose ocular, estrias angioides, rupturas na membrana de Bruch, degeneração miópe, tumores oculares e algumas doenças degenerativas da retina.

Um aspecto adicional da presente invenção fornece métodos de tratamento de doença relacionada à apoptose. São fornecidos métodos para terapia de doenças ou desordens associadas ao crescimento celular patológico descontrolado, por exemplo, câncer, psoríase, doenças auto-imunes, inter alia, e métodos para terapia de doenças associadas com isquemia e falta de fluxo sanguíneo adequado, por exemplo, infarto do miocárdio (MI) e acidente vascular cerebral. "Câncer" ou "Tumor" referem-se a uma massa de células anormais de crescimento descontrolado. Esses termos incluem tanto tumores primários, que podem ser benignos ou malignos, quanto

tumores secundários, ou metástases que espalham para outros sítios no corpo. Exemplos de doenças tipo câncer incluem, inter alia: carcinoma (por exemplo: mama, cólon e pulmão), leucemia tal como leucemia de célula B, linfoma tal como
5 linfoma de célula B, blastoma tal como neuroblastoma e melanoma.

A invenção também fornece uma composição compreendendo um ou mais dos compostos da invenção em um carreador, preferivelmente um carreador farmacologicamente aceitável.
10 Essa composição pode compreender uma mistura de dois ou mais RNAsi para diferentes genes ou diferentes RNAsi para o mesmo gene. Uma composição compreendendo RNAsi para o gene RTP801 e RNAsi para o gene VEGF e/ou o gene VEGF-R1 é considerada.

Um outro composto da invenção compreende o composto anterior da invenção (estrutura A) ligado covalentemente ou não covalentemente a um ou mais compostos da invenção (estrutura A). Esse composto pode ser distribuído em um carreador, preferivelmente um carreador farmacologicamente aceitável, e pode ser processado intracelularmente por complexos
15 celulares endógenos para produzir um ou mais RNAsi da invenção. Um outro composto da invenção compreende o composto anterior da invenção (estrutura A) ligado covalentemente ou não covalentemente a um RNAsi para outro gene, especialmente o gene VEGF e/ou o gene VEGF-R1.

25 Essa invenção também compreende uma entidade química inédita que é um inibidor de RTP801, preferencialmente RNAsi, quimicamente ligado, covalentemente ou não covalentemente, a qualquer dos agentes inibidores VEGF /VEGFR-1 ante-

riores. Uma entidade química particular considerada é um inibidor de RNAsi de RTP801 ligado covalentemente a um anticorpo VEGF ou receptor-1 de VEGF. Uma entidade química adicional considerada é um aptâmero de DNA modificado ou não modificado, que alveja o receptor-1 de VEGF ligado covalentemente a um RNAsi de RTP801 aqui revelado. Sem ficar preso à teoria, a porção do aptâmero de uma composição farmacêutica como esta ligaria o receptor-1 VEGF e internalizaria na célula, mediante o que a porção da molécula de RNAsi inibiria a expressão de RTP801 na célula. Tal composição farmacêutica assim teria o benefício de uma melhor seletividade e alveijamento, bem como o benefício adicional da terapia de combinação como aqui revelada. Métodos de produção de tais entidades químicas inéditas são conhecidos pelos versados na técnica.

Essa invenção também compreende uma estrutura fita dupla em tandem que compreende duas ou mais seqüências de RNAsi, que é processado intracelularmente para formar dois ou mais diferentes RNAsi, um inibindo 801 e um segundo inibindo VEGF/VEGFR-1. Em um aspecto relacionado, essa invenção também compreende uma estrutura fita dupla em tandem que compreende duas ou mais seqüências de RNAsi, que é degradado intracelularmente para formar dois ou mais RNAsi diferentes, ambos inibindo 801.

Em particular, considera-se que um oligonucleotídeo comprido (tipicamente cerca de 80-500 nucleotídeos de comprimento) compreendendo uma ou mais estruturas de haste e alça, onde regiões da haste compreendem as seqüências dos

oligonucleotídeos da invenção, pode ser distribuído em um carreador, preferivelmente um carreador farmacêuticamente aceitável, e pode ser processado intracelularmente por complexos celulares endógenos (por exemplo por DROSHA e DICER 5 descritos anteriormente) para produzir um ou mais oligonucleotídeos (RNAsi) de fita dupla menores, que são oligonucleotídeos da invenção. Esse oligonucleotídeo pode ser denominado uma construção de RNash em tandem. Considera-se que esse oligonucleotídeo comprido é um oligonucleotídeo de fita 10 simples compreendendo uma ou mais estruturas de haste e alça, em que cada região de haste compreende uma sequência sentido e uma anti-sentido correspondente de RNAsi de um gene 801. Em particular, considera-se que esse oligonucleotídeo compreende sequências sentido e anti-sentido de RNAsi 15 representadas em qualquer uma das tabelas de A a D. Alternativamente, a construção de RNash em tandem pode compreender uma sequência sentido e anti-sentido correspondente de RNAsi de um gene 801, e adicionalmente uma sequência sentido e anti-sentido correspondente de RNAsi de um gene diferente tais 20 como VEGF ou VEGF-R1.

Como aqui mencionado, RNAsi contra RTP801 pode ser o principal componente ativo em uma composição farmacêutica, ou pode ser um componente ativo de uma composição farmacêutica contendo dois ou mais RNAsi (ou moléculas que codificam 25 ou produzem endogenamente dois ou mais RNAsi, seja ela uma mistura de moléculas ou uma ou mais moléculas em tandem que codificam dois ou mais RNAsi), a dita composição farmacêutica adicionalmente sendo compreendida de uma ou mais moléculas

las de RNAsi adicionais que alvejam um ou mais genes adicionais. Inibição simultânea de RTP801 e o(s) dito(s) gene(s) adicional(s) provavelmente terá(ão) um efeito aditivo ou sinérgico para o tratamento das doenças aqui reveladas, de acordo com o seguinte:

Insuficiência Renal Aguda (IRA) e outras desordens microvasculares, bem como desordens de audição e úlcera de pressão: a composição farmacêutica para o tratamento de IRA pode ser compreendida nas seguintes combinações compostas:

10 1) Dímeros de RNAsi de RTP801 e RNAsi p53; 2) Dímeros de RTP801 e RNAsi Fas; 3) Dímeros de RTP801 e RNAsi Bax; 4) Dímeros de RTP801 e RNAsi Fas; 5) Dímeros de RTP801 e RNAsi Bax; 6) Dímeros de RTP801 e RNAsi Noxa; 7) Dímeros de RTP801 e RNAsi Puma; 8) Dímeros de RTP801 (REDD1) e RTP801L (REDD2) RNAsi; 9) RNAsi de RTP801, RNAsi Fas e qualquer dos RTP801L RNAsi RNAsi p53, RNAsi Bax, RNAsi Noxa ou RNAsi Puma para formar trímeros ou polímeros (isto é, moléculas em tandem que codificam três ou mais RNAsi).

Adicionalmente, composições farmacêuticas adicionais para terapias de combinação para IRA, desordens de audição, úlcera de pressão e qualquer outra doença ou condição aqui revelada, podem compreender dois RNAsi, em que o primeiro RNAsi é um RNAsi de RTP801, preferivelmente selecionado das tabelas A-D, e o segundo RNAsi que pode ser ligado covalentemente ou não covalentemente no primeiro RNAsi ou misturado com o primeiro RNAsi, é um RNAsi que alveja um gene selecionado do seguinte grupo: proteína de ligação da proteína de tumor p53, 2 (TP53BP2); repetição rica em leuci-

na e contendo domínio de morte (LRDD); citocromo b-245, polipeptídeo alfa (CYBA); fator 3 de ativação de transcrição (ATF3); caspase 2, cisteína peptidase relacionada a apoptose (célula precursora neural expressa, desenvolvimentalmente

5 infraregulada 2) (CASP2); NADPH oxidase 3 (NOX3); harakiri, proteína de interação BCL2 (HRK); componente do complemento 1, proteína de ligação do subcomponente q (CIQBP); proteína de interação 3 19kDa de BCL2/adenovírus E1B (BNIP3); proteína quinase 8 ativada por mitógeno (MAPK8); proteína quinase

10 14 ativada por mitógeno (MAPK14); substrato 1 de toxina botulínica C3 relacionado ao ras (família rho, proteína de ligação Rac 1 da GTP pequena); glicogênio sintase quinase 3 beta (GSK3B); receptor purinérgico P2X, canal iônico controlado pelo ligante, 7 (P2RX7); canal catiônico de potencial

15 receptor transiente, subfamília M, membro 2 (TRPM2); poli(ADP-ribose) glicoidrolase (PARG); molécula CD38 (CD38); membro 4 da família STEAP (STEAP4); proteína morfogenética óssea 2 - BMP2; proteína da junção da folga, alfa 1, 43kDa (conexina 43) (GJA1); proteína de ligação da proteína tirosina quinase TYRO (TYROBP); fator de crescimento do tecido

20 conectivo (CTGF); fosfoproteína 1 secretada (osteopontina, sialoproteína óssea 1, ativação de linfócito T inicial 1) (SPPL1); receptor de reticulon 4 (RTN4R); anexina A2 (ANXA2); gene homólogo da família ras, membro A (RHOA); oxidase dupla

25 1 (DUOX1); carreador de soluto da família 5 (co-transportador de sódio/glicose), membro 1 (SLC5A1); carreador de soluto da família 2 (transportador facilitador de glicose), membro 2 (SLC2A2); família 1 aldo-ceto redutase,

membro B1 (aldose redutase) (AKR1B1); sorbitol deidrogenase (SORD); carreador de soluto da família 2 (transportador facilitador de glicose), membro 1 (SLC2A1); e membrana metalo-endopeptidase (endopeptidase neutra, encefalinase) (MME).

5 Degeneração macular (MD), retinopatia diabética (DR), lesão da medula espinhal: composições farmacêuticas para o tratamento de MD, DR e lesão da medula espinhal podem compreender as seguintes combinações compostas: 1) RNAsi de RTP801 combinada com qualquer um dos RNAsi VEGF, RNAsi VEGF-
10 R1, RNAsi VEGF R2, RNAsi PKCbeta, RNAsi MCP1, RNAsi e NOS, RNAsi KLF2, RTP801 L RNAsi (tanto fisicamente misturadas quanto em uma molécula em tandem); 2) RNAsi de RTP801 em combinação com dois ou mais RNAsi da lista anterior (fisicamente misturados ou em uma molécula em tandem que codifica
15 três RNAsi, ou uma combinação destes).

COPD e desordens respiratórias: a composição farmacêutica para tratamento de desordens respiratórias pode compreender as seguintes combinações de compostos: RNAsi de RTP801 combinado com RNAsi contra um ou mais dos seguintes
20 genes: elastase, metaloprotease de matriz, fosfolipase, caspase, esfingomielinase e ceramida sintase.

Adicionalmente, RNAsi de RTP801 ou qualquer molécula de ácido nucléico compreendendo ou codificando RNAsi de RTP801 pode ser ligada (covalentemente ou não covalentemente) a um anticorpo ou aptâmero, a fim de atingir um melhor alvejamento para tratamento das doenças aqui reveladas, de
25 acordo com o seguinte:

ARF: anticorpo anti-Fas (preferivelmente anticor-

pos neutralizantes).

Degeneração macular, retinopatia diabética, lesão da medula espinhal: anticorpo ou aptâmero anti-Fas, anticorpo ou aptâmero anti-MCP1, anticorpo ou aptâmero anti-VEGFR1 e anti-VEGFR2. Os anticorpos devem ser preferivelmente anticorpos neutralizantes.

Quaisquer moléculas tais como, por exemplo, moléculas de DNA anti-sentido que compreendem as seqüências de RNAsi aqui reveladas (com as modificações apropriadas do ácido nucléico), são particularmente desejáveis e podem ser usadas com a mesma capacidade de seus RNAsi correspondentes para todas as utilizações e métodos aqui revelados.

A invenção também compreende um método para tratar um paciente sofrendo de uma desordem tais como as desordens aqui descritas, compreendendo administrar ao paciente a composição anterior ou composto de dose terapeuticamente efetiva, de maneira assim a tratar o paciente.

O termo "anti-sentido" (AS) ou "fragmento anti-sentido" significa um fragmento de polinucleotídeo (compreendendo tanto desoxiribonucleotídeos, ribonucleotídeos quanto uma mistura de ambos) tendo atividade inibitória anti-sentido, a dita atividade causando uma diminuição na expressão da cópia genômica endógena do gene correspondente (nesse caso RTP801). Um polinucleotídeo RTP801 AS é um polinucleotídeo que compreende nucleotídeos consecutivos, tendo uma seqüência de comprimento e homologia suficientes para uma seqüência presente dentro da seqüência do gene RTP801 apresentada em SEQ ID NO:1 para permitir hibridização do AS para

o gene. A sequência do AS é projetada para complementar um RNAm alvo de interesse e formar um RNA:AS duplex. Essa formação duplex pode impedir o processamento, união, transporte ou tradução do relevante RNAm. Além disso, certas sequências de nucleotídeo AS podem elicitar atividade celular de RNase H quando hibridizado com seus alvos RNAm, resultando na degradação de RNAm (Calabretta et al, 1996: Antisense strategies in the treatment of leukemias. *Semin Oncol.* 23(1):78-87). Neste caso, RNase H clivará o componente RNA do duplex e pode liberar potencialmente o AS para hibridizar ainda mais com moléculas adicionais do RNA alvo. Um modo de ação adicional resulta da interação de AS com DNA genômico para formar uma tripla hélice que pode ser inativada transcricionalmente. Fragmentos particulares AS são o AS do DNA que codifica os fragmentos particulares de RTP801 aqui descritos.

Muitas revisões cobriram os principais aspectos da tecnologia anti-sentido (AS) e de seu potencial terapêutico (Wright & Anazodo, 1995. Antisense Molecules and Their Potential For the Treatment of Cancer and AIDS. *Cancer J.* 8:185-189.). Existem revisões nos aspectos químico (Crooke, 1995. Progress in antisense therapeutics, *Hematol. Pathol.* 2:59; Uhlmann e Peyman, 1990. Antisense Oligonucleotides: A New Therapeutic Principle. *Chem Rev* 90(4):543-584.), celular (Wagner, 1994. Gene inhibition using antisense oligodeoxynucleotides. *Nature* 372:333.) e terapêutico (Hanania, et al 1995. Recent advances in the application of gene therapy to human disease. *Am. J. Med.* 99:537.; Scanlon et al., 1995. Oligonucleotides-mediated modulation of mammalian gene ex-

pression. FASEB J. 9:1288.; Gewirtz, 1993. Oligodeoxynucleotide-based therapeutics for human leukemias. Stem Cells Dayt. 11:96.) dessa tecnologia.

Intervenção anti-sentido na expressão de genes específicos pode ser alcançada pelo uso de seqüências de oligonucleotídeo AS sintéticas (ver Lefebvre-d'Hellencourt et al, 1995. Immunomodulation by cytokine antisense oligonucleotides. Eur. Cytokine Netw. 6:7.; Agrawal, 1996. Antisense oligonucleotides: towards clinical trials, TIBTECH, 14:376.; Lev-Lehman et al., 1997. Antisense Oligomers in vitro and in vivo. In Antisense Therapeutics, A. Cohen and S. Smicek, eds (Plenum Press, New York)). Seqüências de oligonucleotídeo AS são projetadas para complementar um RNAm alvo de interesse e formar um RNA: AS duplex. Essa formação duplex pode impedir o processamento, união, transporte ou tradução do relevante RNAm. Além disso, certas seqüências de nucleotídeo AS podem elicitar atividade celular de RNase H quando hibridizadas com seus RNAm alvos, resultando em uma degradação de RNAm (Calabretta, et al, 1996. Antisense strategies in the treatment of leukemias. Semin. Oncol. 23:78.). Neste caso, RNase H clivará o componente RNA do duplex e pode liberar potencialmente o AS para hibridizar ainda mais com moléculas adicionais do RNA alvo. Um modo de ação adicional resulta da interação de AS com DNA genômico para formar uma tripla hélice que pode ser inativada transcricionalmente.

O segmento alvo da seqüência para o oligonucleotídeo anti-sentido é selecionado de maneira tal que a seqüên-

cia exiba características relacionadas a energia adequadas importantes para formação de oligonucleotídeo duplex com seus gabaritos complementares, e mostre um potencial baixo para autodimerização ou autocomplementação (Anazodo et al., 5 1996). Por exemplo, o programa de computador OLIGO (Primer Analysis Software, Versão 3.4) pode ser usado para determinar temperatura de fusão da sequência anti-sentido, propriedades de energia livre e estimar as propriedades potenciais de autoformação de dímeros e autocomplementariedades. O programa permite a determinação de uma estimativa qualitativa 10 desses dois parâmetros (autoformação de dímeros e autocomplementariedades potenciais) e fornece uma indicação de "nenhum potencial" ou "algum potencial" ou "potencial essencialmente completo". Usando esse programa, são geralmente selecionados segmento alvos que tem estimativas de nenhum po- 15 tencial nesses parâmetros. Entretanto, segmentos que tem "algum potencial" podem ser usados em uma das categorias. Um equilíbrio de parâmetros é usado na seleção, como é conhecido na tecnologia. Adicionalmente, os oligonucleotídeos são 20 selecionados também, conforme necessário, de maneira que a substituição análoga não afete substancialmente a função.

Oligonucleotídeos anti-sentido fosforotioato normalmente não mostram toxicidade significativa nas concentrações que são efetivas, e exibem meias vidas farmacodinâmicas 25 suficientes em animais (Agrawal, 1996. Antisense oligonucleotides: towards clinical trials, TIBTECH, 14:376.) e são resistentes à nuclease. Fenótipos de perda de função induzidos por anti-sentido relacionados com desenvolvimento celular

têm sido apresentados para proteína ácida da fibra glial (GFAP), para o estabelecimento da formação de placa tecal em frango (Galileo et al., 1991. J. Cell. Biol., 112:1285.) e para a proteína N-myc, responsável pela manutenção de heterogeneidade celular em culturas neuroectodermas (células epiteliais versus células neuroblásticas, que diferem em suas capacidades de formar colônia, tumorigenicidade e aderência) (Rosolen et al., 1990. Cancer Res. 50:6316.; Whitesell et al., 1991. Episome-generated N-myc antisense RNA restricts the differentiation potential of primitive neuroectodermal cell lines. Mot. Cell. Biol. 11:1360.). A inibição de oligonucleotídeo anti-sentido por fator de crescimento de fibroblasto básico (bFgF), tendo propriedades mitogênicas e angiogênicas, suprime 80% do crescimento em células de glioma (Morrison, 1991. Suppression of fibroblast growth factor expression by antisense oligonucleotides inhibits the growth of transformed human astrocytes. J. Biol. Chem. 266:728.) de uma maneira saturável e específica. Sendo hidrofóbicos, oligonucleotídeos anti-sentido interagem bem com membranas fosfolipídicas (Akhter et al, 1991. Interactions of antisense DNA oligonucleotide analogs with phospholipid membranes (liposomes) Nuc. Res. 19:5551-5559.). Após essas interações com a membrana plasmática celular, elas são ativamente (ou passivamente) transportadas para dentro de células vivas (Luke et al, 1989. Characterization of oligonucleotide transport into living cells. PNAS USA 86:3474.), em um mecanismo saturável previsto envolver receptores específicos (Yakubov et al, 1989. PNAS USA 86:6454.).

Uma "ribozima" é uma molécula de RNA que possui capacidade catalítica de RNA (ver Cech para revisão) e cliva um sítio específico em um RNA alvo.

De acordo com a presente invenção, ribozimas que
5 clivam RNAm de RTP801 podem ser utilizadas como inibidores de RTP801. Isso pode ser necessário em casos onde a terapia anti-sentido é limitada por considerações estequiométricas (Sarver et al., 1990, Gene Regulation and Aids, pp. 305-325). Ribozimas podem então ser usadas para alvejar a se-
10 quência de RTP801. O número de moléculas de RNA que são clivadas por uma ribozima é maior que o número previsto por estequiometria. (Hampei e Tritz, 1989; Uhlenbeck, 1987).

Ribozimas catalizam a clivagem de ligação de fosfodiéster do RNA. Várias famílias estruturais de ribozima
15 foram identificadas incluindo introns de Grupo I, RNase P, ribozima do vírus da hepatite delta, ribozima cabeça de martelo e a ribozima tipo alça originalmente derivadas da fita negativa do RNA satélite do vírus do mosaico do tabaco (s-TRSV) (Sullivan, 1994; patentes U.S. No. 5,225,347, colunas
20 4-5). As duas últimas famílias são derivadas de viróides e virusóides, nas quais acredita-se que a ribozima separe monômeros de oligômeros criados durante a replicação do círculo de rolamento (Symons, 1989 e 1992). Motivos de ribozima cabeça de martelo e tipo alça são mais comumente adaptados
25 para trans-clivagem de RNAm para terapia de gene (Sullivan, 1994). O tipo de ribozima utilizada na presente invenção é selecionado como é conhecido na técnica. Ribozimas tipo alça estão atualmente em ensaio clínico e são o tipo preferível.

Em geral, a ribozima tem 30-100 nucleotídeos de comprimento. Distribuição de ribozimas é similar às de fragmentos AS e/ou moléculas de RNAsi.

Pode-se notar que todos os polinucleotídeos a ser
5 usados na presente invenção podem passar por modificações para ter melhorias nas propriedades terapêuticas. Modificações ou análogos de nucleotídeos podem ser introduzidos para melhorar as propriedades terapêuticas dos polinucleotídeos. Melhores propriedades incluem maior resistência à nuclease
10 e/ou maior capacidade de permear membrana celular. Resistência à nuclease, quando necessária, é provida por qualquer método conhecido na técnica, que não interfira com a atividade biológica do polinucleotídeo AS, RNAsi, DNAsi e/ou ribozima necessária para o método de uso e distribuição (Iyer et
15 al., 1990; Eckstein, 1985; Spitzer e Eckstein, 1988; Woolf et al., 1990; Shaw et al., 1991). Modificações que podem ser feitas nos oligonucleotídeos a fim de melhorar a resistência à nuclease incluem modificar o heteroátomo de fósforo ou oxigênio em cerne do fosfato. Estas incluem preparar fosfonatos, fosforotioatos, fosforoditioatos de metila e oligômeros morfolinos. Em uma modalidade, é provido ter ligação de fosforotioato ligando as quatro a seis bases de nucleotídeos de
20 terminação 3'. Alternativamente, ligações de fosforotioato ligam todas as bases de nucleotídeos. Outras modificações
25 conhecidas na técnica podem ser usadas quando a atividade biológica é retida, mas a estabilidade para nucleases é substancialmente maior.

Todos os análogos ou modificações de um polinu-

cleotídeo podem ser empregados com a presente invenção, desde que os ditos análogos ou modificações não afetem substancialmente a função do polinucleotídeo. Os nucleotídeos podem ser selecionados de bases modificadas de ocorrência natural ou sintética. Bases de ocorrência natural incluem adenina, guanina, citosina, timina e uracila. Bases modificadas de nucleotídeos incluem inosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metila, 2-propila e outras adeninas alquilas, 5-halo uracila, 5-halo citosina, 6-aza citosina e 6-aza timina, psuedo-uracila, 4-tiouracila, 8-halo adenina, 8-aminoadenina, 8-tiol adenina, 8-tiolalquila adeninas, 8-hidroxila adenina e outras 8-substitutas adeninas, 8-halo guaninas, 8-amino guanina, 8-tiol guanina, 8-tioalquila guaninas, 8-hidroxila guanina e outras guaninas substitutas, outras aza e deaza adeninas, outras aza e deaza guaninas, 5-trifluorometila uracila e 5-trifluor citosina.

Além do mais, análogos de polinucleotídeos podem ser preparados em que a estrutura do nucleotídeo é fundamentalmente alterada e estão mais bem adaptados como reagentes terapêuticos ou experimentais. Um exemplo de um nucleotídeo análogo é um ácido nucléico peptídico (PNA) em que o cerne de desoxirribose (ou ribose) fosfato no DNA (ou RNA) é substituído por um cerne de poliamida o qual é similar ao encontrado em peptídeos. Análogos de PNA têm se mostrado resistentes à degradação por enzimas e têm vidas estendidas in vivo e in vitro. Adicionalmente, PNAs têm-se mostrado ligar de maneira mais forte à uma sequência de DNA complementar do que a uma molécula de DNA. Essa observação é atribuída à

falta de repulsão de carga entre a fita de PNA e a fita de DNA. Outras modificações que podem ser feitas nos oligonucleotídeos incluem cernes de polímeros, cernes cíclicos, ou cernes acíclicos.

5 Os polipeptídeos empregados na presente invenção também podem ser modificados, de forma opcional quimicamente modificados, a fim de melhorar suas atividades terapêuticas. "Quimicamente modificado" - quando referindo aos polipeptídeos, significa um polipeptídeo onde pelo menos um de seus
10 resíduos de aminoácidos é modificado tanto por processos naturais, tal como processamento ou outra modificação pós-translacional, quanto por técnicas de modificação química que são bem conhecidas na técnica. Entre as inúmeras modificações conhecidas, exemplos típicos, mas não exclusivos, in-
15 cluem: acetilação, acilação, amidação, ADP-ribosilação, glicosilação, formação de âncora GPI, anexação covalente de um lipídeo ou derivado de lipídeo, metilação, miristilação, peguilação, prenilação, fosforilação, ubiquitinação, ou qualquer processo similar.

20 Possíveis modificações adicionais de polipeptídeo (tais como aqueles resultantes da alteração da seqüência de ácido nucléico) incluem as seguintes:

 "Substituição conservativa" - refere-se à substituição de um aminoácido em uma classe por um aminoácidos da
25 mesma classe, onde uma classe é definida por propriedades fisicoquímicas comuns da cadeia lateral de aminoácidos e substituição de alta frequência em polipeptídeos homólogos encontrados na natureza, determinadas, por exemplo, por uma

matriz Dayhoff de troca de frequência padrão ou matriz BLO-SUM. Seis classes gerais de cadeias laterais aminoácidos de foram categorizadas e incluem: Classe I (Cys); Classe II (Ser, Thr, Pro, Ala, Gly); Classe III (Asn, Asp, Gln, Glu);
 5 Classe IV (His, Arg, Lys); Classe V (Ile, Leu, Val, Met); e Classe VI (Phe, Tyr, Trp). Por exemplo, o uso de Asp em substituição a um outro resíduo de classe III, tais como Asn, Gln, ou Glu, é uma substituição conservativa.

"Substituição não conservativa" - refere-se à
 10 substituição de um aminoácido de uma classe com um aminoácido de outra classe; por exemplo, substituição de um Ala, um resíduo de classe II, com um resíduo de classe III tais como Asp, Asn, Gln, ou Glu.

"Deleção" - é uma troca tanto no nucleotídeo quan-
 15 to na sequência de aminoácidos em que um ou mais nucleotídeos ou resíduos de aminoácidos, respectivamente, estão ausentes.

"Inserção" ou "adição" - é a troca em um nucleotídeo ou sequência de aminoácidos que resultou na adição de um
 20 ou mais nucleotídeos ou resíduos de aminoácidos, respectivamente, comparado com a sequência de ocorrência natural.

"Substituição" - substituição de um ou mais nucleotídeos ou aminoácidos por nucleotídeos ou aminoácidos diferentes, respectivamente. No que diz respeito às sequências
 25 de aminoácidos, a substituição pode ser conservativa ou não conservativa.

Em uma modalidade adicional da presente invenção, polipeptídeo ou polinucleotídeo RTP801 podem ser usados para

diagnosticar ou detectar degeneração macular em um sujeito. Um método de detecção tipicamente compreenderia ensaiar RNAm de RTP801 ou polipeptídeo RTP801 em uma amostra derivada de um sujeito.

5 "Detecção" - refere-se à um método de detecção de uma doença. Esse termo pode referir-se à detecção de uma predisposição a uma doença, ou à detecção da severidade da doença.

 "Homólogo/homologia" utilizado na presente invenção, significa pelo menos cerca de 70%, preferivelmente pelo menos cerca de 75% de homologia, vantajosamente pelo menos cerca de 80% de homologia, mais vantajosamente pelo menos cerca de 90% de homologia, ainda mais vantajosamente pelo menos cerca de 95%, por exemplo, pelo menos cerca de 97%,
10 cerca de 98%, cerca de 99% ou ainda cerca de 100% de homologia. A invenção também compreende que estes polinucleotídeos e polipeptídeos podem ser usados no mesmo modo que polinucleotídeos e polipeptídeos aqui citados ou citados anteriormente.

20 Alternativamente, ou adicionalmente, "homologia", com respeito às seqüências, pode referir-se ao número de posições com resíduos de nucleotídeos ou aminoácidos idênticos dividido pelo número de resíduos de nucleotídeos ou de aminoácidos na menor das duas seqüências, em que o alinhamento das
25 duas seqüências pode ser determinado de acordo com o algoritmo de Wilbur e Lipman ((1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:726); por exemplo, usando o tamanho de uma janela de 20 nucleotídeos, um comprimento de palavra de 4 nucleotídeos, e

uma penalidade de folga de 4, análise e interpretação da sequência de dados assistidos por computador, incluindo alinhamento, pode ser convenientemente realizado usando programas disponíveis comercialmente (por exemplo, IntelligeneticsTM Suite, Intelligenetics Inc., CA). Quando seqüências de RNA são ditas similares, ou têm um grau de identidade ou homologia de seqüência com seqüências de DNA, timidina (T) na seqüência de DNA é considerada igual à uracila (U) na seqüência de RNA. Seqüências de RNA no escopo da invenção podem ser derivadas de seqüências de DNA ou seus complementos, substituindo timidina (T) na seqüência de DNA por uracila (U).

Adicionalmente, ou alternativamente, similaridade ou homologia na seqüência de aminoácidos podem ser determinadas, por exemplo, usando o programa BlastP (Altschul et al., Nucl. Acids Res. 25:3389-3402) e disponível no NCBI. As referências seguintes provêem algoritmos para comparar a identidade ou homologia relativas de resíduos de aminoácidos de dois polipeptídeos e adicionalmente, ou alternativamente, com relação aos precedentes, os preceitos destas referências podem ser usados para determinar percentuais de homologia: Smith et al., (1981) Adv. Appl. Math. 2:482-489; South et al., (1983) Nucl. Acids Res. 11:2205-2220; Devereux et al., (1984) Nucl. Acids Res. 12:387-395; Feng et al., (1987) J. Molec. Evol. 25:351-360; Higgins et al., (1989) CABIOS 5:151-153; e Thompson et al., (1994) Nucl. Acids Res. 22:4673-4680.

"Tendo pelo menos X% de homologia" - com relação a

duas seqüências de aminoácidos ou nucleotídeos, refere-se à porcentagem de resíduos que são idênticos em duas seqüências quando as seqüências estão alinhadas idealmente. Assim, a identidade de 90% da seqüência dos aminoácidos significa que 90% dos aminoácidos em duas ou mais seqüências de polipeptídeos alinhadas idealmente são idênticos.

Uma modalidade adicional da presente invenção relaciona uma composição farmacêutica compreendendo um inibidor de RTP801 com uma quantidade terapeuticamente efetiva como um ingrediente ativo e um carreador farmacêuticamente aceitável. O inibidor pode ser um inibidor biológico, uma molécula orgânica, uma molécula química, etc. A dita composição farmacêutica pode compreender um inibidor de RTP801, que é um polinucleotídeo que compreende nucleotídeos consecutivos, tendo uma seqüência que é uma seqüência anti-sentido à seqüência apresentada na figura 1 (SEQ ID No: 1). Adicionalmente, o inibidor de RTP801 pode ser um vetor compreendendo esses polinucleotídeos. Adicionalmente, o inibidor de RTP801 pode ser um anticorpo monoclonal que liga-se especificamente à um epítopo compreendendo 4-25 aminoácidos apresentados na figura 2 (SEQ ID No:2), ou uma molécula de RNA que alveja o gene RNAm de RTP801 tal como uma molécula de RNAsi (descrita opcionalmente nas tabelas A-D e, em particular, RNAsi Nos: 22, 23, 25, 27, 39, 41, 42, 49 e 50 da tabela A ou RNAsi Nos: 257, 260-262, e 264-268 da tabela D) ou uma ribozima.

Os ingredientes ativos da composição farmacêutica podem incluir oligonucleotídeos que são resistentes à nucle-

ase, necessários para a prática da invenção, ou um fragmento destes que mostrou ter o mesmo efeito alvejado contra a(s) sequência (s) e/ou ribozimas apropriadas. Combinações de ingredientes ativos reveladas na presente invenção podem ser usadas, incluindo combinações de seqüências anti-sentido.

Uma modalidade adicional da presente invenção provê o uso de uma dose terapeuticamente efetiva de um inibidor de RTP801 para a preparação de um medicamento para promover a recuperação em um paciente sofrendo de doença ou lesão da medula espinhal. Em uma modalidade o inibidor é preferivelmente um RNAsi. Em uma outra modalidade o inibidor é preferivelmente a estrutura A aqui descrita.

A invenção foi descrita de uma maneira ilustrativa, e deve-se entender que a terminologia que foi usada está na natureza das palavras da descrição em vez de limitação.

Obviamente, muitas modificações e variações da presente invenção são possíveis à luz dos preceitos expostos. Portanto, deve-se entender que, no escopo das reivindicações anexas, a invenção pode ser praticada de outra maneira do que o especificamente descrito.

Descrição resumida das figuras

A figura 1 detalha a seqüência de codificação do gene RTP801 (SEQ ID NO:1);

A figura 2 detalha a seqüência de aminoácidos do polipeptídeo RTP801 (SEQ ID NO:2);

A figura 3 é um diagrama descrevendo os éxons, CDS, SNPs humanos e a posição de várias moléculas de ácido nucléico que são tanto específicas de humanos quanto especí-

ficas de humanos, camundongos e ratos em paralelo;

As figuras 4A-H representam um painel de resultados de análise Western Blot obtidos aplicando vários ácidos nucleicos de fita dupla de acordo com a presente invenção a
5 uma primeira linha celular humana, por meio do que o experimento foi realizado duas vezes, referidos como experimento 1 e experimento 2, e por meio do que o nível da expressão de p110a e p85 é representado como controle de carregamento e a intensidade (densidade) da fita de RTP801 é uma medida para
10 a atividade inibitória do ácido nucleico de fita dupla particular aplicado;

As figuras 5A-F representam um painel de resultados de análise Western Blot obtidos aplicando vários ácidos nucleicos de fita dupla de acordo com a presente invenção a
15 uma segunda linha celular humana, por meio do que o experimento foi realizado duas vezes, referidos como experimento 1 e experimento 2, e por meio do que o nível da expressão de p110a e p85 é representado como controles de carregamento e a densidade da fita de RTP801 é uma medida para a atividade
20 inibitória do ácido nucleico de fita dupla particular aplicado;

As figuras 6A-C representam um painel de resultados de análise Western Blot obtidos aplicando vários ácidos nucleicos de fita dupla de acordo com a presente invenção a
25 uma primeira linha celular humana em diferentes concentrações, a saber 10 nM (5A), 5 nM (5B) e 1 nM (5C), por meio do que o experimento foi realizado duas vezes, referidos como experimento 1 e experimento 2, e por meio do que o nível da

expressão de p110a e p85 é representado como controles de carregamento e a densidade da fita de RTP801 é uma medida para a atividade inibitória do ácido nucléico de fita dupla particular aplicado;

5 A figura 7 representa um painel de resultados de análise Western Blot obtidos aplicando vários ácidos nucléicos de fita dupla de acordo com a presente invenção a uma linha celular de camundongos, por meio do que o experimento foi realizado duas vezes, referidos como experimento 1 e ex-
10 perimento 2, e por meio do que o nível da expressão de p110a e p85 é representado como controles de carregamento e a densidade da fita de RTP801 é uma medida para a atividade inibitória do ácido nucléico de fita dupla particular aplicado;

15 A figura 8 mostra os resultados de experimentos em um sistema modelo AMD de camundongos;

 A figura 9 mostra os resultados de experimentos adicionais em um sistema modelo AMD de camundongos;

20 A figura 10 mostra os resultados de experimentos em um sistema modelo AMD de primatas não humanos;

20 As figuras 11A-B mostram os resultados de experimentos adicionais em um sistema modelo AMD de primatas não
25 humanos;

 As figuras 12A-B mostram os resultados de mais experimentos adicionais em um sistema modelo AMD de primatas
25 não humanos;

 As figuras 13A-B representam uma análise dos resultados experimentais obtidos em um modelo AMD de primatas não humanos;

A figura 14 representa uma análise adicional de resultados experimentais obtidos em modelos AMD de primatas não humanos.

As figuras 15A-C mostram os resultados de um experimento envolvendo a instilação intratraqueal de um plasmídeo que expressa RTP801 em camundongo;

As figuras 16 A-C mostram os resultados de um modelo de tabagismo de curto prazo (7 dias) em camundongos KO e WT de RTP801;

10 As figuras 17 A-C mostram os resultados de um modelo de tabagismo de curto prazo em camundongos WT instilados com anti-RTP801 ativo (REDD14) e RNAsi controle (REDD8).

A figura 18 mostra os resultados de experimentos com Camundongo KO RTP801 em um Modelo CS a longo prazo;

15 A figura 19 mostra os resultados de experimentos em um sistema modelo ARF de camundongo;

A figura 20 mostra os resultados de experimentos em um sistema modelo de retinopatia diabética de camundongo;

20 A figura 21 mostra os resultados de experimentos adicionais em um sistema modelo de Retinopatia diabética em camundongo;

A figura 22 mostra os resultados de mais experimentos adicionais em um sistema modelo de Retinopatia diabética em camundongo;

25 A figura 23 mostra os resultados dos experimentos de inibição combinada RTP801/VEGF em um sistema modelo CNV em camundongo;

A figura 24 mostra os resultados dos experimentos

adicionais de inibição combinada RTP801 / VEGF em um sistema modelo CNV em camundongo;

A figura 25 mostra os resultados de experimentos estudando o efeito de RNasi de RTP801 no gene de expressão em RPE e retina neural;

As figuras 26 A-B mostram adicional resultado de experimentos estudando o efeito de RNasi de RTP801 na expressão de gene em RPE e retina neural;

A figura 27 mostra os resultados de experimentos demonstrando que RT801NP é tão ativo quanto RTP801;

A figura 28 mostra resultados de eficácia relacionando 801_1 (SEQ ID Nos 430 e 527) e 801_4 (SEQ ID Nos 433 e 530);

A figura 29 mostra resultados de eficácia adicionais relacionando 801_1 (SEQ ID Nos 430 e 527) e 801 4 (SEQ ID Nos 433 e 530);

A figura 30 mostra resultados de eficácia adicionais relacionando 801_1 (SEQ ID Nos 430 e 527) e 801 4 (SEQ ID Nos 433 e 530).

Exemplos

Sem elaboração adicional, acredita-se que os versados na técnica podem, usando a descrição anterior, utilizar a presente invenção na sua máxima abrangência. As modalidades específicas preferidas seguintes, portanto, devem ser interpretadas meramente como ilustrativas, e de qualquer maneira não limitativa.

Protocolos padrões de biologia molecular conhecidos na técnica, não especificamente aqui descritos, são em

geral essencialmente seguidos como em Sambrook et al., Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Springs Harbor Laboratory, New-York (1989, 1992), e em Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley e Sons, Baltimore, Maryland (1988).

Protocolos padrões de síntese orgânica conhecidos na técnica, não especificamente aqui descritos, são em geral essencialmente seguidos como em Organic syntheses: Vold- 79, vários editores, J. Wiley, New York, (1941 - 2003); Gewert et al., Organic sintesis workbook, Wiley-VCH, Weinheim (2000); Smith & March, Advanced Organic Chemistry, Wiley-Interscience; 5th edition (2001).

Métodos padrões de química medicinal conhecidos na técnica, não especificamente aqui descritos, são em geral essencialmente seguidos como na série "Comprehensive Medicinal Chemistry", por vários autores e editores, publicados por Pergamon Press.

Os recursos da presente invenção revelados na especificação, nas reivindicações e/ou nos desenhos podem tanto separadamente quanto em combinação destes, ser material para realizar a invenção nas suas várias formas.

Exemplo 1

Materiais e métodos gerais

Se não indicado ao contrário, os materiais e métodos seguintes foram usados nos exemplos 1-5:

Cultura de célula

A primeira linha celular humana, a saber, células HeLa (American Type Culture Collection) foram cultivadas da

seguinte maneira: células Hela (American Type Culture Collection) foram cultivadas como descrito em Czauderna F et W. (Czauderna, F., Fechtner, M., Aygun, H., Arnold, W., Klippel, A., Giese, K. & Kaufmann, J. (2003). Nucleic Acids Res, 31, 670-82).

A segunda linha celular humana foi uma linha celular queratinocita humana que foi cultivada como da seguinte maneira: queratinocitas humanas foram cultivadas a 37 °C em Meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) contendo FCS 10%.

A linha celular de camundongo foi B16V (American Type Culture Collection) cultivada a 37 °C em Meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) contendo FCS 10%. Condições de cultura foram como descrito em Methods Find Exp Clin Pharmacol. 1997 May; 19(4):231-9:

Nestes casos, as células foram sujeitas à experimentos aqui descritos na densidade de aproximadamente 50.000 células por poço e o ácido nucléico de fita dupla de acordo com a presente invenção foi adicionado a 20 nM, por meio do que o ácido nucléico de fita dupla foi complexado usando 1 µg/mL de lipídeo patenteado.

Indução de condição semelhante à hipóxia

As células foram tratadas com CoCl₂ para induzir uma condição semelhante à hipóxia da seguinte maneira: transfecções de RNAsi foram realizadas em placas de 10-cm (30-50% de confluência) descritas por (Czauderna et al., 2003; Kretschner et al., 2003). Resumidamente, RNAsi foi transfectado por adição de um complexo concentrado 10x pré-

formado de GB e lipídeo em um meio sem soro nas células em meio completo. O volume total de transfecção foi 10 mL. A concentração final de lipídeos foi 1,0 µg/mL; a concentração final de RNAsi foi 20 nM, a menos que de outra forma declarado. Indução de respostas hipóxicas foi realizada por adição de CoCl₂ (100 µM) diretamente no meio de cultura de tecido 24 horas antes da lise.

Preparação de extratos celulares e immuno blotting

A preparação de extratos celulares e análise imuno blot foram realizadas essencialmente como descrito por Klippel et al. (Klippel, A., Escobedo, M.A., Wachowicz, M.S., Apell, G., Brown, T.W., Giedlin, MA., Kavanaugh, .M. & Williams, L.T. (1998). Mol Cell Biol, 18, 5699-711; Klippel, A., Reinhard, C., Kavanaugh, W.M., Apell, G., Escobedo, M.UM. & Williams, L.T. (1996). Mol Cell Biol, 16, 4117-27). Anticorpos policlonais contra RTP801 de comprimento total foram gerados por imunização de coelhos com bactéria produtora de proteína RTP801 recombinante proveniente do vetor de expressão pET19-b (Merck Biosciences GmbH, Schwalbach, Alemanha). Os anticorpos monoclonais murina anti-pl10a e anti-p85 foram descritos por Klippel et M. (supra).

Exemplo 2

Redução na expressão de RTP801 em um primeira linha celular humana

Vários ácidos nucleicos de fita dupla são preparados. Suas localizações relativas ao RNAm e CDS, bem como SNPs humano no ácido nucleico que codifica para RTP801 humano (no. de acessões no banco de dados NM 019058) é represen-

tada na figura 3. A primeira linha celular humana foi posta em contato com os ditos ácidos nucléicos de fita dupla descritos no exemplo 1. Mediante indução de condição semelhante à hipóxia e tratamento com os ditos ácidos nucléicos de fita dupla, as células foram lisadas e os lisados celulares submetidos à immunoblotting p110a, que é uma unidade catalítica de PI3-quinase, e p85 foram usados como controles de carregamento. A intensidade da fita de RTP801 visualizada usando os anticorpos policlonais RTP801 é uma medida da atividade dos ácidos nucléicos de fita dupla individuais em termos de redução do nível de expressão de RTP801.

Todo e qualquer dos ácidos nucléicos de fita dupla foram modificados de maneira tal que um grupo 2' 0-Me estivesse presente no primeiro, terceiro, quinto, sétimo, nono, décimo primeiro, décimo terceiro, décimo quinto, décimo sétimo e décimo nono nucleotídeo da fita anti-sentido, por meio do que exatamente a mesma modificação, isto é, um grupo 2'-O-Me estava presente no segundo, quarto, sexto, oitavo, décimo, décimo segundo, décimo quarto, décimo sexto e décimo oitavo nucleotídeo da fita sentido. Adicionalmente, deve-se notar que, no caso desses ácidos nucléicos particulares de acordo com a presente invenção, o primeiro trecho é idêntico à primeira fita e o segundo trecho é idêntico à segunda fita e esses ácidos nucléicos são também de extremidade cega.

Os experimentos foram realizados duas vezes e os resultados individuais mostrados nas figuras 4A a H, onde eles são designados como experimento 1 e experimento 2, respectivamente.

As representações h, hr e hmr nas figuras 4A a H indicam que o ácido nucléico fita dupla respectivo foi projetado de maneira tal a endereçar uma seção do RNAm de RTP801 que é específica para RNAm RTP801 humano (h), a endereçar uma seção do RNAm de RTP801 que é específica para RNAm RTP801 humano e de rato (hr) e a endereçar uma seção do RNAm de RTP801 que é específica para RNAm RTP801 humano, de camundongo e rato (hmr). O ácido nucléico fita dupla referido como no. 40.1 foi usado como um controle positivo e células não tratadas (UT+) foram usadas como controle negativo.

De acordo com os resultados, os ácidos nucléicos de fita dupla seguintes se mostraram ser particularmente úteis na infra-regulagem da expressão de RTP801: no. 14, no. 15, no. 20, no. 21, no. 22, no. 23, no. 24, no. 25, no. 27, no. 39, no. 40, no. 41, no. 42, no. 43, no. 44, no. 49 e no.50 (ver tabela A).

Exemplo 3

Redução na expressão de RTP801 em uma segunda linha celular humana

Os experimentos descritos com relação ao exemplo 2 foram repetidos usando a segunda linha celular especificada no exemplo 1 e os resultados estão representado nas figuras 5A a F.

Como pode-se deduzir dessas figuras, os resultados obtidos com relação aos experimentos descritos no exemplo 2 foram confirmados usando essa segunda linha celular humana.

Exemplo 4

Efeito de dosagem de ácidos nucléicos de fita du-

pla específicos de RTP801

Nesse experimento, o efeito de dosagem de ácidos nucleicos de fita dupla específicos de RTP801 foi investigado.

5 Com este propósito, as células HeLa tratadas com relação aos exemplos 2 e 3, por meio do que a concentração de ácido nucleico de fita dupla no caldo de cultura foi 10 nM, 5 nM e 1 nM. Como controle positivo, ácido nucleico fita dupla no. 40.1 foi usado e como controle negativo células
10 não tratadas (UT+). A leitura foi a mesma descrita com relação aos exemplos 2 e 3. Os ácidos nucleicos particulares de fita dupla usados foram aqueles com números de referência internos 14, 22, 23 e 27 que são direcionados para trechos no RNAm de RTP801 que são compartilhados por humanos, camun-
15 dongos e ratos, e ácido nucleico fita dupla com números de referencia internos 39 e 42 que são direcionados para trechos do RNAm de RTP801 específicos para RTP801 humano.

Os resultados estão mostrados nas figuras 6A a C. Pelas ditas figuras, pode-se concluir que existe uma clara
20 dependência da concentração do efeito dos ácidos nucleicos de fita dupla específica para RTP801, por meio do que as moléculas de ácido nucleico tendo números de referência internos 1, 15, 20, 21, 24, 40, 41, 43, 44, 22, 23, 27, 39, 42, 40.1, 44.1, e 14, preferivelmente 22, 23, 27, 39, 42, 40.1 e
25 44.1 e mais preferivelmente 14, 23 e 27 e preferivelmente cada das ditas molécula de ácido nucleico tendo o padrão de modificação particular descrito para elas na parte de exemplos aqui são particularmente efetivas.

Exemplo 5Especificidade de espécies do ácido nucléico fita dupla específico de RTP801

Os ácidos nucléicos de fita dupla de acordo com a
5 presente invenção foram projetados contra trechos do RNAm de
RTP801 que são os mesmos ou diferentes em várias espécies.
Para testar se existe uma especificidade de espécies de um
ácido nucléico fita dupla específico de RTP801, os ácidos
nucléicos de fita dupla com números de referência internos
10 14, 22, 23 e 27 que endereçam um trecho do RNAm de RTP801
que é conservado entre RNAm de RTP801 humano, de camundongo
e de rato, e o ácidos nucléicos de fita dupla com números de
referência internos 39 e 42 que endereçam um trecho de o
RNAm de RTP801 que é específico para RNAm de RTP801 de huma-
15 no, isto é, que endereçam um trecho que como tal não está
presente em camundongo ou rato, foram comparados em termos
de infra-regulagem de RTP801 usando a mesma abordagem e lei-
tura especificadas nos exemplos 1 e 2.

Embora todos os ácidos nucléicos de fita dupla u-
20 sados sejam em princípio ativos contra RNAm humano e, como
mostrado nos exemplos anteriores, sejam também adequados pa-
ra infraregular a expressão de RTP801, mediante o uso de uma
linha celular de camundongo, apenas aqueles ácidos nucléicos
de fita dupla que são também específicos para RNAm de RTP801
25 de camundongo reduziram efetivamente a expressão de RTP801,
a saber, ácidos nucléicos de fita dupla nos. 14, 22, 23 e
27.

A partir destes resultados pode-se concluir que é

possível projetar ácidos nucleicos de fita dupla endereçados à RTP801 que são específicos para uma ou várias espécies. Isso permite usar exatamente a mesma molécula em modelos animais bem como no homem.

5 Exemplo 6

Modelos, métodos e resultados experimentais relacionados à Degeneração Macular

Os compostos da presente invenção foram testados em um modelo animal de Neovascularização Coroidal (CNV) a seguir. Essa característica distintiva de AMD úmida é induzida em modelos animais por tratamento a laser.

A) Modelo camundongo

Indução por Neovascularização Coroidal (CNV)

Neovascularização Coroidal (CNV), uma característica distintiva de AMD úmida foi desencadeada por fotocoagulação a laser (532 nm, 200 mW, 100 ms, 75 µM) (OcuLight GL, Iridex, Mountain View, CA) realizado em ambos os olhos de cada camundongo no dia 0 por um único indivíduo mascarado para a associação de grupo. Pontos de laser foram aplicados em um modelo padronizado ao redor do nervo ótico usando um sistema de distribuição de lâmpadas de fendas e uma lamínula como uma lente de contato.

Grupos de tratamento

CNV foi induzida nos seguintes grupos de camundongos (machos 6-8 semanas de idade):

- (1) 12 camundongos WT;
- (2) 12 camundongos Knock-Out RTP801;
- (3) 12 camundongos WT injetados com 0,25 µg de an-

ti RNAsi de RTP801 ativo estabilizado sintético (REDD14) em um olho e anti RNAsi de RTP801 inativo (REDD8 - controle negativo) no olho contralateral, nos dias 0 e 7;

(4) 12 Camundongos WT injetados com 0,25 µg de anti RNAsi de RTP801 ativo estabilizado sintético (REDD14) em um olho e anti RNAsi de GFP inativo (controle negativo) no olho contralateral nos dias 0 e 7;

(5) 12 Camundongos WT injetados tanto com 0,1 µg de anti RNAsi de RTP801 ativo estabilizado sintético (REDD14) em um olho quanto PBS (controle negativo) no olho contralateral nos dias 0 e 7;

(6) 12 Camundongos WT injetados tanto com 0,05 µg de anti RNAsi de RTP801 ativo estabilizado sintético (REDD14) em um olho quanto PBS (controle negativo) no olho contralateral nos dias 0 e 7.

Ambos os olhos de cada camundongo foram tratados com laser. O volume injetado foi 2 µL.

Avaliação

1. O experimento terminou no dia 14. Para avaliação, os olhos foram anucleados e fixados com 4% de paraformaldeído por 30 minutos a 4°C. A retina neurossensorial foi descolada e separada do nervo ótico. O complexo esclera coróide RPE remanescente foi montado nivelado em Immu-Mount (Vectashield Mounting Medium, Vector) e colocado em lâmina. Montagens niveladas foram examinadas com um microscópio confocal de varredura a laser (TCS SP, Leica, Alemanha). Os vasos foram visualizados pela excitação com laser de argônio azul. As seções óticas horizontais (etapa 1 µM) foram obti-

das da superfície do complexo esclera coróide RPE. O plano focal mais profundo, no qual a rede vascular coroidal ao redor conecta-se com a lesão que poderia ser identificada, foi considerado o piso da lesão. Qualquer vaso na área tratada com laser e superficial a este plano de referência foi considerado CNV. Imagens de cada seção foram armazenadas digitalmente. A área de fluorescência CNV relacionada foi medida por análise de imagem computadorizada usando o software Leica TCS SP. A soma de toda a área fluorescente em cada seção horizontal foi usada como um índice para o volume de CNV.

2. Camundongos WT separados (5 olhos por grupo) foram usados para avaliar a expressão de RNAm de RTP801 em CNV (bem como a expressão de outros genes relevantes para AMD) (não tratados e tratados com RNAsi) usando PCR em tempo real no RNA extraído de RPE/coróides ou da retina neural.

Resultados

1. Camundongos KO RTP801 exibiram 30% menos extravasamento de vaso sanguíneo comparado aos Camundongos WT após indução CNV; ver figura 8.

2. RNAsi estabilizado sintético contra RTP801, REDD14, elicitou uma redução dependente de dose do volume CNV. Uma inibição máxima de aproximadamente 70%, comparada aos olhos injetados com PBS foi alcançada no REDD14 a uma dose de (seqüência No. 14 na tabela A, SEQ ID No.s 16 (sentido) e 66 (anti-sentido)) 0,25 ug por olho. Na mesma dose, tanto RNAsi controle negativo, REDD8, quanto anti RNAsi de GFP exibiram apenas 27% e 33% de redução do volume CNV, respectivamente, sustentando tanto a eficácia superior de

REDD14 quanto também a especificidade de seu efeitos.

B) Modelo de primatas não humanos

Indução CNV

Oito macacos cinomolgos machos (Macaca fascicularis) 2-6 anos de idade foram usados no estudo. Neovascularização coroidal (CNV) foi induzida por tratamento a laser perimacular de ambos os olhos antes da administração da dose. Nove lesões foram colocadas na mácula com um laser [OcuLight GL (532 nm) Laser Foto coagulador com um Adaptador de lâmpada de fenda portátil IRIS Medical®], e pontos de laser no olho direito espelharam a localização no olho esquerdo. Os parâmetros aproximados de laser foram como a seguir: tamanho de ponto: 50-100 µm de diâmetro; energia de laser: 300-700 miliwatts; tempo de exposição: 0,1 segundo.

15 Tratamento

Imediatamente após o tratamento a laser, ambos os olhos de todos os animais foram submetidos a uma injeção intravítrea única. O olho esquerdo foi dosado com 350 µg de RNAsi estabilizado sintético contra RTP801 (o mesmo usado no estudo de camundongo) no volume final de 50 µL, ao passo que o olho contralateral recebeu 50 µL de PBS (veículo).

Avaliação

1. Todos os animais foram submetidos a exames diários de consumo de comida e medida de peso corporal.
- 25 2. 2 macacos foram eutanizados no dia 6 após indução por CNV. Seus olhos foram anucleados e o pólo posterior foi nivelado. A seguir a região da fóvea foi excisada e separada em coróides e neuroretina que foram separadamente

(para cada animal) congeladas em nitrogênio líquido para ser subsequentemente usados na extração de RNA e avaliação de PCR em tempo real de expressão de RTP801.

3. Angiogramas de fluoresceína foram realizados no pré-estudo e no fim das semanas 1, 2, e 3 após indução por CNV. Fotografias foram tiradas usando uma câmera de fundo (TRC-SOEX Retina Camera). Imagens foram capturadas usando o sistema TOPCON IMAGEnet™. Corante fluoresceína (10% fluoresceína sódio, aproximadamente 0,1 mL/kg) foi injetado por via portas de acesso vascular. Fotografias foram tiradas em vários pontos de tempo após injeção de corante para incluir a fase arterial, fase arteriovenosa anterior e várias fases arteriovenosas posteriores, a fim de avaliar neovascularização e monitorar o extravasamento de fluoresceína associada a lesões por CNV. Interpretação e análise dos angiogramas de fluoresceína foram conduzidas independentemente por dois oftalmologistas.

Neovascularização (NV) foi avaliada em angiogramas anteriores e cada ponto foi classificado de acordo com o esquema a seguir:

- 0- sem sinal de NV
- 0,5- ponto suspeito
- 1- ponto "quente"
- 2- NV na queima a laser
- 3- NV evidente

Extravasamento foi avaliado de acordo com o esquema a seguir:

- 0- sem extravasamento

0,5- ponto suspeito

1- pequeno ponto evidente de extravasamento

2- extravasamento crescente com o tempo

3- extravasamento maior do que os limites anteriores (evidentemente)

Além do mais, o tamanho de cada ponto foi comparado entre os angiogramas anterior e posterior usando medidas morfométricas, e o aumento no tamanho do ponto resultante do extravasamento foi calculado.

4. Eletroretinogramas (ERGS) foram registrados usando um eletroretinógrafo Epic 2000 de acordo com os SOPs de Sierra e o SOP específico do estudo, incluindo o uso do aparelho Ganzfield, no pré-estudo e no fim da semana 3. Os dados ERG tabulados foram avaliados por um oftalmologista veterinário.

O estudo terminou no dia 21 depois da indução por CNV. Necropsia grosseira e exame histológico foram realizados em órgãos e tecidos incluindo os olhos.

Resultados

1. RNAsi contra RTP801 reduziu a expressão de RTP801 no RPE/coróides de animais tratados com laser, medida no dia 6 depois da indução por CNV por PCR em tempo real (ver figura 10).

2. Comparação da classificação de ponto para extravasamento e neovascularização entre os olhos contralaterais em cada macaco individual revelou que ambas as características patológicas foram diminuídas nos olhos injetados com RNAsi de RTP801, comparado ao controle (para resultados

de extravasamento, ver figura 11; para resultados de neovascularização, ver figura 12).

3. Cálculo do número geral de pontos com maiores graus clinicamente relevantes (2 e 3) de extravasamento ou neovascularização em todos os olhos injetados com RNAsi comparado a todos os olhos injetados com PBS, novamente revelou que olhos injetados com RNAsi foram menos afetados (ver figura 13, a+b).

4. Os dados da classificação geral por extravasamento de pontos e neovascularização foram submetidos à avaliação estatística. A existência de diferenças entre os tratamentos controle e RNAsi foi analisada calculando-se o delta entre as graduações do ponto médio do olho direito (R) controle e olho esquerdo (L) injetado por RNAsi ($\text{delta} = R - L$). A significância da diferença foi calculada usando um método estatístico não paramétrico, teste de graduação de sinais de Wilcoxon - um teste de uma cauda. Diferentes fases de angiogramas (arterial anterior, arteriovenosa e venosa posterior) foram analisadas separadamente para cada semana (1, 2 e 3).

A tabela 2 mostra a significância (teste de uma cauda) de diferença de graduação de extravasamento de 0 para cada grupo (valores $p < 0,05$ são sublinhados). Uma redução significativa na graduação de extravasamento foi encontrada nos olhos esquerdos (tratados com RNAsi) com relação ao direito (tratado com placebo) nas semanas 2 e 3 nos angiogramas posteriores.

Tabela 2

Extravasamento	Valores P

Angiogramas	Semanas	teste de graduação de sinais de Wilcoxon
Anterior	1	0,2500
	2	0,5000
	3	0,5000
Arteriovenosa	1	0,3438
	2	0,1250
	3	0,2344
Posterior	1	0,1250
	2	<u>0,0313</u>
	3	<u>0,0156</u>

Note que angiogramas posteriores são utilizados usualmente para avaliação de parâmetros de extravasamento.

A tabela 3 mostra a significância (teste de uma cauda) de diferença de graduação de neovascularização (NV) 0 para cada grupo (valores $p < 0,05$ são sublinhados).

Tabela 3

Extravasamento		Valores P
Angiogramas	Semanas	teste de graduação de sinais de Wilcoxon
Anterior	1	0,0781
	2	<u>0,0313</u>
	3	<u>0,0313</u>
Arteriovenosa	1	0,0625
	2	<u>0,0313</u>
	3	0,1563
Posterior	1	0,2500
	2	0,3438
	3	0,2500

Uma redução significativa na graduação de NV foi encontrada nos olhos esquerdos com relação ao direito nas semanas 2 e 3 no período anterior e no período arteriovenoso na semana 2.

5 Note que angiogramas anteriores são usualmente utilizados para avaliação de parâmetros de neovascularização.

5. Avaliações morfométricas quantitativas do aumento na área de pontos que ocorrem entre angiogramas anterior (fase arterial) e posterior (fase venosa) por causa do
10 extravasamento revelou que este parâmetro foi reduzido significativamente nos pontos de laser dentro de olhos injetados com RNAsi (olho esquerdos, OS) comparados com o controle (olhos direitos, OD). Dois exemplos estão mostrados na figura 14. Os gráficos demonstram o aumento relativo (em %) na
15 área de cada ponto no olho esquerdo e direito de animais #3315 e 3300.

Adicionalmente, notou-se em todos os estudos citados que anti RNAsi de RTP801 não teve efeitos adversos nos eletroretinogramas (ERG), na histologia do olho ou na estrutura e função de outros órgãos e sistemas.
20

Para sumarizar os experimentos e resultados anteriores:

1. Tanto inibição de RNAsi genética (RTP801-/-) quanto terapêutica de expressão de RTP801 no modelo CNV induzido por laser de degeneração macular relacionada com idade úmida (AMD úmida) resultam em significativa redução do volume CNV.
25

2. Resultados positivos foram obtidos em modelo

camundongo e de primatas não humanos.

3. Exame patológico e ERG em macaco não revelou nenhuma toxicidade mediada por RNAsi tanto nos olhos quanto em quaisquer outros órgãos ou sistemas.

5 C) EFICÁCIA DA TERAPIA DE COMBINAÇÃO DE RNASI DE RTP801 (REDD14) E ANTICORPO ANTI-VEGF

A eficácia da terapia de combinação de RNAsi de RTP801 (REDD14) e anticorpo anti-VEGF no tratamento de doenças em que CNV ocorre foi testada em modelo camundongo CNV
10 anterior.

A) Estudos do volume CNV

O volume de neovascularização coroidal (CNV) 3 semanas após lesão por laser foi computado por microscopia de fluorescência confocal previamente descrito (Sakurai et W.
15 IOVS 2003;44: 3578-85 & Sakurai et al. TOYS 2003; 44: 2743-2749).

Em estudos prévios foi observado que anticorpo anti-VEGF-A (Ab) reduziu o volume CNV de uma maneira dependente da dose. Uma dose de 1 ng de VEGF-A Ab foi selecionada
20 para estudos de combinação REDDI4+VEGF-A Ab, porque essa dose teve um efeito inibitório intermediário: VEGF-A Ab (1 ng) reduziu o tamanho de CNV em 26±6%.

Os principais resultados do estudo de anticorpo REDD14 + VEGF-A (Ab) são:

25 • A adição de REDD14 de uma dose inferior a 0,05 µg reduziu o tamanho de CNV em 27±4% comparado ao VEGF-A Ab sozinho.

• A adição de REDD14 de uma dose superior a 0,25

µg reduziu o tamanho de CNV em 55±3% comparado ao VEGF-A Ab sozinho.

B) Estudos de extravasamento de CNV

Experimento 1

5 Este experimento foi projetado a fim de identificar um efeito terapêutico de potencial aditivo ou sinérgico de inibição de VEGF e RTP801 no modelo de Neovascularização Coroidal induzido por laser em camundongo

Materiais:

- 10
- REDD14 (RNAsi de RTP801)
 - REDD8 (controle negativo)
 - Anticorpos anti-VEGF
 - IgG não específica (controle negativo)

15 CNV foi induzida no dia zero descrito anteriormente; o material teste foi injetado nos sujeitos no dia zero e dia 7.

Os resultados foram avaliados por angiografia de fluoresceína nas semanas 1, 2, 3, e por medida do volume CNV na semana 3. Cada grupo teste foi composto de 10 olhos.

20 Grupos experimentais:

- VEGF Ab 0,5 ng/olho
- VEGF Ab 1 ng/olho
- VEGF Ab 2 ng/ olho
- VEGF Ab 4 ng/olho
- 25 - REDDI4 0,05 ug/olho
- REDDI4 0,1 ug/olho
- REDD14 0,25 ug/olho 30
- REDDI4 0,05 ug/olho + VEGF Ab 1 ng/olho

- REDD14 0,1 ug/olho + VEGF Ab 1 ng/olho
- REDD14 0,25 ug/olho + VEGF Ab 1 ng/olho

Grupos controle

- PBS
- 5 - IgG não específica 2 ng/olho
- REDD8 0,1 ug/olho
- REDD8 0,1 ug/olho + VEGF Ab 1 ng/olho

Resultados

Os resultados do experimento anterior estão apresentados nas figuras 23-24. Estes resultados mostram que administração intravítrea simultânea de VEGF Ab e REDD14 leva a uma inibição maior e dependente de dose de Neovascularização Coroidal e extravasamento de vaso sanguíneo coróide, expressa na menor incidência dos pontos grau 4 e maior incidência dos pontos grau 1.

Angiogramas foram graduados usando uma modificação de um esquema de graduação semiquantitativo (1-4) publicado previamente (Sakurai et al. IOVS 2003; 44: 2743-2749). Lesões de grau 1 são consideradas como nunca formadas, isto é, equivalente a prevenção completa. Lesões de grau 4 são consideradas significantes patologicamente, isto é, equivalentes a lesões que seriam tratadas em pacientes. VEGF-A Ab (1 ng) reduziu a incidência de lesões de grau 4 por olho em 38±8% e aumentou a incidência de lesões de grau 1 por olho em 66±43%.

Os principais resultados da combinação de REDD14 + VEGF-A Ab no estudo de extravasamento são:

- A adição de REDD14 de uma dose 0,05 µg mais bai-

xa reduziu a incidência de lesões de grau 4 em $66 \pm 12\%$ comparado ao VEGF-A Ab sozinho.

- A adição de REDD14 de uma dose 0,25 μg mais alta reduziu a incidência de lesões de grau 4 em $60 \pm 12\%$ comparado ao VEGF-A Ab sozinho.

- A adição de REDD14 de uma dose 0,25 μg mais alta dobrou ($100 \pm 34\%$) a incidência de lesões de grau 1 comparado ao VEGF-A Ab sozinho.

Experimento 2

Esse experimento foi projetado a fim de estudar o efeito de REDD14 na expressão de gene em RPE e retina neural.

Projeto experimental

Grupos:

- PBS
- REDD14 0,25 mg

O tamanho do grupo foi de 5 olhos. CNV foi induzida por tratamento a laser descrito anteriormente no dia zero; o material teste foi injetado também no dia zero e o efeito avaliado por análise de PCRq da expressão de gene em RPE e retina neural no dias zero e 5.

Resultados

Os resultados do experimento anterior estão apresentados na figura 25. Estes resultados mostram que a administração de REDD14 causa:

- $\approx 40\%$ de infra-regulagem da expressão de RTP801 abaixo da linha de base tanto em RPE quanto em retina neural (ver também figura 26);

- $\approx$ 70% de supra-regulagem da expressão de PEDF acima da linha de base na retina neural (note: em olhos injetados com PBS, a expressão de PEDF é 40% infra-regulada abaixo da linha de base);

5 - $\approx$ 40% de infra-regulagem da expressão de VEGF 164 abaixo da linha de base em RPE (note: em olhos injetados com PBS, a expressão de VEGF164 é 20% infraregulada);

- $\approx$ 50% de redução da expressão de MCP 1 em RPE/coróides (Figura 26).

10 Conclusões gerais de ambos os experimentos:

- Inibição simultânea de RTP801 e VEGF teve efeito inibitório melhor na neovascularização coroidal e extravasamento neovascular.

15 - Inibição da expressão de RTP801 por REDD14 não apenas previne infra-regulagem de PEDF no modelo CNV, mas melhora sua expressão comparada com a linha de base.

- Inibição de expressão de RTP801 leva a infra-regulagem concomitante de MCP 1 que deve ter um efeito anti-inflamatório.

20 - Sem ficar preso à teoria, o aumento na expressão de PEDF por REDD14 pode dar suporte ao efeito cooperativo observado de inibição simultânea de VEGF e RTP801. (PEDF é um fator antiangiogênico e neuroprotetor bem conhecido.)

25 - Sem ficar preso à teoria, a redução de expressão de MCP 1 por REDD14 pode também dar suporte ao efeito cooperativo observado de inibição simultânea de VEGF e RTP801. (MCP 1 é uma conhecida quemoquina pró-inflamatória envolvida na patogênese de AMD.)

Modelos adicionais AMDs que podem ser usados para testar os métodos da presente invenção:

- Animais deficientes de Ccl-2 ou Ccr-2 - deficiência em qualquer destas proteínas causa o desenvolvimento de alguns das principais características de AMD. Animais deficientes destas proteínas podem ser usados para testar os métodos da presente invenção.

Para informação mais detalhada de modelos animais AMD, ver: Chader, Vision research 42 (2002) 393-399; Ambati et al., Nature Medicine 9(11) (2003) 1390-1397; Tolentino et al., Retina 24 (2004) 132-138.

D) Comparação de atividade de REDD14 e RNAsi de RTP801 que possui um grupo fosfato 3' em cada fita com a mesma molécula sem fosfatos 3' (REDD14NP) no modelo CNV induzido por laser.

O experimento foi em geral realizado e avaliado como descrito anteriormente. Um olho de cada camundongo (12 por grupo) foi injetado com 0,25 ug de RNAsi de REDD14, ao passo que o outro olho foi injetado com RNAsi de REDD14NP.

20 Resultados

Ambos RNAsi reduziram de maneira igual e eficiente o volume de CNV (Figura 27).

exemplo 7

25 Modelos e resultados relacionados à COPD e Enfise- ma

Os compostos da presente invenção foram testados em modelos animais a seguir:

* Modelo enfisema induzido por fumaça de cigarro:

exposição crônica à fumaça de cigarro causa enfisema em vários animais tais como, inter alia, camundongo, porquinho da Índia.

* Atividade de protease no pulmão como um desencadeador de enfisema.

* Modelo de inibição de VEGFR de enfisema.

* Instilação bronquial com neutrófilo humano/elastase pancreática em roedores.

* Enfisema induzido por MMP (matriz metaloprotease).

* Enfisema induzido por inflamação.

Adicionalmente, modelos de enfisema podem ser gerados por meios genéticos (por exemplo, camundongos que carregam a mutação TSK), e animais enfisematosos podem ser gerados por modificadores conhecidos de suscetibilidade a enfisema tais como, inter alia, lesão de pulmão, hipoplasia alveolar, hiperóxia, tratamento com glicocorticóides e nutrição.

A. Avaliação da influência de ausência de RTP801 no desenvolvimento da doença em modelo camundongo de enfisema (usando camundongo knockout RTP801)

(1) Inflamação e apoptose induzidas por fumaça de cigarro (CS) são iniciadas em 5 camundongos KO RTP801 machos de quatro meses e 5 controles tipo selvagem. Os camundongos são submetidos à intensa CS (descrito em Rangasamy et al., ver anteriormente) por 7 dias. Camundongos KO e WT não tratados do experimento de inibição de VEGFR anterior podem também servir como grupos controle não tratados para esse

experimento. Os pulmões são subsequentemente inflados por agarose, fixados e embutidos em parafina, e o desenvolvimento do estresse oxidativo nos camundongos KO é avaliado por:

5 a) localização e quantificação imuno-histoquímica de 8-oxo-dG nas seções de pulmão;

b) localização e quantificação imuno-histoquímica de caspase 3 ativa nas seções de pulmão, usando anticorpos específicos, ou avaliação quantitativa do número de células TUNEL positivas;

10 c) medida da concentração de ceramida nos extratos de pulmão;

d) medida de atividade da caspase nos extratos de pulmão.

(2) Fumaça de cigarro a longo prazo em camundongos KO. 6 camundongos fêmeas KO e 6 WT de idade casada foram submetidos à intensa fumaça de cigarro (5 horas por dia) durante um período de 6 meses. Os camundongos foram então sacrificados, e diâmetro interseptal médio (um parâmetro de desenvolvimento do enfisema) foi avaliado usando uma abordagem morfométrica.

15

20

B. Avaliação da influência de ausência de RTP801 na progressão da doença em modelos camundongo de enfisema, pela inibição de RTP801 endógena empregando RNAsi que inativa RTP801 na distribuição intrapulmonar

25 Inflamação induzida por CS foi induzida por 7 dias de fumaça em 2 grupos de camundongos C57BL6, 10 camundongos por grupo. Grupo 1: CS + distribuição de RNAsi (REDD8) RNAsi controle; Grupo 2: CS + RNAsi de RTP801 (REED14). Grupos

controle de camundongos foram instilados com qualquer tipo de RNAsi, mas mantidos em condições de ar ambiente. Os animais foram avaliados como no experimento anterior com os camundongos Knock-Out.

5 Métodos

Exposição à fumaça de cigarro (CS)

A exposição é realizada (7 horas/dia, 7 dias/semana) queimando cigarros de referência 2R4F (2,45 mg de nicotina por cigarro; comprados do Tobacco Research Institute, University de Kentucky, Lexington, KY, USA) usando uma máquina de fumaça (Modelo TE-10, Teague Enterprises, Davis, CA, USA). Cada cigarro queimando lentamente foi baforado por 2 segundos, uma vez cada minuto por um total de oito baforadas, em uma vazão de 1,05 L/minuto, para fornecer uma baforada padrão de 35 cm³. A máquina de fumaça é ajustada para produzir uma mistura de fumaça secundária (89%) e fumaça principal (11%) pela queima de cinco cigarros por vez. A atmosfera da câmara é monitorada por particulados suspensos e monóxido de carbono totais, com concentrações de 90 mg/m³ e 350 ppm, respectivamente.

Análise morfológica e morfométrica

Após a exposição dos camundongos à CS ou instilação de plasmídeo que expressa RTP801, os camundongos são anestesiados com halotano e os pulmões são inflados com 0,5% de agarose de baixa fusão, a uma pressão constante de 25 cm previamente descrita⁶. Os pulmões inflados são fixados em formalina tamponada a 10% e embutidos em parafina. Seções (5 pm) são coradas com hematoxilina e eosina. O diâmetro alve-

olar médio, comprimento alveolar e interceptos lineares médios são determinadas por morfometria assistida por computador com o software Imagem Pro Plus (Media Cybernetics, Silver 30 Spring, MD, USA). As seções de pulmão em cada grupo
 5 são codificadas e imagens representativas (15 por seção de pulmão) são adquiridas por um investigador que não conhece a identidade das lâminas com um microscópio Nikon E800, lentes de 20X.

Lavagem broncoalveolar (BAL) e fenotipagem

10 Após a exposição à CS ou instilação de plasmídeo que expressa RTP801, os camundongos são anestesiados com sódio pentobarbital. O fluido BAL coletado dos pulmões dos camundongos é centrifugado (500 g a 4°C), e o precipitado celular é novamente suspenso em uma salina tamponada por fosfato.
 15 O número total de células no fluido da lavagem é determinado, e 2×10^4 células são citocentrifugadas (Shandon Southern Products, Pittsburgh, PA, USA) sobre lâminas de vidro e coradas com corante Wright-Giemsa. As contagens diferenciais de células são realizadas em 300 células, de acordo
 20 com as técnicas citológicas padrões.

Identificação de populações de células apoptóticas alveolares nos pulmões.

Para identificar os diferentes tipos de célula alveolar submetendo-se a apoptose nos pulmões, uma coloração
 25 imuno-histoquímica de caspase 3 ativa é realizada nas seções de pulmão de camundongos expostos ao ar ambiente (RA) bem como à CS. Para identificar as células epiteliais tipo II apoptóticas nos pulmões, depois de marcação com caspase 3

ativa, as seções de pulmão são incubadas primeiro com anticorpo de proteína C do agente tensoativo anti-camundongo e então com um anticorpo TexasRed anti-coelho. Células endoteliais apoptóticas são identificadas por incubação das primeiras seções com o anticorpo CD 31 anti-camundongo e então com o anticorpo secundário de coelho anti-camundongo biotilado. As seções de pulmão são rinsadas em PBS e então incubadas com o complexo conjugado estreptavidina-TexasRed. Os macrófagos apoptóticos nos pulmões são identificados por incubação das seções primeiramente com o anticorpo rato anti-camundongo Mac-3 e então com o anticorpo TexasRed anti-rato. Finalmente, DAPI é aplicada em todas as seções de pulmão, incubadas por 5 minutos, lavadas e montadas com o meio de montagem Vectashield HardSet. DAPI e fluoresceína são visualizadas a 330-380 nM e a 465-495 nM, respectivamente. Imagens das seções de pulmão são adquiridas com o Microscópio Nikon E800, lentes de 40X.

Localização imuno-histoquímica de caspase-3 ativa

Coloração imuno-histoquímica do ensaio de caspase-3 ativa é realizada usando anticorpo anti-caspase-3 ativa e as células positivas caspase-3 ativa são contadas com um macro, usando o programa Imagem Pro Plus. As contagens são normalizadas por uma soma dos perfis alveolares aqui nomeados comprimento alveolar e expressos em μM . Comprimento alveolar correlaciona-se inversamente com o intercepto linear médio, isto é, à medida que os septos alveolares são destruídos, interceptos lineares médios aumentam bem como o comprimento alveolar total, isto é, comprimento total dos sep-

tos alveolares diminui.

Ensaio da atividade de caspase 3

A atividade de caspase-3/7 é medida em extratos de tecido de pulmão usando um ensaio fluorométrico de acordo com as instruções do fabricante. Tecido de pulmão congelado rapidamente (n = 3 por grupo) foi homogeneizado com o tampão do ensaio, seguido por sonificação e centrifugação a 800 x g. Após a remoção dos núcleos e fragmentos celulares, o sobrenadante (300 gg de proteína) é então incubado com o substrato pró-fluorescente à temperatura ambiente por 1 hora e a intensidade da fluorescência foi medida utilizando um fosfoimageador Typhoon (Amersham Biosciences, Inc., Piscataway, NJ, USA). Os resultados são expressos como a taxa de clivagem de substrato específico de caspase-3, expresso em unidades de atividade enzimática de caspase 3, normalizada por uma concentração de proteína total. Caspase 3 recombinante ativa foi utilizada como ensaio padrão (0-4 U). Lisados de tecidos sem substrato, tampão de ensaio sozinho e lisados com 3 inibidor de caspase 3 foram utilizados como controles negativos.

Localização imuno-histoquímica de 8-oxo-dG

Para a localização e quantificação imuno-histoquímica de 8-oxo-dG, seções de pulmão dos camundongos expostos à CS ou instilado com plasmídeo que expressa RTP801 são incubadas com anticorpo anti-8-oxo-dG e coradas usando o estojo InnoGenex™ Iso-IHC DAB usando anticorpos de camundongos. As células 8-oxo-dG-positivas são contadas com um macro (usando Imagem Pro Plus), e as contagens foram norma-

lizadas pelo comprimento alveolar da maneira descrita.

Instilação de plasmídeo DNA nos pulmões de camundongos

DNA de plasmídeo de vetores que expressam RTP801 e
5 de controle são preparados usando um estojo de isolamento de
DNA sem endotoxina. Para instilação infra-traqueal, 50 ug de
DNA de plasmídeo são distribuídos em 80 uL de perfluorocar-
bono estéril. As propriedades de carregar oxigênio de per-
fluorocarbono tornam-no bem tolerado nesses volumes, enquan-
10 to suas propriedades físicoquímicas permitem a distribuição
de pulmão distal extremamente eficiente, quando instilado
intratraquealmente. Os camundongos são anestesiados por ex-
posição ao halotano inalacional rapidamente, a língua é gen-
tilmente puxada para frente por fórceps e o instilado de
15 traquéia com solução perflúor de carbono aplicado na base da
língua via um angiocateter de extremidade cega.

Instilação de RNAsi em pulmões de camundongos.

Os camundongos são anestesiados com uma injeção
intraperitonal de cetamina/Xilazina (115/22 mg/kg). 50 µg
20 de RNAsi são instilados intranasalmente em volume de 50 µL
de NaCl 0,9% por distribuição de cinco porções consecutivas
de 10 µL. No fim da instilação intranasal, a cabeça do ca-
mundongo é mantida esticada para cima por 1 minuto para as-
segurar que toda a solução instilada drene por dentro.

25 Para informação mais detalhada, ver: Rangasamy T,
Cho CY, Thin mulappa, RK, Zhen L, Srisuma SS, Kensler TW,
Yamamoto M, Petrache I, Tudor RM, Biswal S. Genetic ablation
ofNrf2 enhances susceptibility to cigarette smoke-induced em-

physema in mice. Submitted to Journal of Clininical Investi-
 gation; Yasunori Kasahara, Rubin M. Tudor, Carlyne D. Cool,
 David A. Lynch, Sonia C. Flores, e Norbert F. Voelkel. Endo-
 thelial Cell Death and Decreased Expression of Vascular En-
 5 dothelial Growth Factor and Vascular Endothelial Growth Fac-
 tor Receptor 2 in Emphysema. Am J Respir Crit Care Med Vol
 163. pp 737-744, 2001; Yasunori Kasahara, Rubin M. Tudor,
 Laimute Taraseviciene-Stewart, Timothy D. Le Cras, Steven
 Abman, Peter K. Hirth, Johannes Waltenberger, e Norbert F.
 10 Voelkel. Inhibition of VEGF receptors causes lung cell apop-
 tosis and emphysema. J. Clin. Invest. 106:1311-1319 (2000);
 e uma revisão no tópico: Robin M. Tudor, Sharon McGrath e
 Enid Neptune, The pathological mechanisms of emphysema mod-
 els: what do they have in common?, Pulmonary Pharmacology &
 15 Therpaeutics 2002.

Resultados

1. A instilação de um plasmídeo que expressa
 RTP801 resulta em um fenótipo semelhante a enfisema em pul-
 mões de camundongos que é evidente por (1) aumento na conta-
 20 gem de células de lavagem broncoalveolar (Figura 15a); (2)
 apoptose de células septais de pulmão (Figura 15b) e aumento
 no diâmetro alveolar (Figura 15c).

2. Instilação de RNAsi de RTP801 (REDD14) resulta
 na redução da expressão de RTP801 nos pulmões (Figura 17b).

25 3. Camundongos KO RTP801 são protegidos do desen-
 volvimento do enfisema após 6 meses de fumaça de cigarro,
 evidenciado pela falta de aumento do diâmetro alveolar. (Fi-
 gura 18).

4. Camundongos KO RTP801 são protegidos da inflamação induzida por fumaça de cigarro evidenciado pelo número reduzido de células bronquioalveolares inflamatórias após 1 semana de fumaça de cigarro (Figura 16, a-b).

5 5. Camundongos KO RTP801 são protegidos de apoptose induzida por fumaça de cigarro de células septais de pulmão, evidenciada pela coloração da seção de pulmão por caspase ativado (Figura 16c).

6. Camundongos instilados por REDD14 são parcialmente protegidos da inflamação induzida pela fumaça de cigarro evidenciada pelo número reduzido de células broncoalveolares inflamatórias após 1 semana de fumaça de cigarro (Figura 17a).

7. Camundongos instilados por REDD14 são parcialmente protegidos da apoptose induzida pela fumaça de cigarro de células septais de pulmão, evidenciada pela coloração da seção de pulmão por caspase ativado e por immunoblotting de extratos de pulmão com anticorpos anti-caspase 3 ativado. (Figura 17c)

20 Exemplo 8.

Modelos e resultados relacionados à desordens microvasculares

Os compostos da presente invenção foram testados em modelos animais com uma faixa de desordens microvasculares como descrito a seguir.

1. Retinopatia diabética

RTP801 promove apoptose de célula neuronal e geração de espécies oxigênio reativas in vitro. O inventor da

presente invenção também observou que, em camundongos knockout (KO) RTP801 sujeitos ao modelo de retinopatia de prematuridade (ROP), neovascularização patológica NV foi reduzida sob condições hipóxicas, apesar de elevações em VEGF, ao passo que a ausência desse gene não influenciou a neonatal retinal NV fisiológica. Além disso, nesse modelo, a ausência de RTP801 foi também protetora contra apoptose neural hipóxica e vaso-obliteração hiperóxica.

Experimento 1

Diabetes foi induzida em camundongos KO RTP801 e tipo selvagem (WT) C57/129sv de mesma ninhada com 8 semanas de idade por injeção intraperitoneal de STZ. Depois de 4 semanas, ERG (lampejo branco individual, $1,4 \times 10^4$ ftc, 5 ms) foi obtido do olho esquerdo depois de 1 hora de adaptação no escuro. RVP foi avaliada em ambos os olhos usando a técnica de permeação de albumina azul de Evans.

Resultados

A glicose sanguínea não foi diferente entre diabético WT (DM) e KO DM (495 ± 109 vs 513 ± 76 mg/dL) nem WT e KO não diabético (NDM) (130 ± 10 vs 135 ± 31 mg/dL, respectivamente). RVP no grupo WT DM aumentou 138% ($51,2 \pm 37,9$ μ L/g/hr, $n=8$) comparado ao WT NDM ($21,5 \pm 18,8$ μ L/g/hr, $n=9$, $p=0,055$). Ao contrário, RVP foi reduzida em 80% em KO DM ($9,5 \pm 8,5$ μ L/g/hr, $n=6$, $p=0,023$) comparada com os camundongos WT DM, resultando em uma diminuição de 140% de RVP induzida por diabetes. Em camundongos WT DM, houve uma prolongação ($p<0,05$) do tempo implícito do potencial oscilatório para OP2 (11%), OP3 (12%), & OP4 (14%) e para a onda B (23%), comparado com

os WT NDM. Onda A não mudou significativamente. Estas mudanças foram normalizadas $\approx 100\%$ em camundongos KO DM para OP3 & OP4 e 65% para onda B comparado com os KO NDM.

Conclusão: Knock out de RTP801 atenua anormalidades RPV e ERG induzidas por diabetes em camundongos, sugerindo que esse gene indutível por hipóxia pode ter um papel importante na patogênese de doença retinal diabética precoce.

Experimento 2

Diabetes foi induzida em camundongos knockout RTP801 e em controle tipo selvagem com o fundo genético casado. Além do mais, ela foi induzida em camundongos C57B16, que foram subsequentemente usados para injeção intravítrea de anti-RTP801 e RNAsi controle. Para indução de diabetes, os camundongos foram injetados com estreptozotocina (STZ 90 mg/kg/d por 2 dias depois de jejum por toda a noite). A fisiologia do animal foi monitorada durante todo o estudo com relação às mudanças na glicose sanguínea, peso corporal, e hematócritos. Camundongos injetados com veículos serviram como controles. Os animais apropriados foram tratados por injeções intravítreas de pulmão de anti-RNAsi de RTP801 REDD14 ou pulmão de anti-RNAsi GFP controle. RNAsi foi injetado duas vezes no curso do estudo - no dia 0, quando a primeira injeção de STZ foi realizada, e no dia 14 após a injeção de STZ.

O extravasamento retinal vascular foi medido usando a técnica de corante de azul de Evans (EB) nos animais após 4 semanas de duração do diabetes. Os camundongos tive-

ram um cateter implantado na veia jugular direita 24 horas antes das medições com azul de Evans (EB). Medidas de permeabilidade retinal em ambos os olhos de cada animal seguiram um protocolo azul de Evans padrão.

5 Resultados

1. Extravasamento retinal de vaso sanguíneo foi reduzido em 70% em camundongos diabéticos KO RTP801 comparado com camundongos diabéticos tipo selvagem (ver figura 20).

2. O Knock out de RTP801 normaliza anormalidades
10 ERG em camundongos: Em camundongos WT DM, houve um prolongamento ($p < 0,05$) dos tempos implícitos de potencial oscilatório para OP2 (11%), OP3 (12%), & OP4 (14%) e para a onda B (23%) comparado com WT NDM. A onda A não mudou significativamente. Essas mudanças foram normalizadas $\approx 100\%$ em camundongo KO RTP801 DM para OP3 & OP4 e 65% por onda B comparado
15 com KO RTP801 NDM (ver figura 21).

3. Similarmente aos resultados em camundongos KO, extravasamento retinal de vaso sanguíneo foi reduzido em 50% em camundongos diabéticos injetados intravitralmente com
20 RNAsi REDD14 contra RTP801 comparado com camundongos diabéticos injetados intravitralmente com RNAsi controle contra GFP (ver figura 22).

2. Retinopatia de prematuridade

Retinopatia de prematuridade foi induzida pela ex-
25 posição de animais testes a condições hipóxicas e hiperóxicas, e subsequentemente pelo teste dos efeitos na retina. Resultados mostraram que camundongos KO RTP801 foram protegidos da retinopatia de prematuridade, com isso validando o

efeito protetor da inibição de RTP801.

3. Infarto do miocárdio

Infarto do miocárdio foi induzido pela ligação da artéria anterior descendente esquerda em camundongos, tanto a curto prazo quanto a longo prazo. Resultados: redução dos níveis de fração de TnT e CPK-MB em 24 horas pós-infarto no sangue e melhor ecocardiograma (volume de fração de ejeção) em 28 dias pós-infarto em camundongos KO RTP801.

4. Condições isquêmicas microvasculares

Modelos animais para avaliar condições isquêmicas incluem:

1. Trauma Fechado da Cabeça (CHI) - TBI experimental produz uma série de eventos que contribui para cascatas neurológicas e neurometabólicas, que estão relacionadas com o grau e a extensão de déficits comportamentais. CHI é induzida sob anestesia, enquanto um peso é deixado em queda livre de uma altura pré-fixada (Chen et al, J. Neurotrauma 13, 557, 1996) sobre o esqueleto exposto cobrindo o hemisfério esquerdo no plano médio-coronal.

2. Oclusão de artéria cerebral média transiente (MCAO) - Isquemia focal transiente de 90 a 120 minutos é realizada em ratos adultos, machos Sprague Dawley, 300-370 g. O método empregado é o MCAO de sutura intraluminal (Longa et al., Stroke, 30, 84, 1989, e Dogan et al., J. Neurochem. 72, 765, 1999). Resumidamente, sob anestesia por halotano, um material de sutura 3-0-náilon revestido com Poli-L-Lisina é inserido na artéria carótida interna direita (ICA) em um orifício na artéria carótida externa. O fio de náilon é pres-

sionado contra a ICA para a origem direita da MCA (20-23 mm). 90-120 minutos mais tarde o fio é retirado, o animal é fechado e deixado recuperar naturalmente.

3. Oclusão de artéria cerebral média permanente (MCAO) - a oclusão é permanente induzida unilateralmente por electrocoagulação de MCA. Ambos os métodos levam à isquemia cerebral focal do lado ipsilateral do córtex cerebral, deixando o lado contralateral intacto (controle). O MCA esquerdo é exposto via uma cranieotomia temporal, descrita para ratos por Tamura A. et al., J Cereb Blood Flow Metab. 1981;1:53-60. A MCA e seus ramos lenticulostriatais são fechados proximalmente à borda medial do trato olfatório com coagulação microbipolar. A ferida é suturada, e os animais retornados para suas gaiolas em um ambiente aquecido a 26°C a 28°C. A temperatura dos animais é mantida todo o tempo com um termostato automático.

5. Insuficiência renal aguda (ARF)

Testes de RNAsi ativo para tratar ARF podem ser feito usando ARF induzida por sepse ou ARF induzida por reperfusão isquêmica.

1. ARF induzida por sepse

Dois modelos animais preditivos de ARF induzida por sepse são descritos por Miyaji T, Hu X, Yuen PS, Muramatsu Y, Iyer S, Hewitt SM, Star RA, 2003, Ethyl pyruvate decreases sepsis-induced acute renal failure and multiple organ damage in aged mice, Rim Mt_ Nov; 64(5):1620-31. Estes dois modelos são administração de lipopolissacarídeo e punção de ligação cecal em camundongos, preferivelmente camun-

dongos velhos.

2. ARF induzida pela reperfusão isquêmica

Esse modelo animal preditivo é descrito por Kelly KJ, Plotkin Z, Vulgamott SL, Dagher PC, 2003 January,. P53
 5 mediates the apoptotic response to GTP depletion after renal ischemiareperfusion: protective role of a p53 inhibitor, J Am Soc Nephrol;14(1):128-38.

A lesão de reperfusão isquêmica foi induzida em ratos após 45 minutos de fixação arterial de rim bilateral e
 10 subsequente liberação do grampo para permitir 24 horas de reperfusão. 250 µg de RNAsi REDD14 ou GFP (controle negativo) foram injetados na veia jugular 2 horas antes e 30 minutos após a fixação. 250 µg adicionais de RNAsi foram fornecidos via veia caudal em 4 e 8 horas após a fixação. RNAsi
 15 contra GFP serviu como um controle negativo. A progressão da ARF foi monitorada pela medida de níveis de creatinina sérica antes e 24 horas depois da cirurgia. No fim do experimento, os ratos foram perfundidos via uma linha femoral de permanência com PBS aquecido seguido de 4% de paraformaldeído.
 20 Os rins esquerdos foram removidos e armazenados em paraformaldeído a 4% para subsequente análise histológica. Insuficiência renal aguda é frequentemente definida como um aumento agudo dos níveis de creatinina sérica em relação à linha de base. Um aumento de pelo menos 0,5 mg por dL ou 44,2 µmol
 25 por L de creatinina sérica é considerado uma indicação para insuficiência renal aguda. A creatinina sérica foi medida no tempo zero antes da cirurgia e 24 horas depois da cirurgia de ARF.

Para estudar a distribuição de RNAsi em rim de rato, moléculas de RNAsi de extremidade cega 19-mer marcadas por Cy3 (2 mg/kg) tendo modificação O-metila alternada nos resíduos de açúcar foram administradas iv por 3-5 minutos, depois do que o imageamento in vivo foi conduzido usando microscopia confocal de dois fótons. A análise de microscopia confocal revelou que a maioria de RNAsi nos rins é concentrada no compartimento endossomal de células tubulares proximais. Tanto fluorescência de RNAsi endossomal quanto citoplásmica foram relativamente estáveis durante as primeiras 2 horas após a distribuição e desapareceram em 24 horas.

Conforme evidenciado na figura 19, houve um aumento de dez vezes no nível de creatinina sérica após 45 minutos de tratamento de fixação da artéria bilateral do rim (tratamento com PBS). Quatro injeções de RNAsi 801 (REDD14, SEQ In No.s 16 e 66) (2 horas 30 minutos antes da fixação e, 4 horas e 8 horas após a fixação) reduziram significativamente o nível de creatinina sérica em 40% ($P < 0,02$). Estes resultados sugerem que RNAsi 801 pode proteger o tecido renal dos efeitos da lesão de reperfusão isquêmica e assim reduzir a severidade de ARF.

Exemplo 9

Preparação de RNAsi

Usando algoritmos proprietários e a sequência conhecida do gene RTP801 (SEQ ID NO:1), as sequências de vários RNAsi potenciais foram geradas. Moléculas de RNAsi de acordo com as especificações anteriores foram preparadas essencialmente como aqui descrito.

O RNAsi da presente invenção pode ser sintetizado por quaisquer dos métodos que são bem conhecidos na técnica para síntese de oligonucleotídeos ribonucléicos (ou desoxirribonucléicos). Por exemplo, uma máquina disponível comercialmente (disponível, *inter alia*, por Applied Biosystems) pode ser usada; os oligonucleotídeos são preparados de acordo com as seqüências aqui reveladas. Pares sobrepostos de fragmentos sintetizados quimicamente podem ser ligados usando métodos bem conhecidos na técnica (por exemplo, ver patentes U.S. No. 6.121.426). As fitas são sintetizadas separadamente e então são aneladas umas as outras no tubo. Então, os RNAsi de fita dupla são separados dos oligonucleotídeos de fita simples que não foram anelados (por exemplo, em virtude do excesso de um deles) por HPLC. Com relação aos RNAsi ou fragmentos de RNAsi da presente invenção, duas ou mais das tais seqüências podem ser sintetizadas e ligadas uma na outra para uso na presente invenção.

As moléculas de RNAsi da invenção podem ser sintetizadas por procedimentos conhecidos na técnica, por exemplo, os procedimentos descritos em Usman et al., 1987, J. Am. Chem. Soc., 109, 7845; Scaringe et al., 1990, Nucleic Acids Res., 18, 5433; Wincott et al., 1995, Nucleic Acids Res. 23, 2677-2684; e Wincott et al., 1997, Methods Mol. Biol., 74, 59, e podem fazer uso de grupos de proteção e acoplamento de ácido nucléico comum, tal como dimetoxitritila na extremidade 5' e fosforamidites na extremidade 3'. Os nucleotídeos modificados (por exemplo, 2'-O-metilados) e nucleotídeos não modificados são incorporados como desejados.

Alternativamente, as moléculas de ácido nucléico da presente invenção podem ser sintetizadas separadamente e unidas entre si pós-sinteticamente, por exemplo, por ligação (Moore et al., 1992, Science 256, 9923; Draper et al., International PCT publication No. W093/23569; Shabarova et al., 1991, Nucleic Acids Research 19, 4247; Bellon et al., 1997, Nucleosides & Nucleotides, 16, 951; Bellon et al., 1997, Bioconjugate Chem. 8, 204), ou por hibridização após a síntese e/ou desproteção.

As moléculas de RNAsi da invenção também podem ser sintetizadas via uma metodologia de síntese em tandem, descrita em publicação do pedido de patente U.S. No. US2004/0019001 (McSwiggen), em que ambas as fitas de RNAsi são sintetizadas como fragmentos ou fita de oligonucleotídeos contíguos simples separados por um ligante clivável, que é subsequentemente clivado para fornecer fragmentos ou fitas de RNAsi separados que hibridizam e permitem purificação do RNAsi duplex. O ligante pode ser um ligante de polinucleotídeo ou um ligante de não nucleotídeo. Para informação mais detalhada, ver PCT publicação No. WO 2004/015107 (ATUGEN).

Como descrito anteriormente, os RNAsi da tabela A (a seguir) foram construídos de maneira tal que açúcares substitutos tenham modificação 2'-O-metila, isto é, nucleotídeos substitutos foram assim modificados. Nessas modalidades preferidas, em uma fita do RNAsi os nucleotídeos modificados foram os números 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 e 19 e na fita oposta os nucleotídeos modificados foram os números

2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 e 18. Assim esses RNAsi são moléculas de RNA 19-mer de extremidade cega com modificação 2-O'-metila substituta da forma descrita anteriormente. Os RNAsi das tabelas 2 e 3 (a seguir) são também construídos dessa maneira; os RNAsi das tabelas B e D são moléculas de RNA 19-mer de extremidade cega com modificação 2-O'-metila substituta; os RNAsi da tabela C são moléculas de RNA 21-mer de extremidade cega com modificação 2-O'-metila substituta.

A tabela A detalha várias moléculas de RNAsi inéditas que foram geradas e subsequentemente sintetizadas pelo gene RTP801. As duas colunas finais indicam os resultados de dois experimentos realizados para examinar a atividade das moléculas inéditas. Resumidamente, células HeLa ou HaCat foram transfectadas com um RNAsi específico inédito para ser testado. A expressão do polipeptídeo RTP801 foi então determinada por western blotting usando um anticorpo contra o polipeptídeo RTP801. Referindo-se às duas colunas do lado direito da tabela A, "-" significa uma molécula inativa ou de baixa atividade (que não inibe substancialmente a expressão do gene RTP801); "+" significa uma molécula de RNAsi com alguma atividade inibitória (de expressão do gene RTP801), "++" significa uma molécula com atividade inibitória maior, e assim por diante. Qualquer uma das moléculas de RNAsi aqui reveladas, e em particular as moléculas ativas detalhadas na tabela A, são inéditas e também consideradas uma parte da presente invenção.

Tabela A

Nº	ID Nome	ORG	Localização	POS	AS (5'→3')	SS (5'→3')	HaLaB, 20nM	HaCat, 20nM
1	REDD1	h	5' UT R	128	UAGAAGCCC- CAGCUAGCGC	GCGCUAG- CUGGGGCUUCUA	+	+
2	REDD2	hmr	CDS	337	UCGAGCUCUC- CAGGCUUG	CGAGCCUGGA- GAGCUCGGA	-	-
3	REDD3	hmr	CDS	360	OGCUGCUGUC- CAGGGACUC	GAGUCCUGGA- CAGCAGCA	-	-
4	REDD4	hmr	CDS	478	AGCAGCUGCAU- CAGGUUGG	CCAACCUGAUG- CAGCUGCU	-	-
5	REDD5	h	CDS	728	UGAGUC- CAGGCGCAG- CACG	CGUG- CUGCCCCCGA- CUCA	-	-
6	Redd6	hmr	5' UT R	119	CAGCUAGCGCG- GUCAGCGA	UCGCE- CACGCGCUAG- CUG	-	-
7	Redd7	hmr	5' UT R	122	CCGCAGCU- AGCGCGGUCAG	CUGACGCGCU- AGCUGCGG	-	-
8	Redd8	hmr	5' UT R	125	AAGCGCGAGCU- AGCGCGGU	ACGCGCGCUAG- CUGGGCUU	-	-
9	Redd9	hmr	CDS	339	AGUCCGAGCU- CUCCAGGCU	AGCCUGGAGAG- CUGGGACU	-	-

10	Redd10	hmr	CDS	341	GCAGUCOGAG- CUCUCCAGG	CCUGGAGAG- CUCGGACUGC	-	-
11	Redd11	hmr	CDS	363	UGUUGCUGCU- GUCCAGGGA	UCCCUGGACAG- CAGCAACA	-	-
12	Redd12	hmr	CDS	369	AGCCACUGUUG- CUGCUGUC	GACAGCAGCAA- CAGUGGCU	-	-
13	Redd13	hmr	CDS	370	AAGCCACU- GUUGCUGCUGU	ACAGCAGCAA- CAGUGGCUU	-	-
14	Redd14	hmr	CDS	475	AGCUGCAUCAG- GUUGGCAC	GUGCCAACCU- GAUGCAGCU	+++	+++
15	Redd15	hmr	CDS	481	UGCAGCAGCUG- CAUCAGGU	ACCUGAUGCAG- CUGCUGCA	+	+
16	Redd16	hmr	CDS	486	UCUCCUGCAG- CAGCUGCAU	AUGCAGCUG- CUGCAGGAGA	-	-
17	Redd17	hmr	CDS	610	CCCGCAGGCGC CACGGCO	ACCGGCGCGC- CUCGGGG	-	-
18	Redd18	hmr	CDS	750	CCUGGAU- COUGGGOCAGAG	CUCUGGOCCAA- GAUCCAGG	-	-
19	Redd19	hmr	CDS	609	CAGGOCAGG- GACUGGCUG	CAGOCAGUCC- CUGACGCUG	-	-
20	Redd20	hmr	3'UT R	1097	AUGCOACAGUA- CUGAGGGG	CCCCUCAGUA- CUGUAGCAU	+	+
21	Redd21	hmr	3'UT R	1419	GOCEGUAAGAU- AGCOGCCU	AGGCAGCUAU- CUUACAGAC	+	+
22	Redd22	hmr	3'UT R	1617	UUCUAGAUGGA- AGACCCAG	CUGGGUCUUC- CAUCUAGAA	++	++
23	Redd23	hmr	3'UT	1670	UUGAACAUCAA-	GAAUACACUU-	++	++

			R		GUGUAUUC	GAUGUCCAA		
24	Redd24	hmr	3' UT R	1693	AAAUAUUGCAU- AGGUCUUA	UAAGACCUAUG- CAAUAUUU	+	+
25	Redd25	hmr	3' UT R	1695	AAAAUAUUG- CAUAGGUCU	AGACCUAUGCA- AUAUUUUU	++	++
26	Redd26	hmr	CDS	349	AGGGACUCGCA- GUCCGAGC	GCUOCCGACUC- GAGUCCCU	-	-
27	Redd27	hmr	3' UT R	1673	UACUUGAACAU- CAAGOGUA	UACACCUGAU- GUUCAAGUA	++	++
28	Redd28	hmr	3' UT R	1717	AAACAUGUUU- AUUAGAAAA	UUUUCUAAUAA- ACAUGUUU	-	-
29	Redd29	h	5' UT R	99	AACUGCOAAGA- CAAGUGCG	CGCACUUGU- CUUAGCAGUU	-	-
30	Redd30	h	CDS	213	ACGACGACGA- GAAGCGGUC	GACCGCUUCUC- GUCGUCGU	-	-
31	Redd31	h	CDS	393	AAGCCGUGU- CUUCCUCCGG	CGCACUUGU- CUUAGCAGUU	-	-
32	Redd32	h	CDS	453	AGUGOOCAUC- CUCAGGGUC	GACCCUGAG- GAUGAACACU	-	-
33	Redd33	h	CDS	521	AGGGGUGCGA- GAGCCAGC	GCUGGGCUCUC- GACGCCCU	-	-
34	Redd34	hr	CDS	535	AUCAG- CAGGCGCG- CAGGGC	GCCCUGCGCGC- CUGCUGAU	-	-
35	Redd35	h	CDS	571	AGUUCUUUGCC- CACCCGGC	GCCAGGUGGG- CAAAGAACU	-	-
36	Redd36	h	CDS	597	ACGGCUCCCU- GUAGGCCAG	CUGGCCUA- CAGCGAGCCGU	-	-

37	Redd37	h	CDS	625	ACGUCCAG- CAGGCCCCCCC	GGGGGGGCGUC- CUGGACGU	-	-
38	Redd38	h	CDS	829	AUGACUOGGA- AGCCAGUGC	GCACUGG- CUUCCGAGUCAU	-	-
39	Redd39	h	3' UT R	1046	AACUCAAU- GAGCCDCUGG	CCAGGAAGCU- CAUUGAGUU	++	++
40	REDD40	h	3' UT R	1539	CUCAACUCUG- CAGUACACG	CGUGUACUGCA- GAGUUGAG	+	+
41	Redd41	h	3' UT R	1317	AGAUACACAA- ACCACCUCC	GGAGGUGGUUU- GUGUAUCU	+	+
42	Redd42	h	3' UT R	1350	ACAACAAACA- CACUUGGUC	GACCAAGUGU- GUUGUUGU	++	++
43	Redd43	hmr	CDS	473	CUGCAUCAG- GUUGGCACAC	GUGUGCCAAC- CUGADGCAG	+	+
44	REDD44	h	3' UT R	955	UCCUGCCUCUA- GUCUCCAC	GUGGAGACUA- GAGGCAOGA	+	+
45	Redd45	hmr	CDS	476	CAGCUGCAU- CAGGUUGGCA	UGCCAACCU- GAUGCAGCUG	-	-
46	Redd46	hmr	CDS	479	CAGCAGCUG- CAUCAGGUCC	CAACCUGAUG- CAGCUGCDG	-	-
47	Redd47	hmr	CDS	483	CCUGCAGCAG- CUGCAUCAG	CUGAUGCAG- CUGCUGCAGG	-	-
48	Redd48	hmr	CDS	485	CUCCUGCAG- CAGCUGCAUC	GAUGCAGCUG- CUGCAGGAG	-	-
49	REDD40, 1	h	3' UT R	1536	AACUCUGCA- GUACACGAUG	CAUUGUGUA- CUGCACAGUU	++	++
50	REDD44, 1	h	3' UT R	954	CCUGCCUCUA- GUCUCCACC	GGUGCAGACTA- GAGGCAGG	++	++

Note que, na tabela A anterior, as fitas sentido de RNAsi 1-50 têm SEQ ID NOS: 3-52 respectivamente, e as fitas anti-sentido de RNAsi 1-50 têm SEQ ID NOS: 53-102, respectivamente. A molécula designada REDD14 tem SEQ ID Nos 165 (Fita sentido) e 66 (fita anti-sentido).

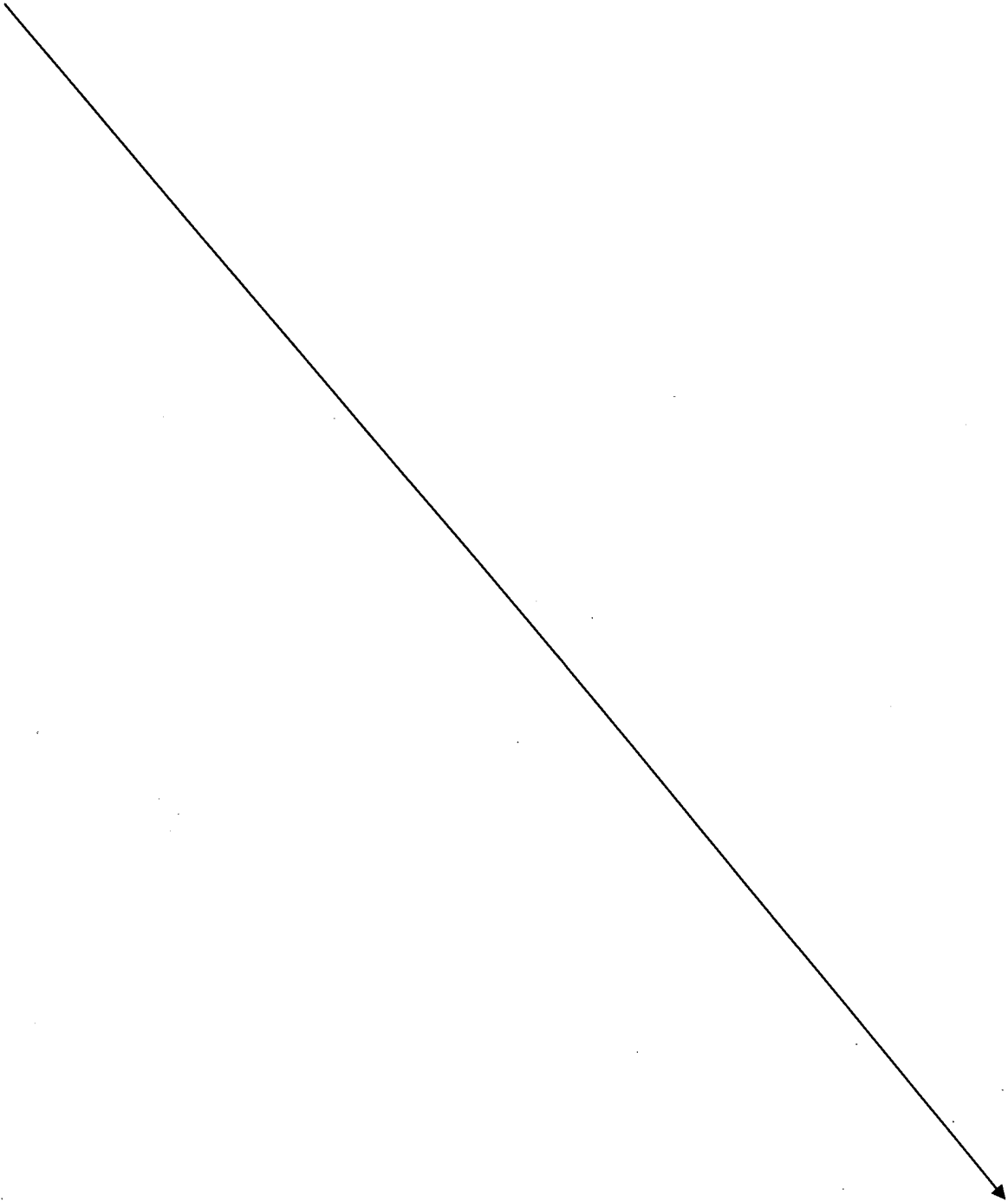


Tabela B

Nº	Fonte	comprimento do oligo	RNA <i>si</i> sentido	RNA <i>si</i> anti- sentido	Gi9506686ref NM_019058.1 (Homo sapiens)	Gi21312867re fNM_029083.1 (Camundongo)	Gi18376838ref NM_080909.1 (Rato)	sobreposição com pet-1 (an- ti-sentido)
51	Humano	19	CUAGCCAGUUG- GUAAGCCA	UGGCUUAC- CAACUGGCUAG	[556-574]	-	-	-
52	Humano	19	UGAUUCCAGUG- GUUGAAA	UUUCCAACCA- CUGGAUCA	(984-1002]	-	-	-
53	Humano	19	CCAGUGGUUG- GAAACUGA	UCAGUUUUC- CAACACUGG	[989-1007]	-	-	-
54	Humano	19	GCUCCGAGU- CAUCAAGAA	UCCUUGAU- GACUGGGAAGC	[835-853]	[763-781]	-	-
55	Humano	19	GGAAGCU- CAUGAGUUGUG	CACAACUCAAU- GAGCUOCC	(1049-1067]	-	-	-
56	Humano, cino- molgosus	19	CCAU- CUGGGUCUUC- CAUCU	AGAUGGAA- GACCCAGAUGG	(1613-1631]	[1569-1583]	[1610-1624]	+
57	Humano, cino-	19	GGAU-	ACAUGCUACACA-	[1152-1170]	-	-	-

64	Humano, cino- molgosus	19	GGACA- CAOACCCCU- CAGUA	UACUGAGGGUAU GUGUCC	[1088-1106]	-	-	-
65	Humano, cino- molgosus	19	GGAUUUUGACAC UUGAAA	UUUCAAGUGU- CAAAGAUC	[1483-1501]	[1424-1442]	-	-
66	Humano, cino- molgosus	19	GUAGCAU- GUACCUUAUUAU	AUAUAUAGGUA- CAUGCUAC	[1162-1180]	[1112-1128]	-	-
67	Humano, cino- molgosus	19	UCAGUACUGUAG- CAUGGAA	UUCCAUGCUA- CAGUACUGA	[1101-11191]	-	[1091-1106]	-
68	Humano, cino- molgosus	19	UGUGUAGCAU- GUACCUUAU	AUAAGGUACAUG- CUACACA	[1159-1177]	[1111-1127]	[1151-1167]	-
69	Humano, cino- molgosus	19	CUGGAU- GUGUGUGUAGCAU	AUGCUACACACA- CAUCCAG	[1150-1168]	-	-	-
70	Humano, cino- molgosus, Ca- mundongo	19	ACACUUGAUGUU- CAAGUAU	AUACUUGAACAU- CAAGUGU	[1674-1692]	[1622-1640]		+

71	Humano, cino- molgosus, Ca- mundongo	19	GCAUGAUGUAA- GAGUAGG	CCUACUCUUA- CAUUC AUGC	[1438-1456]	[1379-1397]		-
72	Humano, cino- molgosus, Ca- mundongo	19	ACCAGCAACA- GUGGCUUG	CGAAGCCACU- GUUGCDGCU	[372-390]	[300-3181]		-
73	Humano, cino- molgosus, Ca- mundongo	19	AUGAUGUAAGA- GUAGCAA	UCCUACUCUUA- CAUUC AU	[1440-1458]	[1381-1399]	-	-
74	Humano, cino- molgosus, Ca- mundongo	19	CAGCAGCAACA- GOGGCUUC	GAAGCCACU- GUGGCUUG	[371-389]	[299-317]	-	-
75	Humano, cino- molgosus, Ca- mundongo	19	CAUGAUGUAA- GAGUAGGA	UCCUACUCUUA- CAUUC AUG	[1439-1457]	[1380-1398]		-
76	Humano, cino- molgosus, Ca- mundongo	19	GAUGUCAA- GUAUUAAGAC	GUCUUAUACUU- GAACAUC	[1680-1698]	[1628-1646]		+

77	Humano, cino- molgosus, Ca- mundongo, Rato	19	UGAUGCAGCUG- CUGCAGGA	UCCUGCAGCAG- CUGCAUCA	[484-502]	[412-4303]	[465-483]	-
78	Humano, cino- molgosus, Ca- mundongo, rt	19	GAAUACACUU- GAUGUUCAA	UUGAACAUCAA- GUGUAUUC	[1670-1688]	[1618-1636]		+
79	Humano, Camun- dongo, Rato cynoeoligus,	19	UGAAUACACUU- CAUCUUCA	UGAACAUCAAGU- GUAUUA	[1669-1687]	[1617-1635]	[1657-1675]	+
80	Humano, cino- molgosus, Ca- mundongo, Rato	19	AUACACUUGAU- GUUCAAGU	ACUUGAACAUCA- AGUGUAU	[1672-1690]	[1620-1638]	[1660-1678]	+
81	Humano, cino- molgosus, Ca- mundongo, Rato	19	CAUGAAUACA- CUUGAUGUU	AACAUCAAGU- GUAUUAUG	[1661-1685]	[1615-1633]	[1655-1673]	+
82	Humano, cino- molgosus, Ca- mundongo, Rato	19	CUGGACAGCAG- CAACAGUG	CACUGUUCUG- CUGUCCAG	[366-384]	[294-312]	[347-365]	-

83	Humano, cino- molgosus, Ca- mundongo, Rato	19	GUUCAUGAAUA- CACUUGAU	AUCAAGUGUAU- CAUGAAC	[1664-1682]	[1612-1630]	1652-1670	+
84	Humano, cino- molgosus, Ca- mundongo, Rato	19	UCAUGAAUACA- CUUGAUGU	ACAUCAAGU- GUUAUCAUGA	[1666-1684]	[1614-1632]	[1654-1672]	-
85	Humano, cino- molgosus, Ca- mundongo, Rato	19	UGGACAGCAGCA- ACAGUGG	CCACUGUUGCUG- CUGUCCA	[367-385]	[295-313]	[348-366]	-
86	Humano, cino- molgosus, Ca- mundongo, Rato	19	UGUGUGCCAAC- CUGAUGCA	UGCAUCAG- GUUGGCACACA	[472-490]	[400-418]	[453-471]	-
87	Humano, cino- molgosus, Ca- mundongo, Rato	19	UUCAUGAAUACA- CUUGAUG	CAUCAAGU- GUUAUCAUGAA	[1665-4683]	[1613-1631]	[1653-1671]	+
88	Humano, cino- molgosus, Ca- mundongo, Rato	19	AACCUGAUGCAG- CUGCUGC	GCAGCAGCUG- CAUCAGGUU	[480-498]	[408-426]	[451-479]	-

89	Humano, cino- molgosus, Ca- mundongo, Rato	19	AGUCCUUGGA- CAGCAGCAA	UUGCUGCUGUC- CAGGGACU	[361-379]	[289-307]	[342-360]	-
90	Humano, cino- molgosus, Ca- mundongo, Rato	19	CCUUCAGUACU- GUAGCAUG	CAUGCUACAGUA- CUGAGGG	[1098-1116]	[1046-1066]	11088-1106]	-
91	Humano, cino- molgosus, Ca- mundongo, Rato	19	CCUGGACAGCAG- CAACAGU	ACUGUUGCUGCU- GUCCAGG	[365-383]	[293-311]	[346364]	-
92	Humano, cino- molgosus, Ca- mundongo, Rato	19	UGUGCCACACU- GAUGCAGC	GCUGCAUCAG- GUUGGCACA	[474-492]	[402-420]	[455-473]	-
93	Humano, cino- molgosus, Ca- mundongo, Rato	19	AAUACACUUGAU- GUUCAAG	CUUGAACAUCAA- GUGUAUU	[1671-1689]	[1619-16371]	[1659-1677]	+
94	Humano, cino- molgosus, Ca- mundongo, Rato	29	AUGAAUACACUU- GAUGUUC	GAACAUCAGU- GUAUUCAU	11666-1686]	[1616-16341]	[1656-1674]	-

95	Humano, cino- molgosus, Rato	19	UGAUGCAGCUG- CUGCAGGA	UCCUGCAGCAG- CUUGCAUCA	[484-502]		[465-483]	+	
96	Humano, cino- molgosus, Rato	19	AGAACUGUUUA- CAUCAAGA	UCUUC AUGUAAA- CAGUUCU	[1632-1650]		[1625-1643]	+	
97	Humano, cino- molgosus, Rato	29	AUCUAGAACU- GUUUACAUG	CAUGUAAACA- GUUCUAGAU	[1628-1646]		[1622-1639]	+	
98	Humano, cino- molgosus, Rato	19	CCAGCCUAGC- CUUUCGGA	UCCCAAAGGCU- AGGCAUGG	[196-214]		[186-2043]	-	
99	Humano, cino- molgosus, Rato	29	CUAGAACUGUUU- ACAUGAA	UUC AUGUAAACA- GUUCUAG	[1630-1648]		[1623-1641]	+	
100	Humano, cino- molgosus, Rato	19	CAACUGUUUA- CAUGAAGAU	AUCUUC AUGUAA- ACAGUUC	[1633-1651]		[1626-1644]	+	
101	Humano, cino- molgosus, Rato	19	GGUUCUCCAUUC- AGAACUG	CAGUUCUAGAU- GAAGACC	[1620-1638]		[1613-1631]	+	
102	Humano, cino- molgosus, Rato	29	CCAUCUAGAACU- GUUUACA	UGUAAACAGUU- CUAGAUGG	[1626-1644]		[1619-1637]	+	
103	Humano, cino- molgosus, Rato	19	CUUCCAUCUAGA- ACUGUUU	AAACAGUUCUA- GAUGGAAG	[1623-1641]		[1616-1634]	+	

104	Humano, cino- molgosus, Rato	19	UAGAACUGUUA- CAUGAG	CUUCAUGUAAA- CAGUUCUA	[1631-1649]		[1624-1642]	+	
105	Humano, cino- molgosus, Rato	19	UCUCCAUUA- GAACUGU	AACAGUUCUA- GAUGGAAGA	[1622-1640]		[1615-1633]	+	
106	Humano, cino- molgosus, Rato	19	CAUCUAGAACU- GUUUACAU	AUGUAAACAGUU- CUAGAUG	[1627-1645]		[1620-1638]	+	
107	Humano, cino- molgosus, Rato	19	GGGUCUCCAU- CUAGAACU	AGUUCUAGAUG- GAAGACCC	[1619-1637]		[1612-1630]	+	
108	Humano, cino- molgosus, Rato	19	UCCAUCUAGAA- CUGUUUAC	GUAAACAGUUCU- AGAUGA	[1625-1643]		[1628-1636]	+	
109	Humano, cino- molgosus, Rato	19	UCUAGAACU- GUUUACAUGA	UCAUGUAAACA- GUUCUAGA	[1629-1647]		[1622-1640]	+	
110	Humano, cino- molgosus, Rato	19	UCCAUCUAGAA- CUGUUUA	UAAACAGUUCUA- GAUGGA	[1624]-2642]		[1617-1635]	+	
111	Humano, cino- molgosus, Rato	19	GUCUCCAUUA- GAACUGU	ACAGUUCUA- GAUGGAAGAC	[1621-1639]		[1614-1632]	+	
112	Humano, Camun- dongo	19	CAAGUAUUA- GACCUAUGC	GCAUAGGUUCUA- AUACUUG	[1686-1704]	[1634-1652]		+	

113	Humano, Camun- dongo	19	GUUUUAAGACCU- AUGCAU	AUUGCAUAGGUC- CUUAAUAC	[1689-1707]	[1637-16551]		+
114	Humano, Camun- dongo	19	AGUUUAAGAC- CUAUGCAA	UUGCAUAGGU- CUUAAUACU	[1686-1706]	[1636-3654]		+
115	Humano, Camun- dongo	19	AUGUUCAA- GUUUUAAGACC	GGUUUAUA- CUUCAACAU	[1681-1699]	[1629-1647]		+
116	Humano, Camun- dongo	19	CACUUGAUGJU- CAAGUAUU	AAUACUUGAA- CAUCAAGUG	[1675-1693]	[1623-16413]		+
117	Humano, Camun- dongo	19	CCAAGAU- CAGGGCUGUU	AACAGCCCCUG- GAUCUUGG	[757-775]	[685703]		-
118	Humano, Camun- dongo	19	GUUCAAGUAUA- AGACCUA	UAGGUCUUAUA- CUUGAAC	[1683-1701]	[1631-1649]		+
119	Humano, Camun- dongo	19	UCAAGUAUUA- GACCUAUG	CAUAGGUCUAA- MUACUUGA	[1685-1703]	[1633-16511]		+
120	Humano, Camun- dongo	19	AAGUAUAAGAC- CUAUGCA	UGCAUAGGUCUU- AAUACUU	[1687-1705]	[1635-1653]		++
121	Humano, Camun- dongo	19	UGUUCAGUAUU- AAGACCU	AGGUCUUAUA- CUUGAACA	[1682-1700]	[1630-1648]		+

122	Humano, Camundongo, Rato	19	UGGUCUUCU- CUAGAAC	GUUCUAGAUGGA- AGACCCA	[1618-16361]	[1570-1588]	[1611-1629]	+

Note que, na tabela B anterior, as fitas sentido de RNAsi 51-122 têm SEQ ID NOS: 103-174 respectivamente, e as fitas anti-sentido de RNAsi 51-122 têm SEQ ID NOS: 175-246 respectivamente.

Tabela C

123	Humano	21	CCAGGAGCO- CAUUGAGUUG	ACAACUCAAU- GAGCUUCCUUG	[1046-1066]	-	-	-
124	Humano	21	CCAUCUGGGU- CUUCCAUCUAG	CUAGAUGGAA- GACCCAGAUGG	[1623-2633]	[1569-1585]	[1610-1626]	+
125	Humano	21	GGAUGUGUGU- GUAGCAUGUAC	GUACAUGCUACA- CACACAUC	[1152-1172]	[2102-1122]	[1142-1161]	-
126	Humano	21	CAAGUGUGUUU- GUUGUUGUU	AACAACACAA- ACACUUG	[1353-1373]	-	-	-
127	Humano	21	CCUCAGUACU- GUAGCAUGGAA	UUCUAGCUACA- GUACUGAGG	[1099-1119]	[2049-1066]	[1089-4206]	-
128	Humano	21	GACCAAGUGU- GUUGUGUUU	AAACAACAACA- CACUUGUC	[1350-1370]	-	-	-
129	Humano	23	CCUCCCAUCAU- -	UUCUUGAUGA- -	[835-855]	[763-783]	-	-

[illegible]

138	Humano, cino- molgosus	21	GGUUUCCAUCU- ACAACUGUU	AACAGUUA- GAUGAAGAAC	[1620-1640]	[1572-1588]	[1613-1633]	+	
139	Humano, cino- molgosus	22	UGUGUAGCAU- GUACCUUAUA	UAUAUAGGUA- CAUGOACACA	[1159-1179]	[1111-1126]	[1151-1169]	-	
140	Humano, cino- molgosus	21	CAACAAGGCUUC- CAGCUGAU	AUCCAGCUGGA- AGCCUUGUG	[1235-1155]	-		-	
141	Humano, cino- molgosus	21	CACUUGGAU- CUUGACACUU	AAGUGUAAA- GAUCCCAAGUG	[1477-1497]	-	-	-	
142	Humano, cino- molgosus	21	CAUCACUACU- GAOCUGUGUA	UACACAGGUA- GUAGUGAUG	[1399-1419]	[1341-1356]	[1383-1398]	-	
143	Humano, cino- molgosus	21	GUGUGUGUAG- CAUGUACCUUA	UAAGGUACAUG- CUACACACAC	[1256-1176]	[1106-1126]	[1146-1166]	-	
144	Humano, cino- molgosus, Ca- mundongo	21	GCAUGAUGUA- GAGUAGGA	UUCCUACUUA- CAUUAUGC	[1438-1458]	[1379-1399]		-	
145	Humano, cino- molgosus, Ca-	21	GACAGAGCAA- CAGGCUUC	GAAGCACU- GUUGUGUGUC	[369-389]	[297-317]		-	

[illegible]

	molgosus, Rato		GUUACAUGA	GUUCUAGAUG					
160	Humano, cino-	21	GGEUCUUCU- CUAGACUGU	ACAGUUUA- GAUGGAGACOC	[1619-1639]		[1612-1632]	+	
161	Humano, cino-	21	UCCUUCUAGAA- CUGUUUACAU	AUGUAAACAGUU- CUAGUUGA	[1625-1645]		[1618-1638]	+	
162	Humano, cino-	21	UCUAGACU- GUUACAUGAAG	CUUCUAGUAAA- CAGUUUUGA	[1629-1649]		[1622-1642]	+	
163	Humano, cino-	21	UUCCUUCUAGAA- CUGUUUACA	UGUAAACAGUU- CUAGUUGAA	[1624-1644]		[1617-1637]	+	
164	Humano, cino-	21	GUUUUCCAUCUA- GAUCUGUUU	AAACAGUUCUA- GAUGGAGAC	[1621-1641]		[1614-1634]	+	
165	Humano, Camun- dongo	21	UGAUGUCAA- GUUUAAGAC	GEUCUUUAUA- CUUGAACAUCA	[1679-1699]	[1627-1647]		+	
166	Humano, Camun- dongo	21	GUUCAAGUAUA- AGACUUG	CAUAGGUCUA- AUACUUGAC	[1683-1703]	[1631-1651]		+	
167	Humano, Camun- dongo	21	UCAAGUAUA- GACCUUGCA	GGGAAGGUUU- AAUACUUGA	[1685-1705]	[1633-1653]		+	
168	Humano, Camun-	21	GAUGUCAA-	AGGUUUUAUA-	[1680-1100]	11628-1648]		+	

	dongo			GUUUUAGACCU	CUUGAACAU				
169	Humano, Camun- dongo	21		UUCACUAUUA- GAACUAGC	GCAUAGGUUA- AUACUUGAA	[1664-1704]	[1632-1652]		+
170	Humano, Rato	21		CUGGGUUC- CAUCUAGAUCU	AGUUCUAGAUG- GAAGAACAG	[1611-1631]		[1610-1630]	+
171	Humano, Rato	21		UGGGUGUCCAU- CUAGACUG	CAGUUCUAGAUG- GAAGACCA	[1618-1638]		[1611-1631]	+

Note que, na tabela C anterior, as fitas sentido de RNAsi 123-171 têm SEQ ID NOS: 247-295 respectivamente, e as fitas anti-sentido de RNAsi 123-171 têm SEQ ID NOS: 296-344 respectivamente.

Tabela d

Nº	Fonte	RNAsi sentido	RNAsi anti-sentido	Humano 801 Gi-56676369	Camundongo 801 Gi-21312867	Rato 801 Gi-18376838	Chipanzé 801 Gi-55633956	Cincomolgos 801
172	Humam	UGAAAAAUUA- CACUUGCA	UGCCAGGUGUA- AUUUUCA	[1502-1520] [19/19]	[1444-1457] [14/14]	--	-	[1331-1349] (18/19) -
173	Humano	GACACUUGAA- AAAUACAC	GUGUAUUUUU- CAAGUGUC	[1496-1514] [19/19]	[1432-1442] [11/11]	--	-	[1329-1347] [18/19]
174	Humano	CACUUGAAAA-	AGGUGUA-	[1498-1516]	[1444-1455]	--	-	[1331-1349]

			AUUACAACU	AUUUUUCAAGUG	[19/19]	[12/12]				
175	Humano		UUAGGGGCCA- ACAAGGCUU	AAGCCUU- GUUGGCCCCUAA	[1132-1150] [19/19]	-	-	-	[974-992] [18/19]	
176	Humano		ACACUUGAAA- AUUACAAC	GGUGUAAUUUUU- CAAGUGU	[1497-1515] [19/19]	[1444-1454] [11/11]	-	-	[1330-1348] [18/19]	
177	Humano		ACCCUGAG- GAUGAACACUU	AAGUGUUAUC- CUCAGGGU	[459-477] [19/19]	-	-	[404-420] [17/17]	[301-317] [17/17]	
178	Humano		GUACUGCAGA- GUUGAGCUG	CAGCUCAAAU- CUGCAGUAC	[1547-1565] [19/19]	-	-	-	[1388-1398] (11/11)	
179	Humano		GUGUACUGCA- GAGUUGAGC	GCUCAACUCUG- CAGUACAC	[1545-1563] (19/19)	-	-	-	-	
180	Humano		GUGUGUUU- GUUGUUUGUUU	AAACAACAACA- AACACAC	[1361-1379] [19/19]	-	-	-	[1195-1206] [12/12]	
181	Humano		UUGUGUGCCA- ACCUGAUC	GCAUCAGGUUGG- CACACAA	[476-494] [19/19]	[400-417] [18/18]	[453-470] [18/18]	[422-439] [18/18]	[319-336] [18/18]	
182	Humano		AUCUGUGUA- CUGCAGAGUUG	CAACUCUGCA- GUACACGAU	[1542-1560] [19/19]	-	-	-	-	
183	Humano		CCAUCUGUGUA- ACUCUGCAGUA-	ACUCUGCAGUA- ACUCUGCAGUA-	[1540-1558]	-	-	-	-	

		CUGCAGAGU	CACGAUGG	[19/19]					
184	Humano	ACUUGAAAA-	CAGGUGUA-	[1499-1517]	[1444-1456]	-	-	-	
		AUUACACCUG	AUUUUCAGU	[19/19]	[13/13]				
185	Humano	UGAGGAUGAA-	ACACAAGUGUU-	[463-481]	-	-	[408-426]	[18/19] [305-323] [18/19]	
		CACUUGUGU	CAUCCUCA	[19/19]					
186	Humano	ACCUGGCAG-	UUAAAGCAG-	[1513-1531]	-	-	-	-	
		CUGGUGUUAA	CUGCCAGGU	[19/19]					
187	Humano	CAGAGACGA-	AAAGUUCAGUUC-	[938-956]	-	-	-	-	
		CUGAACUUUU	GUCUCUG	[19/19]					
188	Humano	AAGACAGA-	GUUCAGUGUCU-	[934-952]	-	-	-	-	
		GAGCAGUGAAC	CUGUCUU	[19/19]					
189	Humano	GCAGCUGC-	AAGGCUUAAACG-	[1518-1536]	-	-	-	-	
		GUUUAAGCCUU	CAGCUGC	(19/19)					
190	Humano	AGGAAGCU-	ACAACUCAAU-	[1053-1071]	-	-	-	[895-913]	
		CAUUGAGUUGU	GAGCUUUCU	(19/19)				[18/19]	
191	Humano	GUGUUUCC-	UGAGCUUCCUGG-	[1044-1062]	-	-	-	[886-900]	
		CAGGAAGCUCA	GAAACAC	(19/19)				(15/15)	

192	Humano	GACGACUGAA- CUUUGGG	CCCCAAAAGUU- CAGUCGUC	[942-960] [19/19]	-	-	-	-	[789-802] (14/14)
193	Humano	ACAGAGAAGA- CUGAACUUU	AAAGUUCAGUC- GUCUCUGU	[937-955] [19/19]	-	-	-	-	-
194	Humano	AGGAUGAACA- CUUGUGGC	GCACACAAGU- GUUCAUCCU	[465-483] [19/19]	-	-	-	[410-428] (18/19)	[307-325] [18/19]
195	Humano	CUGAGGAUGA- ACACUUGUG	CACAAGUGUU- CAUCCUCAG	[462-480] [19/19]	-	-	-	[407-425] [18/19]	[304-322] [18/19]
196	Humano	UCUGGGU- CUUCCAUCUA- GA	UCUAGAUGGAA- GACUCAGA	[1621-1639] [19/19]	[1569-1586] [18/18]	[1610-1627] [18/18]	-	-	[1456-1471] [16/16]
197	Humano	AUCUGGU- CUUCCAUCUAG	CUAGAUGGAAGA- CUCAGAU	[1620-1638] [1.9/19]	[1569-1585] [17/17]	[1610-1626] [17/17]	-	-	[1456-1470] [15/15]
198	Humano	GAAGGGACCA- AGUGUGUUU	AAACACACUUG- GUCCUUC	[1350-1368] [19/19]	-	-	-	-	[1181-1198] [18/18]
199	Humano	AAGGCUU- AGGGGCCAA- CAA	UUGUUGGCCCCU- AAGCCUU	[1127-1145] [19/19]	-	-	-	-	[969-994] [16/16]

200	Humano	UUCUAGGA- AGCUAUUGA	UCAAUGAGCUUC- CUGGAA	[1048-1066] [19/19]	-	-	-	[890-908] [18/19]
201	Humano, Chim- panzé	UGGCAAGA- ACUACUGG	CGCAGUAGUU- CUUUGCCCA	[592-600] [19/19]	-	-	[527-545] [19/19]	[424-439] [16/16]
202	Humano, Chim- panzé	GGUGGCAAA- GAACUACUG	CAGUAGUU- CUUUGCCCAAC	[580-598] [19/19]	-	-	[525-543] [19/19]	[422-439] [18/18]
203	Humano, Chim- panzé	GUGGCAAA- GAACUACUGC	GCAGUAGUU- CUUUGCCCAAC	[581-599] [19/19]	-	-	[526-544] [19/19]	[423-439] [17/17]
204	Humano, Chim- panzé	UGCCUAGCCA- GUUGGUAAG	CUUACCAACUGG- CUAGGA	[558-576] [19/19]	-	-	[503-521] [19/19]	-
205	Humano, Chim- panzé	AAGCCAG- GUGGCAAA- GAA	UUCUUUGCCCAAC- CUGGCUU	[574-592] [19/19]	[498-511] [14/14]	[551-564] [14/14]	[519-537] [19/19]	[417-434] [18/18]
206	Humano, Chim- panzé	AUGCCUAGC- CAGUUGGUAA	UUACCAACUGG- CUAGGCAU	[557-575] [19/19]	-	-	[502-520] [19/19]	-
207	Humano, Chim- panzé	UUCCGAGU- CAUCAAGAAGA	UCUUCUUGCAUGA- CUGGAA	[842-860] [19/19]	[769-783] [15/15]	-	[781-805] [19/19]	[687-702] [16/16]
208	Humano, Cino-	GACCAUGA-	ACUCUUACAUAU-	[1440-1456]	[1379-1394]	[1421-1434]	-	[1273-1291]

	molgos	AUGUAAGAGU	CAUGCGUC	[19/19]	[16/16]	[14/14]		[19/19]
209	Humano, Cino-	UACAGAAG-	UUAUAUUAUGC-	[1436-1454]	[1379-1390]	[1421-1432]	-	[1269-1287]
	molgos	CAUGAAGUAA	GUCUGUA	[19/19]	[12/12]	[12/12]		[19/19]
210	Humano, Cino-	GUGUGUAG-	UAAGGUACAUG-	[1163-1181]	[1111-1126]	[1151-1166]	-	[1005-1023]
	molgos	CAUGUACCUUA	CUACACAC	[19/19]	[16/16]	[15/16]		[19/19]
211	Humano, Cino-	ACGCAUGAAU-	UACUCUUAUAU-	[1441-1459]	[1379-1395]	[1421-434]	-	[1274-1292]
	molgos	GUAAGAGUA	CAUGCGU	[19/19]	[17/17]	[14/14]		[19/19]
212	Humano, Cino-	AUCUUAAC-	AUUAUGGUGUCU-	[1432-1450]	[1367-1386]	[1409-1428]	-	[1265-1293]
	molgos	GACCAUGAAU	GUAAGAU	[19/19]	[19/20]	[19/20]		[19/19]
213	Humano, Cino-	AGAGGCAUGA-	CUCUUAUAU-	[1439-1457]	[1379-1393]	[1421-1434]	-	[1272-1290]
	molgos	AUGUAAGAG	CAUGCGUCU	[19/19]	[15/15]	[14/14]		[19/19]
214	Humano, Cino-	CUAUCUUAACA-	UCAUGGUGUCU-	[1430-1448]	[1365-1377]	[1407-1419]	-	[1263-1291]
	molgos	GACGCAUGA	GUAAGAUAG	[19/19]	[13/13]	[13/13]		[19/19]
215	Humano, Cino-	GCAUCACUA-	AACAGGUCAGUA-	[1403-1421]	[1341-1356]	[1393-1398]	-	[1236-1254]
	molgos	CUGACCUGUU	GUGAUGC	[19/19]	[16/16]	[16/16]		[19/19]
216	Humano, Cino-	GCAGCAUCA-	AGGUCAGUAGU-	[1400-1418]	[1341-1353]	[1377-1395]	-	[1233-1251]
	molgos	CUACUGACCU	GAUGCUCC	[19/19]	[13/13]	[18/19]		[19/19]
217	Humano, Cino-	AUGAAACAA-	CCCUAAGCCUUU-	[1119-	[1064-1081]	[1104-1119]	-	[961-979]

	molgos	AGCCUUAACGG	GUUUCAU	1137] [19/19]	[18/18]	[15/15]		[19/19]
218	Humano, Cino- molgos	AGCUAUCUUA- CAGAGGCAU	AUGGUCUGUAA- GAUAGCU	[1428-1446] [19/19]	[1363-1371] [15/15]	[1405- 419] [15/15]	-	[1261-1279] [19/19]
219	Humano, Cino- molgos	UAGGCAGCU- AUCUUAACAGA	UCUGUAGAUA- CUGOCUA	[1423- 1441] [19/19]	[1359-1376] [18/18]	[1401-1418] [18/18]	-	[1256- 1274] [19/19]
220	Humano, Cino- molgos	ACCUGUU- GUAGGCAGCU- AU	AUAGCUGCCUA- CAACAGGU	[1415-1433] [19/19]	-	-	-	[1248-1266] [19/19]
221	Humano, Cino- molgos	AGCAUCACUA- CUGACCUGU	ACAGGUCAGUA- GUGAUGCU	[1402-1420] [19/19]	[1341-1355] [15/15]	[1393-1397] [15/15]	-	[1235-12531] [19/19]
222	Humano, Cino- molgos	UCUGAUOG- GAGCAUCACUA	UAGUGAUGCUCC- GAUCAGA	[1393-1411] [19/19]	-	-	-	[1226-1244] [19/19]
223	Humano, Cino- molgos	UGACAGUUA- CAGUGGUGU	ACACCACUGUUA- ACUGUCA	[1195-1213] [19/19]	-	-	-	[1037-10551] [19/19]
224	Humano, Cino- molgos	CUGACAGUUA- ACAGUGGUG	CACCACUGUUA- CUGUCAG	[1194-1212] [19/19]	-	-	-	[1036-10541] [19/19]
225	Humano, Cino- molgos	GUUACUGACA- GUUAACAGU	ACUGUUAACUGU- CAGUAAC	[1190-1209] [19/19]	-	-	-	[1032-1050] [19/19]

226	Humano, Cino- molgos	UUGUACUGA- CAGUAA	UGUACUGUCA- GUAACA	[1188-1206] [19/19]	-	-	-	[1030-1048] [19/19]
227	Humano, Cino- molgos	UACUCACU- GUUCAUGAAUA	UAUCAUGAACA- GUGAGUA	[1661-1619] [19/19]	[1612-1622] [11/11]	[1644-16621] [18/19]	-	[14931511] [19/19]
228	Humano, Cino- molgos	UCACUUGG- GAUCUUUGACA	UGUCAAAGAUCC- CAAGUGA	[1481-1499] [19/19]	-	-	-	[1314-13321] [19/19]
229	Humano, Cino- molgos	ACAGACGCAU- GAUGUAAG	CUUACAUU- CAUGGUGUGU	[1437-1455] [19/19]	[1379-1391] [13/13]	[1421-1433] [13/13]	-	[1270-1288] [19/19]
230	Humano, Cino- molgos	CAGCAUCUU- ACAGACGCA	UGGUCUGUAA- GAUAGCUG	[1427-1445] [19/19]	[1362-1377] [16/16]	[1404-1419] [16/16]	-	[1260-1278] [19/19]
231	Humano, Cino- molgos	UCACUACU- GACCUGUUGUA	UACAACAGGUCA- GUAGUGA	[1406-1424] [19/19]	[1341-1356] [16/16]	[1383-1398] [16/16]	-	[1239-1251] [19/19]
232	Humano, Cino- molgos	GAGCAUCACU- ACUGACCUG	CAGGUCAGUAGU- GAUGCUC	[1401-1419] [19/19]	[1341-1354] [14/14]	[1378-1396] [18/19]	-	[1234-1252] [19/19]
234	Humano, Cino- molgos	GUGUACUU- ACUGGUCUGA	UCAGACCAGUAA- GAUACAC	[1333-1351] [19/19]	-	-	-	[1164-1182] [19/19]
235	Humano, Cino- molgos	GUGGUUGU- GUACUUUACU	AGUAGAUACA- CAAACAC	[1326-1344] [19/19]	[1256-1268] [13/13]	-	-	[1157-1175] [19/19]

236	Humano, Cino- molgos	ACAGUUAACA- GUGUGUGA	UCACACCACU- GUUACUGU	[1197-1215] [19/19]	-	-	-	[1039-1057] [19/19]
237	Humano, Cino- molgos	AACUGAGG- CAGCCACCUAA	UUAGGUGGUGC- CUCAGUU	[1007-1025] [19/19]	-	-	-	[849-867] [19/19]
238	Humano, Cino- molgos	UGUUCAUGA- AUACACUUGA	UCAAGUGUAUU- CAUGAACA	[1668-1686] [19/19]	[1612-1629] [18/18]	[1652-1669] [18/18]	-	[1500-1518] [19/19]
239	Humano, Cino- molgos	CUGUUCAUGA- AUACACUUG	CAAGUGUAUU- CAUGAACAG	[1667-1685] [19/19]	[1612-1628] [17/17]	[1652-1668] [17/17]	-	[1499-1517] [19/19]
240	Humano, Cino- molgos	AGAUACUCA- CUGUUCAUGA	UCAUGAACACAGU- GAGUAUCU	[1658-1676] [19/19]	-	-	-	[1490-1508] [19/19]
241	Humano, Cino- molgos	CAGAGGCAUG- GAUGUAGA	UCUUAACAUU- CAUGCGUCUG	[1438-1456] [19/19]	[1379-1393] [14/14]	[1421-1434] [14/14]	-	[1271-1289] [19/19]
242	Humano, Cino- molgos	GCAGCUAU- CUUACAGACGC	GGCUCUGUAA- GAUAGCUGC	[1426-1444] [19/19]	[1361-1377] [17/17]	[1403-1419] [17/17]	-	[1259-1277] [19/19]
243	Humano, Cino- molgos	GGCAGCUAU- CUUACAGACG	CGUCUGUAAGAU- AGCUGCC	[1425-1443] [19/19]	[1360-1371] [18/18]	[1402-1419] [18/18]	-	[1258-1276] [19/19]
244	Humano, Cino- molgos	GGUUGU- GUUUCUUA-	CCAGUAGAUAA- CACAAACC	[1328-1346] [19/19]	[1256-1268] [13/13]	-	-	[1159-1177] [19/19]

		CUGG									
245	Humano, Cino- molgos	GAGGUGGUUU- GUGUAUCUU	AAGAUAACAA- ACCACCUC	[1323-1343] [19/19]	[1256-1268] [13/13]	-		-		[1154-1172] [19/19]	
246	Humano, Cino- molgos	GUGGAGGUG- GUUUGUGUAU	AUACACAAAC- CACCUCCAC	[1320-1338] [19/19]	-	-		-		[1151-1169] [19/19]	
247	Humano, Cino- molgos	UACUGACA- GUUACAGUGG	CCACUGUUAACU- GUCAGUA	[1192-1210] [19/19]	-	-		-		[1034-1052] [19/19]	
248	Humano, Cino- molgos	GUGUAGCAU- GUACCUUAUU	AAUAAGGUA- CAUGCUCAC	[1165-1183] [19/19]	[1111-11128] [18/18]	[1151-1168] [17/18]		-		[1007-1025] [19/19]	
249	Humano, Cino- molgos, Chim- panzé	AGGUGGGCAA- AGAACUACU	AGUAGUU- CUUUGCCACCUCU	[579-597] [19/19]	-	-		[524-542] [19/19]		[421-4391] [19/19]	
250	Humano, Cino- molgos, Chim- panzé	GUGACCCU- GAGGAUGAACA	UGUUAUCCU- CAGCGUCAC	[456-474] [19/19]	-	-		[401-419] [19/19]		[298-316] [19/19]	
251	Humano, Cino- molgos, Chim- panzé	CAGGUGGGCA- AAGAACUAC	GUAGUU- CUUUGCCACCUCG	[578-596] [19/19]	[501-517] [16/17]	[554-570] [16/17]		[523-541] [19/19]		[420-438] [19/19]	

252	Humano, Cino- molgos, Chim- panzé	CCAGGUGGG- CAACAACUA	UAGUUCUUUGCC- CACUGG	[571-595] [19/19]	[500-517] [17/18]	[553-570] [17/18]	[522-540] [19/19]	[419437] [19/19]
253	Humano, Cino- molgos, Chim- panzé	AUCCAGGGG- CUGUUUAGCU	AGCUAAA- CAGCCCCGGAU	[767-785] [19/19]	[690- 7031[14/14]	-	[712- 7301[19/19]	[609- 627][19/19]
254	Humano, Cino- molgos, Chim- panzé	AAGAUC- CAGGGGU- GUUUA	UAAACAGGCC- CUGGAUCUU	[764-782] [19/19]	[687-703] [17/17]	[740-756] [16/17]	[709-727] [19/19]	[606-624] [19/19]
255	Humano, Cino- molgos, camun- dongo	GCAUGAAACA- AAGGCUUAG	CUAAGCCUUU- GUUUAUGC	[1117-1135] [19/19]	[1062-1080] [19/19]	[1102-1118] [17/17]	-	[959-977] [19/19]
256	Humano, Cino- molgos, camun- dongo	AGCAUGAAA- CAAAGGCUUA	UAAGCCUUU- GUUUCAGCU	[1116-2134] [19/19]	[1061-1079] [19/19]	[1101-1118] [18/18]	-	[958-976] [19/19]
257 aKa 801	Humano, Cino- molgos, Camun- dongo, Rato	UACOGUAG- CAUGAAACAAA	UUUUCUUDCAUG- CUACAGOA	[1110-1128] [19/19]	[1055-1073] [19/19]	[1095-1113] [19/19]	-	[952-970] [19/19]

	molgos, Camun- dongo, Rato	AACAAAGGC	CAUGCUCACA	[19/19]	[19/19]	[19/19]	[19/19]
264	Humano, Cino- molgos, Camun- dongo, Rato	ACUGUAGCAU- GAAACAAAG	CUUUGUUUAUG- CUACAGU	[1111-1129] [19/19]	[1056-1074] [19/19]	[1096-1114] [19/19]	[953-971] [19/19]
265	Humano, Cino- molgos, Camun- dongo, Rato	CUGUAGCAU- GAAACAAAGG	CCUUUGUUU- CAUGCUCACAG	[1112-1130] [19/19]	[1057-1075] [19/19]	[1097-1115] [19/19]	[954-972] [19/19]
266	Humano, Cino- molgos, Camun- dongo, Rato	AGUACUGUAG- CAUGAAACA	UGUUUAUGCUA- CAGUACU	[1108-1126] [19/19]	[1053-1071] [19/19]	[1093-1111] [19/19]	[950-968] [19/19]
267	Humano, Cino- molgos, Camun- dongo, Rato	CCUCAGUACU- GUAGCAUGA	UCAUGCUCACA- GUACUGAGG	[1104-1122] [19/19]	[1049-1067] [19/19]	[1089-1107] [19/19]	[946-954] [19/19]
268	Humano, Cino- molgos, camun- dongo, Rato	CUCAGUACU- GUACCAUGAA	UUAUGCUCACA- GUACUGAG	[1105-1123] [19/19]	[1050-1068] [19/19]	[1090-1108] [19/19]	[947-965] [19/19]

Note que, na tabela D anterior, as fitas sentido de RNAsi 172-232 e 234-268 têm SEQ ID NOS: 345-440 respectivamente, e as fitas anti-sentido de RNAsi 172-232 e 234-268 têm SEQ ID NOS: 441-536 respectivamente.

Exemplo 10Farmacologia e distribuição de medicamento

As seqüências de nucleotídeo da presente invenção podem ser distribuídas tanto diretamente quanto com vetores virais ou não virais. Quando distribuídas diretamente, as seqüências geralmente tornam-se resistentes à nuclease. Alternativamente, as seqüências podem ser incorporadas nos cassetes ou construções de expressão, de maneira tal que a seqüência seja expressa na célula da maneira aqui discutida a seguir. Geralmente a construção contém seqüência regulatória própria ou promotor para permitir que a seqüência seja expressa na célula alvejada.

Os compostos ou composições farmacêuticas da presente invenção são administrados e dosados de acordo com boa prática médica, levando em consideração a condição clínica do paciente individual, a doença a ser tratada, os sítio e métodos de administração, programa de administração, idade, sexo e peso corporal do paciente e outros fatores conhecidos pelos profissionais médicos.

A "quantidade efetiva" farmaceuticamente aqui com o propósito, é assim determinada por considerações tais como são conhecidas na técnica. A quantidade deve ser efetiva para atingir melhorias incluindo, mas sem limitações, taxa de sobrevivência melhorada ou recuperação mais rápida, ou melhorias ou eliminação de sintomas e outros indicadores selecionados como medidas apropriadas pelos versados na técnica.

O tratamento geralmente tem uma duração proporcional à duração do processo da doença e eficácia do medicamen-

to e a espécie do paciente que está sendo tratado. Pode-se notar que humanos são tratados geralmente mais tempo que os camundongos ou outros animais experimentais aqui exemplificados.

5 Os compostos da presente invenção podem ser administrados por qualquer das vias de administração convencionais. Deve-se notar que o composto pode ser administrado como composto ou como sal farmacologicamente aceitável e pode ser administrado sozinho ou como um ingrediente ativo em
10 combinação com carreadores, solventes, diluentes, excipientes, adjuvantes e veículos farmacologicamente aceitáveis. Os compostos podem ser administrados oralmente, subcutaneamente ou parenteralmente incluindo administração intravenosa, intra-arterial, intramuscular, intraperitoneal e intranasal,
15 bem como técnicas intraqueal e de infusão. São também usados implantes dos compostos. As formas líquidas podem ser preparadas para injeção, o termo incluindo vias de administração subcutânea, transdérmica, intravenosa, intramuscular, intratecal e outras parentais. As composições líquidas incluem
20 soluções aquosas, com e sem co-solventes orgânicos, suspensões aquosas ou oleosas, emulsões com óleos comestíveis, bem como veículos farmacêuticos similares. Além do mais, sob certas circunstâncias, as composições para uso nos tratamentos inéditos da presente invenção podem ser formadas como
25 aerossóis para administração intranasal e semelhante. O paciente em tratamento é um animal de sangue quente e, em particular, mamíferos, incluindo o homem. Os carreadores, solventes, diluentes, excipientes, adjuvantes e veículos farma-

ceuticamente aceitáveis, bem como carreadores de implante, geralmente referem-se a cargas, diluentes ou material de encapsulamento inerte, sólido ou líquido não tóxico que não reagem com os ingredientes ativos da invenção.

5 Quando o composto da presente invenção é administrado parenteralmente, ele é geralmente formulado em uma forma injetável de dosagem de unidade (solução, suspensão, emulsão). As formulações farmacêuticas adequadas para injeção incluem soluções ou dispersões aquosas estéreis e pós
10 estéreis para reconstituição nas soluções ou dispersões injetáveis estéreis. O carreador pode ser um solvente ou um meio de dispersão que contém, por exemplo, água, etanol, poliol (por exemplo, glicerol, propileno glicol, polietileno glicol líquido e similares), misturas adequadas destes e ó-
15 leos vegetais.

Fluidez adequada pode ser mantida, por exemplo, pelo uso de um revestimento tal como lecitina, pela manutenção do tamanho da partícula requerida no caso de dispersão e pelo uso de agentes tensoativos. Veículos não aquosos tais
20 como óleo de semente de algodão, óleo de sésamo, óleo de oliva, óleo de soja, óleo de milho, óleo de girassol ou óleo de amendoim e ésteres, tais como miristato de isopropila, também podem ser usados como sistemas solventes para composições dos compostos. Adicionalmente, vários aditivos que au-
25 mentam a estabilidade, esterilidade e isotonicidade das composições, incluindo conservantes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes e tampões podem ser adicionados. A prevenção da ação de microrganismos pode ser assegurada por

vários agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo, parabens, clorobutanol, fenol, ácido sórbico e similares. Em muitos casos, é desejável incluir agentes isotônicos, por exemplo, açúcares, cloreto de sódio e similares. A absorção
5 prolongada da forma farmacêutica injetável pode ser realizada pelo uso de agentes que atrasam a absorção, por exemplo, monoestearato de alumínio e gelatina. De acordo com a presente invenção, entretanto, qualquer veículo, diluente, ou aditivo usado tem que ser compatível com os compostos.

10 Soluções injetáveis estéreis podem ser preparadas pela incorporação dos compostos utilizados na prática da presente invenção, na quantidade requerida do solvente apropriado com vários outros ingredientes como desejado.

Uma formulação farmacológica da presente invenção
15 pode ser administrada no paciente em uma formulação injetável contendo qualquer carreador compatível, tais como vários veículos, adjuvantes, aditivos e diluentes; ou os compostos utilizados na presente invenção podem ser administrados parenteralmente no paciente na forma de implantes subcutâneos
20 de liberação lenta ou sistemas de distribuição de alvejamento, tais como anticorpos monoclonais, distribuição vetorada, iontoforética, matrizes de polímeros, lipossomos e microesferas. Exemplos de sistemas de distribuição usados na presente invenção incluem patentes U.S. Nos. 5.225.182,
25 5.169.383, 5.167.616, 4.959.217, 4.925.678, 4.487.603, 4.486.194, 4.447.233, 4.447.224, 4.439.196, e 4.475.196. Muitos outros tais implantes, sistemas de distribuição e módulos são bem conhecidas pelos versados na técnica.

Uma formulação farmacológica dos compostos utilizados na presente invenção pode ser administrada oralmente no paciente. Métodos convencionais tal como administração do composto em tabletes, suspensões, soluções, emulsões, cápsulas, pós, xaropes e similares são usáveis. As técnicas conhecidas que distribuem oralmente ou intravenosamente e mantém a atividade biológica são preferíveis. Em uma modalidade, o composto da presente invenção pode ser administrado inicialmente por injeção intravenosa para levar os níveis sanguíneos para um nível adequado. Os níveis do paciente são então mantidos por uma forma de dosagem oral, embora outras formas de administração dependam da condição do paciente e de maneiras indicadas anteriormente, podem ser usados.

Em geral, a dose ativa dos compostos para humanos está na faixa de 1 ng/kg a cerca de 20-100 mg/kg de peso corporal por dia, preferivelmente cerca de 0,01 mg a cerca de 2-10 mg/kg de peso corporal por dia, em um regime de uma dose por dia ou duas ou três ou mais vezes por dia por um período de 1-2 semanas ou mais, preferivelmente por 24 a 48 horas ou pela infusão contínua durante um período de 1-2 semanas ou mais.

Administração de compostos da presente invenção no olho

Os compostos da presente invenção podem ser administrados topicamente no olho ou na forma de uma injeção, tal como uma injeção intravítrea, uma injeção subretinal ou uma injeção bilateral. Informação mais detalhada sobre a administração dos compostos da presente invenção pode ser en-

contrada em Tolentino et al., Retina 24 (2004) 132-138; Reich et al., Molecular vision 9 (2003) 210-216.

Administração pulmonar de compostos da presente invenção

5 As composições terapêuticas da presente invenção são preferivelmente administradas no pulmão pela inalação de um aerossol contendo estas composições/compostos, ou pela instilação intranasal ou intratraqueal das ditas composições. A formulação das composições em lipossomos pode beneficiar a absorção. Adicionalmente, as composições podem incluir um líquido PFC tal como perflubron, e as composições podem ser formuladas como um complexo dos compostos da invenção com polietilenoimina (PEI)..

15 Para informação mais detalhada sobre distribuição pulmonar de composições farmacêuticas ver Weiss et al., Human gene therapy 10:2287-2293 (1999); Densmore et al., Molecular therapy 1:180-188 (1999); Gautam et al., Molecular therapy 3:551-556 (2001); e Shahiwala & Misra, RAPS PharmSciTech 5 (2004). Adicionalmente, formulações respiratórias para RNAsi são descritas em pedido de patente U.S. No. 2004/0063654 de Davis et al.

25 Adicionalmente, os compostos da presente invenção podem ser administrados topicamente quando apropriados (tal como no caso de úlceras do pé diabético, por exemplo) opcionalmente em uma formulação lipídeo/lipossomo.

Administração de compostos da presente invenção no ouvido

Uma modo de administração preferível é a distribu-

ição tópica do inibidor de RTP801 na membrana de janela redonda da cóclea revelada, por exemplo, em Tanaka et M. (Hear Res. 2003 Mar;177(1-2):21-31). Um modo adicional de administração no ouvido é pela injeção transtimpânica.

5 No tratamento de úlceras de pressão ou outras feridas, a administração da composição farmacêutica é preferivelmente por aplicação tópica na área danificada, mas as composições podem ser também administrada sistemicamente.

10 Formulações adicionais para melhorar a distribuição dos compostos da presente invenção podem incluir compostos não formulados, compostos covalentemente ligados ao colesterol e compostos ligados aos anticorpos que são alvejados (Song et al., Antibody mediated in vivo delivery of small interfering RNAs via cell-surface receptors, Nat Biotechnol. 2005 Jun; 23(6):709-17).

15 Todos os RNAsi aqui revelados podem ser administrados em um formato não formulado como RNAsi nu, para o tratamento de qualquer das doenças ou condições aqui reveladas.

20 O termo "RNAsi nu" refere-se a moléculas de RNAsi que são livres de qualquer veículo de distribuição que atua para assistir, promover ou facilitar a entrada na célula, incluindo seqüências virais, partículas virais, formulações de lipossomos, lipofectina ou agentes de precipitação e similares. Por exemplo, RNAsi em PBS é "RNAsi nu".

25 Adicionalmente, a administração de qualquer RNAsi nu, oligonucleotídeo, combinação de RNAsi nu ou combinação de RNAsi nu e molécula adicional a fim de tratar qualquer

das doenças e condições aqui reveladas está de acordo com o escopo da presente invenção.

Entretanto, como aqui reveladas, as moléculas de RNAsi da invenção também podem ser distribuídas em formulações de lipossomos e formulações de lipofectina e similares e podem ser preparadas pelos métodos bem conhecidos pelos versados na técnica. Tais métodos são descritos, por exemplo, em patentes U.S. Nos. 5.593.972. 5.589.466. e 5.580.859. que estão aqui incorporadas pela referência.

10 Exemplo 11

Modelo ex vivo para ototoxicidade induzida por cisplatina e o efeito protetor de RNAsi de RTP801

A ototoxicidade induzida por cisplatina é induzida em culturas organotípicas cocleares e vestibulares. Os filhotes de rato 3-4 dias após o parto são usados para preparar as culturas organotípicas cocleares e vestibulares detalhadas em Zhang et al., Neuroscience 120 (2003) 191-205. As cócleas são dissecadas cuidadosamente e os tecidos cocleares contendo o gânglio espiral, órgão de Corti e o giro médio são removidos para preparar as culturas organotípicas da forma descrita em Zhang et al. As culturas são colocadas em um incubador de CO₂ por 24 horas para condicionamento antes do tratamento. Após condicionamento, as culturas são tratadas com cisplatina sozinha a 1, 5 ou 10 µg/mL por 48 horas. Para estudar o efeito protetor de RNAsi de RTP801, os explantes cocleares (5 cócleas por grupo) são tratados por 48 horas com 10 µg/mL de cisplatina e concentrações variadas de RNAsi de RTP801 com ou sem lipofectamina. Culturas controles

não tratadas e culturas tratadas com RNAsi de RTP801 são corridas em paralelo por 48 horas. No fim dos experimentos, as culturas são fixadas com formalina a 10% e coradas com faloidina conjugada com FITC. Os números de células capilares internas e células capilares externas de 0,25 mm de comprimento coclear são contados e o número médio de células capilares é determinado para cada tratamento.

Exemplo 12

Modelo in vivo para ototoxicidade induzida por gentamicina e o efeito protetor de RNAsi de RTP801

As chinchilas são tanto tratadas com sulfato de gentamicina sozinho por 5 dias (125-300 mg/kg, intramuscular) quanto em combinação com RNAsi de RTP801. As moléculas de RNAsi são administradas topicamente na membrana de janela redonda da cóclea dois dias antes e durante os 5 dias de exposição à gentamicina. No final do tratamento, os animais são sacrificados pela exposição ao dióxido de carbono e decapitação. As cócleas são removidas e preparadas para coloração com faloidina conjugada com FITC para determinar os números de células capilares internas e células capilares externas no tecido coclear (da forma descrita em Ding et al., Hearing Research 164 (2002) 115-126 e em Wang et al., The Journal of Neuroscience 23(24):8596-8607).

Exemplo 13

Modelo in vivo para trauma acústico e o efeito protetor de RNAsi de RTP801

Porquinhos da Índia pigmentados são usados no estudo do trauma acústico (descrito em Wang et al., The Jour-

nal de Neuroscience 23(24):8596-8607). Moléculas RNAsi de RTP801 são administradas topicamente na membrana de janela redonda da cóclea por um período de 7 dias. Cócleas esquerdas não tratadas serviram como controles para a efetividade do trauma acústico que causam perda de capilar auditivo e perda de função da audição. Os animais são expostos ao trauma acústico [6 kHz, 120 dB nível de pressão do som (SPL), 30 minutos], e audiogramas de ambos os ouvidos são derivados dos potenciais de ação do composto (CAPs) gravado dos nervos auditivos via eletrodos da membrana de janela redonda crônica. Os audiogramas CAP de ambos os ouvidos são medidos diariamente em animais acordados. Após 30 dias de exposição ao som, os animais são sacrificados e suas cócleas são preparadas para uma avaliação quantitativa de perda de células capilares usando microscopia eletrônica de varredura a fim de contar todas as células capilares para o comprimento inteiro do duto coclear.

Exemplo 14

Resultados experimentais relacionados com 801 1 (ID No. 257 na tabela D, SEO ID NO:527 [anti-sentido] e 801 4 (ID No. 260 na tabela D, SEO ID NO:530 [fita anti-sentido])

Eficácia in vitro em células HEK293

Três diferentes concentrações de RNAsi, 5, 10 e 20 nm foram transfectadas para as células HEK293. Concentrações idênticas de um RNAsi irrelevante (siTG) foram usadas como um controle negativo, ao passo que concentrações idênticas de REDD14 foram usadas como um controle positivo. 72 horas

após a transfecção as células foram colhidas; o RNA foi purificado e usado como um gabarito em uma reação de PCRq para a determinação quantitativa dos níveis da transcrição de RTP801 endógenos. Ciclofilina A humana foi usada como uma referência interna para PCRq. Dados normalizados de referência foram adicionalmente submetidos à normalização biológica: Para cada concentração de RNAsi, os níveis de RTP801 detectados foram expressos como porcentagem de RTP801 na amostra de controle negativo correspondente. Os resultados estão mostrados na figura 28.

Eficácia in vitro em células BE2C

Enquanto que níveis da expressão basal de RTP801 foram analisados nas células HEK293 para avaliação da capacidade do RNAsi de diminuir os níveis de expressão induzidos por RTP801, células BE2C tratadas com CoCl_2 como um indutor de RTP801 foram usadas. O projeto e avaliação de dados foram essencialmente da maneira descrita anteriormente. 24 horas após a transfecção do RNAsi, as células BE2C foram tratadas com 10 μM de CoCl_2 por mais 24 horas e então processadas para extração de RNA. Os resultados estão mostrados na figura 29. Os resultados indicam que 801_1 e 801_4 são pelo menos tão efetivos quanto REDD14 contra RTP801 em ensaios in vitro.

Eficácia in vivo no modelo camundongo CNV

Os experimentos foram realizados da forma descrita no exemplo 6, com os seguintes grupos experimentais:

Tabela 4

grupo	Números de pontos de laser (μm)	SEM	Volume médio de CNV
PBS	471698.3	26163.96	22
REDD14 (0,05 μg)	237326.9	24136.19	29
REDD14 (0,1 μg)	182997.0	29213.82	15
REDD14 (0,5 μg)	207235.7	20420.18	29
RTP801#1 siRNA (0,05 μg)	334196.8	32429.66	30
RTP801#1 siRNA (0,1 μg)	176091.1	37343.13	24
RTP801#1 siRNA (0,5 μg)	226063.0	17906.91	33
RTP801#2 siRNA (0,05 μg)	304325.6	30584.33	30
RTP801#2 siRNA (0,1 μg)	265668.5	20287.93	28
RTP801#2 siRNA (0,5 μg)	269164.4	24776.41	31

Os resultados estão apresentados na figura 30, e mostram que 801_4 é pelo menos tão efetivo quanto REDD14 no modelo in vivo de camundongo CNV.

5 Exemplo 15

Modelos e Resultados relacionados à Surdez

O efeito do tratamento de um RNAsi exemplar (p53) na morte da célula capilar induzida por acústica na cóclea de chinchila

10 A atividade de um RNAsi exemplar (QM5 - anti p53) em um modelo de trauma acústico foi estudado em chinchila. Um grupo de sete animais foi submetido ao trauma acústico. Os animais foram expostos a ruído na faixa de oitavos centralizada a 4 kHz por 3 horas a 105 dB. O ouvido esquerdo
15 das chinchilas expostas ao ruído foi tratado com 30 μg de

RNA_{si} em $\approx 20 \mu\text{L}$; o ouvido direito foi tratado com veículo. O limiar médio do potencial de ação do composto registrado da janela redonda foi determinado 2,5 semanas após o trauma acústico, a fim de determinar se os limiares no ouvido tratado com RNA_{si} foram mais baixos (melhores) que o ouvido não tratado (veículo). Os limiares médios foram mais baixos nos ouvidos tratados com RNA_{si} versus os ouvidos não tratados. A diferença de 4 kHz foi estatisticamente significativa ($p < 0,033$). Estes resultados indicam que o RNA_{si} exemplar p53 administrado na janela redonda da cóclea é capaz de reduzir o dano causado por trauma acústico.

O efeito do tratamento com RNA_{si} p53 ou 801 na morte da célula capilar induzida por cisplatina na cóclea de ratos

Ratos Wistar machos foram testados pelos limiares de resposta da haste do cérebro auditivo basal para sinais de cliques, 8, 16 e 32 kHz anterior ao tratamento com cisplatina. Após o teste de resposta da haste do cérebro auditivo basal, a cisplatina foi administrada como uma infusão intraperitoneal de 13 mg/kg por 30 minutos. Os ouvidos tratadas receberam tanto 15 $\mu\text{g}/4$ microlitros do RNA_{si} exemplar p53 (como anterior) quanto RNA_{si} de RTP801 REDD14 (seqüência No. 14 na tabela A, SEQ ID No.s 16 (sentido) e 66 (anti-sentido)) aplicados diretamente na membrana de janela redonda. Ouvidos controle foram tratados tanto com RNA_{si} GFP quanto PBS não relacionados. As moléculas de RNA_{si} foram administradas entre 3-5 dias anteriores à administração com cisplatina a fim de examinar o efeito protetor na cóclea.

O teste da resposta da haste do cérebro auditivo basal foi repetido 3 dias após a administração com cisplatina. Os limiares da resposta da haste do cérebro auditivo foram comparados entre o pré-tratamento e o pós-tratamento e o deslocamento nos limiares é indicado na tabela 5. Deslocamentos maiores nos limiares após o tratamento com cisplatina é indicativo para perdas mais graves de células capilares na cóclea. Após a repetição do teste de resposta da haste do cérebro auditivo, os animais foram sacrificados e as cócleas foram removidas e processadas por microscopia eletrônica de varredura (SEM), para quantificar a perda de célula capilar externa (OHC) na região do gancho (região de alta frequência). A porcentagem de perda de célula capilar externa foi calculada pela divisão do número de células ausentes ou danificadas severamente pelo número total células capilares externas no campo da fotografia.

A tabela 5 demonstra os resultados obtidos de quatro animais submetidos a dano induzido por cisplatina e analisados pela perda de célula capilar externa na região do gancho. Da forma revelada nos resultados, animais que receberam o RNAsi diretamente contra p53 ou 801 exibiram perda de célula capilar externa mais baixa e deslocamentos menores no limiar para sinais de 32 kHz. Ambos os parâmetros indicam que RNAsi direcionado contra p53 ou 801 é protetor contra danos induzidos por cisplatina na cóclea.

Tabela 5: Perda de célula capilar versus deslocamento do limiar em cóclea de ratos tratadas com cisplatina.

Tratamento	Perda de célula capilar externa (OHC)	Resposta da haste do cérebro auditivo (Deslocamento de limiar a 32 KHz)
QC/L RNAsi P53 (QM5)	50%	10 dB
QC/R PBS	100%	30 dB
QF/L RNAsi P53 (QM5)	20%	10 dB
QF/R GFP	56%	27,5 dB
QJ/R RNAsi 801 (DD 14)	20%	17,5 dB
QJ/L GFP	100%	27,5 dB
QN/L RNAsi 801 (REDD 14)	0%	10 dB
QN/R PBS	100%	17,5 dB

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

<110> Quark Biotech, Inc. Atugen AG

<120> "USOS TERAPÊUTICOS DE INIBIDORES DE RTP801"

<130> 2097/75780-A

<150> US 60/760,586

<151> 2006-01-20

<150> US 60/796,901

<151> 2006-05-01

<150> Us 60/851,000

<151> 2006-10-10

<160> 536

<170> Patentln version 3.3

<210> 1

<211> 1782

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1.

tttggccctc	gaggccaaga	attcggcacg	aggggggggag	gtgcgagcgt
ggacctggga	60			
cgggtctctgg	cggctctcgg	tggttggcac	gggttcgcac	acccattcaa
gcggcaggac	120			
gcacttgtct	tagcagttct	cgctgaccgc	gctagctgcg	gcttctacgc
tccggcactc	180			
tgagttcatc	agcaaacgcc	ctggcgtctg	tcctcaccat	gcctagcctt
tgggaccgct	240			
tctcgtcgtc	gtccacctcc	tcttcgccct	cgtccttgcc	ccgaactccc
accccagatc	300			
ggccgcccgcg	ctcagcctgg	gggtcggcga	cccgggagga	ggggtttgac

```

cgctccacga      360
gcctggagag      ctcggaactgc   gagtccctgg   acagcagcaa   cagtggcttc
gggccggagg      420
aagacacggc      ttacctggat   ggggtgtcgt   tgcccgactt   cgagctgctc
agtgaccctg      480
aggatgaaca      cttgtgtgcc   aacctgatgc   agctgctgca   ggagagcctg
gccagggcg      540
ggctgggctc      tcgacgccct   gcgcgcctgc   tgatgcctag   ccagttggta
agccaggtgg      600
gcaaagaact      actgcgcctg   gcctacagcg   agccgtgcgg   cctgcggggg
gcgctgctgg      660
acgtctgcgt      ggagcagggc   aagagctgcc   acagcgtggg   ccagctggca
ctcgacccca      720
gcctggtgcc      caccttccag   ctgaccctcg   tgctgcgcct   ggactcacga
ctctggccca      780
agatccaggg      gctgttttagc   tccgccaaact   ctcccttcct   ccctggcttc
agccagtccc      840
tgacgctgag      cagtggcttc   cgagtcatca   agaagaagct   gtacagctcg
gaacagctgc      900
tcattgagga      gtgttgaact   tcaacctgag   ggggccgaca   gtgccctcca
agacagagac      960
gactgaactt      ttgggggtgga   gactagaggc   aggagctgag   ggactgattc
ctgtgggttg      1020
aaaactgagg      cagccaccta   aggtggaggt   gggggaatag   tgtttcccag
gaagctcatt      1080   gagttgtgtg   cgggtggctg   tgcattgggg   aca-
cataccc   ctcagtactg   tagcatgaaa      1140   caaaggctta   ggggcccaaca
aggcttccag   ctggatgtgt   gtgtagcatg   taccttatta      1200
tttttgttac   tgacagttaa   cagtgggtgtg   acatccagag   agcagctggg

```

```

ctgctcccg      1260   ccagcccg   ccagggtga   aggaagaggc
acgtgctcct    cagagcagcc   ggagggagg      1320   gggaggtcgg
aggtcgtgga    ggtggtttgt   gtatcttact     ggtctgaagg   gaccaagtgt
1380 gtttgttggt  tgttttgtat   cttgtttttc    tgatcggagc  atcactactg
acctgttgta    1440   ggcagctatc   ttacagacgc   atgaatgtaa   gagtag-
gaag  gggagggtgt  cagggatcac     1500   ttgggatctt   tgacacttga
aaaattacac    ctggcagctg   cgtttaagcc     ttcccccatc      1560
gtgtactgca    gagttgagct   ggcaggggag     gggctgagag   ggtgggggct
ggaaccctc     1620   ccggggagga   gtgccatctg   ggtcttccat   cta-
gaactgt  ttacatgaag  ataagatact     1680   cactgttcat   gaatacactt
gatgttcaag    tattaagacc   tatgcaatat     tttttacttt      1740
tctaataaac  atgtttgtta  aaaaaaaaaa  aaaaaaaaaa  as      1782

```

<210> 2

<211> 232

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Pro Ser Leu Trp Asp Arg Phe ser ser Ser Ser Thr ser ser
ser

1 5 10 15

Pro Ser Ser Leu Pro Arg Thr Pro Thr Pro Asp Arg pro Pro Arg
ser

20 25 30

Ala Trp Gly Ser Ala Thr Arg Glu Glu Gly Phe Asp Arg Ser Thr
Ser

35 40 45

Leu Glu ser ser ASp Cys Glu Ser Leu Asp Ser Ser Asn Ser Gly
Phe

50 55 60
 Gly Pro Glu Glu Asp Thr Ala Tyr Leu Asp Gly val Ser Leu Pro
 Asp
 65 70 75 80
 Phe Glu Leu Leu ser Asp Pro Glu Asp Glu His Leu Cys Ala Asn
 Leu
 85 90 95
 Met Gln Leu Leu Gln Glu Ser Leu Ala Gln Ala Arg Leu Gly ser
 Arg
 100 105 110
 Arg Pro Ala Arg Leu Leu Met Pro Ser Gln Leu Val ser Gln Val
 Gly
 115 120 125
 Lys Glu Leu Leu Arg Leu Ala Tyr ser Glu Pro Cys Gly Leu Arg
 Gly
 130 135 140
 Ala Leu Leu ASp val Cys Val Glu Gln Gly Lys Ser Cys His Ser
 Val
 145 150 155 160
 Gly Gln Leu Ala Leu Asp Pro Ser Leu Val Pro Thr Phe Gln Leu
 Thr
 165 170 175
 Leu val Leu Arg Leu Asp Ser Arg Leu Trp Pro Lys Ile Gln Gly
 Leu
 180 185 190
 Phe ser ser Ala Asn Ser Pro Phe Leu Pro Gly Phe ser Gln Ser
 Leu
 195 200 205

Thr Leu ser Thr Gly Phe Arg Val Ile Lys Lys Lys Leu Tyr Ser
ser

210 215 220

Glu Gln Leu Leu Ile Glu Glu Cys

225 230

<210> 3

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

uagaagccgc agcuagcgc 19

<210> 4

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

uccgagcucu ccaggcucg 19

<210> 5

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

ugcugcuguc cagggacuc 19

<210> 6

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

agcagcugca ucagguugg	19
<210> 7	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 7	
ugaguccagg cgcagcacg	19
<210> 8	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 8	
cagcuagcgc ggucagcga	19
<210> 9	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 9	
ccgcagcuag cgcggucag	19
<210> 10	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 10	
aagccgcagc uagcgcggu	19
<210> 11	
<211> 19	
<212> RNA	

<213> Homo sapiens

<400> 11

aguccgagcu cuccaggcu 19

<210> 12

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 12

gcaguccgag cucuccagg 19

<210> 13

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 13

uguugcugcu guccagggga 19

<210> 14

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 14

agccacuguu gcugcuguc 19

<210> 15

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 15

aagccacugu ugcugcugu 19

<<210> 16

<211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 16
 agcugcauca gguuggcac 19
 <210> 17
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 17
 ugcagcagcu gcaucaggu 19
 <210> 18
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 18
 ucuccugcag cagcugcau 19
 <210> 19
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 19
 ccccgagggc cgcacggcu 19
 <210> 20
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 20

ccuggaucuu gggccagag	19
<210> 21	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 21	
cagcgucagg gacuggcug	19
<210> 22	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 22	
augcuacagu	19
<210> 23	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 23	
gucuguaaga	19
<210> 24	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 24	
uucuagaugg aagacccag	19
<210> 25	
<211> 19	
<212> RNA	

<213> Homo sapiens

<400> 25

uugaacauca

19

<210> 26

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 26

aaauauugca uaggucuua

19

<210> 27

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 27

aaaaauauug cauaggucu

19

<210> 28

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 28

agggacucgc aguccgagc

19

<210> 29

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 29

uacuugaaca ucaagugua

19

<210> 30

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 30

aaacauguuu auuagaaaa 19

<210> 31

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 31

aacugcuaag acaagugcg 19

<210> 32

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 32

acgacgacga gaagcgguc 19

<210> 33

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 33

aagccguguc uuccuccgg 19

<210> 34

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 34

aguguucauc cucaggguc 19
<210> 35
<211> 19
<212> RNA
<213> Homo sapiens
<400> 35

agggcgucga gagcccagc 19
<210> 36
<211> 19
<212> RNA
<213> Homo sapiens
<400> 36

aucagcaggc gcgcagggc 19
<210> 37
<211> 19
<212> RNA
<213> Homo sapiens
<400> 37

aguucuuugc ccaccuggc 19
<210> 38
<211> 19
<212> RNA
<213> Homo sapiens
<400> 38

acggcucgcu guaggccag 19
<210> 39
<211> 19
<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 39

acguccagca gcgcccccc

19

<210> 40

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 40

augacucgga agccagugc

19

<210> 41

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 41

aacucaauga gcuuccugg

19

<210> 42

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 42

cucaacucug caguacacg

19

<210> 43

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 43

agauacacaa accaccucc

19

<210> 44

<211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 44
 acaacaaaca cacuugguc 19
 <210> 45
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 45
 cugcaucagg uuggcacac 19
 <210> 46
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 46
 uccugccucu agucuccac 19
 <210> 47
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 47
 cagcugcauc agguuggca 19
 <210> 48
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 48

cagcagcugc aucagguug	19
<210> 49	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 49	
ccugcagcag cugcaucag	19
<210> 50	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 50	
cuccugcagc agcugcauc	19
<210> 51	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 51	
aacucugcag uacacgaug	19
<210> 52	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 52	
ccugccucua gucuccacc	19
<210> 53	
<211> 19	
<212> RNA	

<213> Homo sapiens

<400> 53

gcgcuagcug cggcuucua

19

<210> 54

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 54

cgagccugga gagcucgga

19

<210> 55

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 55

gagucccugg acagcagca

19

<210> 56

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 56

ccaaccugau gcagcugcu

19

<210> 57

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 57

cgugcugcgc cuggacuca

19

<210> 58

<211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 58
 ucgcugaccg cgcuagcug 19
 <210> 59
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 59
 cugaccgcgc uagcugcgg 19
 <210> 60
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 60
 accgcgcua g cugcggcuu 19
 <210> 61
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 61
 agccuggaga gcucggacu 19
 <210> 62
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 62

ccuggagagc ucggacugc	19
<210> 63	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 63	
ucccuggaca gcagcaaca	19
<210> 64	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 64	
gacagcagca acaguggcu	19
<210> 65	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 65	
acagcagcaa caguggcuu	19
<210> 66	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 66	
gugccaaccu gaugcagcu	19
<210> 67	
<211> 19	
<212> RNA	

<213> Homo sapiens

<400> 67

accugaugca gcugcugca 19

<210> 68

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 68

augcagcugc ugcaggaga 19

<210> 69

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 69

agccgugcgg ccugcgggg 19

<210> 70

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 70

cucuggccca agauccagg 19

<210> 71

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 71

cagccagucc cugacgcug 19

<210> 72

<211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 72
 cccucagua cuguagcau 19
 <210> 73
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 73
 aggcagcuau cuuacagac 19
 <210> 74
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 74
 cugggucuuc caucuagaa 19
 <210> 75
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 75
 gaauacacuu gauguucaa 19
 <210> 76
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 76

uaagaccuau gcaauauuu	19
<210> 77	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 77	
agaccuaugc aaauuuuuu	19
<210> 78	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 78	
gcucggacug cgagucccu	19
<210> 79	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 79	
uacacuugau guucaagua	19
<210> 80	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 80	
uuuucuaaua aacauguuu	19
<210> 81	
<211> 19	
<212> RNA	

<213> Homo sapiens

<400> 81

cgcacuuguc uuagcaguu 19

<210> 82

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 82

gaccgcuucu cgucgucgu 19

<210> 83

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 83

ccggaggaag acacggcuu 19

<210> 84

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 84

gaccugagg augaacacu 19

<210> 85

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 85

gcugggcucu cgacgcccu 19

<210> 86

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 86

gccucgcgcg ccugcugau 19

<210> 87

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 87

gccagguggg caaagaacu 19

<210> 88

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 88

cuggccuaca gcgagccgu 19

<210> 89

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 89

ggggggcgcu gcuggacgu 19

<210> 90

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 90

gcacuggcuu ccgaguc <u>au</u>	19
<210> 91	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 91	
ccaggaagcu cauugag <u>uu</u>	19
<210> 92	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 92	
cguguacugc agaguugag	19
<210> 93	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 93	
ggaggugguu uguguauc <u>u</u>	19
<210> 94	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 94	
gaccaagugu guuuguu <u>gu</u>	19
<210> 95	
<211> 19	
<212> RNA	

<213> Homo sapiens

<400> 95

gugugccaac cugaugcag

19

<210> 96

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 96

guggagacua gaggcagga

19

<210> 97

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 97

ugccaaccug augcagcug

19

<210> 98

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 98

caaccugaug cagcugcug

19

<210> 99

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 99

cugaugcagc ugcugcagg

19

<210> 100

<211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 100
 gaugcagcug cugcaggag 19
 <210> 101
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 101
 caucguguac ugcagaguu 19
 <210> 102
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 102
 gguggagacu agaggcagg 19
 <210> 103
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 103
 cuagccaguu gguaagcca 19
 <210> 104
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 104

ugauuccagu gguuggaaa	19
<210> 105	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 105	
ccagugguug gaaaacuga	19
<210> 106	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 106	
gcuuccgagu caucaagaa	19
<210> 107	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 107	
ggaagcucau ugaguugug	19
<210> 108	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 108	
ccaucugggu cuuccaucu	19
<210> 109	
<211> 19	
<212> RNA	

<213> Homo sapiens

<400> 109

ggaugugugu guagcaugu

19

<210> 110

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 110

acacauaccc cucaguacu

19

<210> 111

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 111

acauaccccu caguacugu

19

<210> 112

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 112

cacuguucau gaauacacu

19

<210> 113

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 113

ccagcuggau gugugugua

19

<210> 114

<211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 114
 cggaacagcu gcucauuga 19
 <210> 115
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 115
 gaagcucauu gaguugugu 19
 <210> 116
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 116
 ggacacauac cccucagua 19
 <210> 117
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 117
 ggaucuuuga cacuugaaa 19
 <210> 118
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 118

guagcaugua ccuuauuau	19
<210> 119	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 119	
<210> 120	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 120	
uguguagcau guaccuuau	19
<210> 121	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 121	
cuggaugugu guguagcau	19
<210> 122	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 122	
acacuugaug uucaaguau	19
<210> 123	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	

<400> 123
 gcaugaaugu aagaguagg 19
 <210> 124
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 124
 agcagcaaca guggcuucg 19
 <210> 125
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 125
 augaauguaa gaguaggaa 19
 <210> 126
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 126
 cagcagcaac aguggcuuc 19
 <210> 127
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 127
 caugaaugua agaguagga 19
 <210> 128
 <<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 128

gauguucaag uauuaagac 19

<210> 129

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 129

ugaugcagcu gcugcagga 19

<210> 130

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 130

gaauacacuu gauguucaa 19

<210> 131

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 131

ugaauacacu ugauguuca 19

<210> 132

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 132

auacacuuga uguucaagu 19

<210> 133

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 133

caugaauaca cuugauguu 19

<210> 134

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 134

cuggacagca gcaacagug 19

<210> 135

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 135

guucaugaau acacuugau 19

<210> 136

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 136

ucaugaauac acuugaugu 19

<210> 137

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 137
 uggacagcag caacagugg 19
 <210> 138
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 138
 ugugugccaa ccugaugca 19
 <210> 139
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 139
 uucaugaaua cacuugaug 19
 <210> 140
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 140
 aaccugaugc agcugcugc 19
 <210> 141
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Hnmo sapiens
 <400> 141
 agucccugga cagcagcaa 19
 <210> 142
 <211> 19

<212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 142
 cccucaguac uguagcaug 19
 <210> 143
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 143
 ccuggacagc agcaacagu 19
 <210> 144
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 144
 ugugccaacc ugaugcagc 19
 <210> 145
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 145
 aaucacacuug auguucag 19
 <210> 146
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 146
 augaauacac uugauguuc 19

<210> 147

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 147

ugaugcagcu gcugcagga 19

<210> 148

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 148

agaacuguuu acaugaaga 19

<210> 149

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 149

aucuagaacu guuuacaug 19

<210> 150

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 150

ccaugccuag ccuuuggga 19

<210> 151

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 151	
cuagaacugu uuacaugaa	19
<210> 152	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 152	
gaacuguuua caugaagau	19
<210> 153	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 153	
ggucuuccau cuagaacug	19
<210> 154	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 154	
ccaucuagaa cuguuuaca	19
<210> 155	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 155	
cuuccaucua gaacuguuu	19
<210> 156	
<211> 19	

<212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 156
 uagaacuguu uacaugaag 19
 <210> 157
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 157
 ucuuccaucu agaacuguu 19
 <210> 158
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 158
 caucuagaac uguuuacau 19
 <210> 159
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 159
 gggucuucca ucuagaacu 19
 <210> 160
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 160
 uccaucuaga acuguuuac 19

<210> 161

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 161

ucuagaacug uuuacauga 19

<210> 162

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 162

uuccaucuag aacuguuua 19

<210> 163

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 163

gucuuccauc uagaacugu 19

<210> 164

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 164

caaguauuaa gaccuaugc 19

<210> 165

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 165
 guauuaagac cuaugcaau 19
 <210> 166
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 166
 aguauuaaga ccuaugcaa 19
 <210> 167
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 167
 auguuaaagu auuaagacc 19
 <210> 168
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 168
 cacuugaugu ucaaguaau 19
 <210> 169
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 169
 ccaagaucca ggggcuguu 19
 <210> 170
 <211> 19

<212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 170
 guucaaguau uaagaccua 19
 <210> 171
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 171
 ucaaguauua agaccuaug 19
 <210> 172
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 172
 aaguauuaag accuaugca 19
 <210> 173
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 173
 uguucaagua uuaagaccu 19
 <210> 174
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 174
 ugggucuucc aucuagaac 19

<210> 175

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 175

uggcuuacca acuggcuag 19

<210> 176

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 176

uuuccaacca cuggaauc 19

<210> 177

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 177

ucaguuuucc aaccacugg 19

<210> 178

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 178

uucuugauga cucggaagc 19

<210> 179

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 179

cacaacucuaa ugagcuucc 19

<210> 180

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

400> 180

agauggaaga cccagaugg 19

<210> 181

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 181

acaugcuaca cacacaucc 19

<210> 182

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 182

aguacugagg gguaugugu 19

<210> 183

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 183

acaguacuga gggguaugu 19

<210> 184

<211> 19

<212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 184
 aguguauuua ugaacagug 19
 <210> 185
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 185
 uacacacaca uccagcugg 19
 <210> 186
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 186
 ucaaugagca gcuguuccg 19
 <210> 187
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 187
 acacaacuca augagcuuc 19
 <210> 188
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 188
 uacugagggg uaugugucc 19

<210> 189
<211> 19
<212> RNA
<213> Homo sapiens
<400> 189
uuucaagugu caaagaucc 19
<210> 190
<211> 19
<212> RNA
<213> Homo sapiens
<400> 190
auaaauaaggu acaugcuac 19
<210> 191
<211> 19
<212> RNA
<213> Homo sapiens
<400> 191
uuccaugcua caguacuga 19
<210> 192
<211> 19
<212> RNA
<213> Homo sapiens
<400> 192
auaagguaca ugcucacaca 19
<210> 193
<211> 19
<212> RNA
<213> Homo sapiens

<400> 193
 augcuacaca cacauccag 19
 <210> 194
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 194
 auacuugaac aucaagugu 19
 <210> 195
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 195
 ccuacucuua cauucaugc 19
 <210> 196
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 196
 cgaagccacu guugcugcu 19
 <210> 197
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 197
 uuccuacucu uacauucau 19
 <210> 198
 <211> 19

<212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 198
 gaagccacug uugcugcug 19
 <210> 199
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 199
 uccuacucuu acauucaug 19
 <210> 200
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 200
 gucuuaauac uugaacauc 19
 <210> 201
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 201
 uccugcagca gcugcauca 19
 <210> 202
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 202
 uugaacauca aguguauuc 19

<210> 203

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 203

ugaacaucaa guguaauca

19

<210> 204

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 204

acuugaacau caaguguau

19

<210> 205

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 205

aacaucaagu guauucaug

19

<210> 206

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 206

cacuguugcu gcuguccag

19

<210> 207

21].> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 207
 aucaagugua uucaugaac 19
 <210> 208
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 208
 acaucaagug uauucauga 19
 <210> 209
 21j> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 209
 ccacuguugc ugcugucca 19
 <210> 210
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 210
 ugcaucaggu uggcacaca 19
 <210> 211
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 211
 caucaagugu auucaugaa 19
 <210> 212
 <211> 19

<212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 212
 gcagcagcug caucagguu 19
 <210> 213
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 213
 uugcugcugu ccagggacu 19
 <210> 214
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 214
 caugcuacag uacugaggg 19
 <210> 215
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 215
 acuguugcug cuguccagg 19
 <210> 216
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 216
 gcugcaucag guuggcaca 19

<210> 217

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 217

cuugaacauc aaguguauu 19

<210> 218

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 218

gaacaucaag uguauucau 19

<210> 219

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 219

uccugcagca gcugcauca 19

<210> 220

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 220

ucuucaugua aacaguucu 19

<210> 221

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 221

cauguaaaca guucuagau 19

<210> 222

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 222

ucccaaaggc uaggcaugg 19

<210> 223

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 223

uucauguaaa caguucuag 19

<210> 224

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 224

aucuugaugu aaacaguuc 19

<210> 225

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 225

caguucuaga uggaagacc 19

<210> 226

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 226

uguaaaacagu ucuagaugg 19

<210> 227

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<4.00> 227

aaacaguucu agauggaag 19

<210> 228

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 228

cuucauguaa acaguucua 19

<210> 229

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 229

aacaguucua gauggaaga 19

<210> 230

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 230

auguaaacag uucuagaug 19

<210> 231

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 231

aguucuagau ggaagaccc 19

<210> 232

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 232

guaaacaguu cuagaugga 19

<210> 233

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 233

ucauguaaac aguucuaga 19

<210> 234

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 234

uaaacaguuc uagauggaa 19

<210> 235

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 235

acaguucuag auggaagac 19

<210> 236

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 236

gcacaggucu uauuacuug 19

<210> 237

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 237

auugcauagg ucuuauuac 19

<210> 238

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 238

uugcauaggu cuuauuacu 19

<210> 239

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 239

ggucuuaaua cuugaacau 19

<210> 240

<211> 19

<212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 240
 aaacuugaa caucaagug 19
 <210> 241
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 241
 aacagcccu ggaucuugg 19
 <210> 242
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 242
 uaggucuuaa uacuugaac 19
 <210> 243
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 243
 cauaggucuu aaacuuga 19
 <210> 244
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 244
 ugcauagguc uuaauacuu 19

<210> 245

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 245

aggucuuauu acuugaaca 19

<210> 246

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 246

guucuagauu gaagaccca 19

<210> 247

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 247

ccaggaagcu cauugaguug u 21

<210> 248

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 248

ccaucugggu cuuccaucua g 21

<210> 249

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 249

ggaugugugu guagcaugua c 21

<210> 250

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 250

caaguguguu uguuguuugu u 21

<210> 251

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 251

ccucaguacu guagcaugga a 21

<210> 252

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 252

gaccaagugu guuuguuguu u 21

<210> 253

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 253

gcuuccgagu caucaagaag a 21

<210> 254

<211> 21

<212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 254
 ggaggugggg gaauaguguu u 21
 <210> 255
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 255
 caguacugua gcauggaaca a 21
 <210> 256
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 256
 gaauacacuu gauguucaag u 21
 <210> 257
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 257
 caaguauuaa gaccuaugca a 21
 <210> 258
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 258
 gaacuuuugg gguggagacu a 21

<210> 259

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 259

ggacacauac cccucaguac u 21

<210> 260

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 260

ggaggugguu uguguaucuu a 21

<210> 261

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 261

ggaucuuuga cacuugaaaa a 21

<210> 262

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 262

ggucuuccau cuagaacugu u 21

<210> 263

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 263

uguguagcau guaccuuauu a 21

<210> 264

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 264

caacaaggcu uccagcugga u 21

<210> 265

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 265

cacuugggau cuuugacacu u 21

<210> 266

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 266

caucacuacu gaccuguugu a 21

<210> 267

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 267

guguguguag cauguaccuu a 21

<210> 268

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 268

gcaugaaugu aagaguagga a 21

<210> 269

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 269

gacagcagca acaguggcuu c 21

<210> 270

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 270

ugaugcagcu gcugcaggag a 21

<210> 271

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 271

ugaauacacu ugauguucaa g 21

<210> 272

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 272

caugaauaca cuugauguuc a 21

<210> 273

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 273

ggacagcagc aacaguggcu u

21

<210> 274

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 274

guucaugaau acacuugaug u

21

<210> 275

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 275

ucaugaauac acuugauguu c

21

<210> 276

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 276

ucccuggaca gcagcaacag u

21

<210> 277

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 277
 agucccugga cagcagcaac a 21
 <210> 278
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 278
 gaauacacuu gauguucaag u 21
 <210> 279
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 279
 cuagaacugu uuacaugaag a 21
 <210> 280
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 280
 ccaucuagaa cuguuuacau g 21
 <210> 281
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 281
 cuuccaucua gaacuguuua c 21
 <210> 282
 <211> 21

<212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 282
 ucuuccaucu agaacuguuu a 21
 <210> 283
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 283
 caucuagaac uguuuacaug a 21
 <210> 284
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 284
 gggucuucca ucuagaacug u 21
 <210> 285
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 285
 uccaucuaga acuguuuaca u 21
 <210> 286
 <211> 21.
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 285
 ucuagaacug uuuacaugaa g 21

<210> 287

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 287

uuccaucuag aacuguuuac a 21

<210> 288

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 288

gucuuccauc uagaacuguu u 21

<210> 289

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 289

ugauguucaa guauuaagac c 21

<210> 290

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 290

guucaaguau uaagaccuau g 21

<210> 291

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 291
 ucaaguauua agaccuaugc a 21
 <210> 292
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 292
 gauguucaag uauuaagacc u 21
 <210> 293
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 293
 uucaaguauu aagaccuaug c 21
 <210> 294
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 294
 cugggucuuc caucuagaac u 21
 <210> 295
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 295
 ugggucuucc aucuagaacu g 21
 <210> 296
 <211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 296

acaacucaau gagcuuccug g 21

<210> 297

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 297

cuagauggaa gacccagaug g 21

<210> 298

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 298

guacaugcua cacacacauc c 21

<210> 299

<211> 21

<212> RNA

<213> HOMO sapiens

<400> 299

aacaaacaac aaacacacuu g 21

<210> 300

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 300

uuccaugcua caguacugag g 21

<210> 301
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 301
 aaacaacaaa cacacuuggu c 21
 <210> 302
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 302
 ucuucuugau gacucggaag c 21
 <210> 303
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 303
 aaacacuauu cccccaccuc c 21
 <210> 304
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 304
 uuguuccaug cuacaguacu g 21
 <210> 305
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<400> 305
 acuugaacau caaguguauu c 21
 <210> 306
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 306
 uugcauaggu cuuaauacuu g 21
 <210> 307
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 307
 uagucuccac cccaaaaguu c 21
 <210> 308
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 308
 aguacugagg gguauguguc c 21
 <210> 309
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 309
 uaagauacac aaaccaccuc c 21
 <210> 310
 <211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 310

uuuuucaagu gucaaagauc c 21

<210> 311

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 311

aacaguucua gauggaagac c 21

<210> 312

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 312

uaauaaggua caugcuacac a 21

<210> 313

<211> 21

cuugaacauc aaguguauuc a 21

<210> 321

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 321

ugaacaucaa guguaaucau g 21

<210> 322

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 322

aagccacugu ugcugcuguc c 21

<210> 323

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 323

acaucaagug uauucaugaa c 21

<210> 324

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 324

gaacaucaag uguauucaug a 21

<210> 325

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 325

acuguugcug cuguccaggg a 21

<210> 326

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 326

uguugcugcu guccagggac u 21

<210> 327

<211> 21
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 327
 acuugaacau caaguguauu c 21
 <210> 328
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 313
 auccagcugg aagccuuguu g 21
 <210> 314
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 314
 aagugucaaa gaucccaagu g 21
 <210> 315
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 315
 uacaacaggu caguagugau g 21
 <210> 316
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 316
 uaagguacau gcuacacaca c 21

<210> 317

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 317

uuccuacucu uacauucaug c 21

<210> 318

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 318

gaagccacug uugcugcugu c 21

<210> 319

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 319

ucuccugcag cagcugcauc a 21

<210> 320

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 320

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 328

ucuucaugua aacaguucua g 21

<210> 329

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 329

cauguaaaaca guucuagaug g

21

<210> 330

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 330

guaaacaguu cuagauggaa g

21

<210> 331

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 331

uaaacaguuc uagauggaag a

21

<210> 332

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 332

ucauguaaaac aguucuagau g

21

<210> 333

<211> 21

<212> RNA

<213> Homes sapiens

<400> 333	
acaguucuag auggaagacc c	21
<210> 334	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 334	
auguaaacag uucuagaugg a	21
<210> 335	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 335	
cuucauguaa acaguucuag a	21
<210> 336	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 336	
uguaaacagu ucuagaugga a	21
<210> 337	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 337	
aaacaguucu agauggaaga c	21
<210> 338	
<211> 21	

<212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 338
 ggucuaaaua cuugaacau c 21
 <210> 339
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> HOMO sapiens
 <400> 339
 cauaggucu aauacuuga c 21
 <210> 340
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 340
 ugcauagguc uaaauacuug a 21
 <210> 341
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 341
 aggucuuaau acuugaacau c 21
 <210> 342
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 342
 gcuaaggucu uaaauacuuga a 21

<210> 343

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 343

aguucuagau ggaagaccca g 21

<210> 344

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 344

caguucuaga uggaagaccc a 21

<210> 345

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 345

ugaaaaauua caccuggca 19

<210> 346

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 346

gacacuugaa aaauuacac 19

<210> 347

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 347
 cacuugaaaa auuacaccu 19
 <210> 348
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 348
 uuagggggcca acaaggcuu 19
 <210> 349
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 349
 acacuugaaa aaauacacc 19
 <210> 350
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 350
 acccugagga ugaacacuu 19
 <210> 351
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 351
 guacugcaga guugagcug 19
 <210> 352
 <211> 19

<212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 352
 guguacugca gaguugagc 19
 <210> 353
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 353
 guguguuuugu uguuuguuu 19
 <210> 354
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 354
 uugugugcca accugaugc 19
 <210> 355
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 355
 aucguguacu gcagaguug 19
 <210> 356
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 356
 ccaucgugua cugcagagu 19

<210> 357

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 357

acuugaaaaa uuacaccug 19

<210> 358

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 358

ugaggaugaa cacuugugu 19

<210> 359

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 359

accuggcagc ugcguuuuaa 19

<210> 360

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 360

cagagacgac ugaacuuuu 19

<210> 363

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 361
 aagacagaga cgacugaac 19
 <210> 362
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 362
 gcagcugcgu uuaagccuu 19
 <210> 363
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 363
 aggaagcuca uugaguugu 19
 <210> 364
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 364
 guguuuccca ggaagcuca 19
 <210> 365
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 365
 gacgacugaa cuuuugggg 19
 <210> 366
 <211> 19

<212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 366
 acagagacga cugaacuuu 19
 <210> 367
 <211.> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 367
 aggaugaaca cuugugugc 19
 <210> 368
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 368
 cugaggauga acacuugug 19
 <210> 369
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 369
 ucugggucuu ccaucuaga 19
 <210> 370
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 370
 aucugggucu uccaucuag 19

<210> 371

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 371

gaagggacca aguguguuu 19

<210> 372

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 372

aaggcuuagg ggccaacaa 19

<210> 373

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 373

uucccaggaa gcucauuga 19

<210> 374

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 374

ugggcaaaga acuacugcg 19

<210> 375

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 375

ggugggcaaa gaacuacug

19

<210> 376

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 376

gugggcaaag aacuacugc

19

<210> 377

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 377

ugccuagcca guugguaag

19

<210> 378

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 378

aagccaggug ggcaaagaa

19

<210> 379

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 379

augccuagcc aguugguaa

19

<210> 380

<211> 19

<212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 380
 uuccgaguca ucaagaaga 19
 <210> 381
 <211> 39
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 381
 gacgcaugaa uguaagagu 19
 <210> 382
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 382
 uacagacgca ugaauguua 19
 <210> 383
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 383
 guguguagca uguaccuua 19
 <210> 384
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 384
 acgcaugaau guaagagua 19

<210> 385

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 385

aucuuacaga cgcaugaau 19

<210> 386

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 386

agacgcauga auguaagag 19

<210> 387

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 387

cuaucuuaca gacucauga 19

<210> 388

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 388

caucacuac ugaccuguu 19

<210> 389

<211> 19.

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 389
 ggagcaucac uacugaccu 19
 <210> 390
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 390
 augaaacaaa ggcuuaggg 19
 <210> 391
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 391
 agcuaucua cagacgcau 19
 <210> 392
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 392
 uaggcagcua ucuuacaga 19
 <210> 393
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 393
 accuguugua ggcagcuau 19
 <210> 394
 <211> 19

<212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 394
 agcaucacua cugaccugu 19
 <210> 395
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 395
 ucugaucgga gcaucacua 19
 <210> 396
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 396
 ugacaguuaa caguggugu 19
 <210> 397
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 397
 cugacaguua acaguggug 19
 <210> 398
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> HOMO sapiens
 <400> 398
 guuacugaca guuaacagu 19

210> 399

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 399

uuguuacuga caguuaaca 19

<210> 400

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 400

uacucacugu ucaugaaua 19

<210> 401

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 401

ucacuuggga ucuuugaca 19

<210> 402

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 402

acagacgcau gaauguaag 19

<210> 403

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 403

cagcuaucuu acagacgca 19

<210> 404

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 404

ucacuacuga ccuguugua 19

<210> 405

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 405

gagcaucacu acugaccug 19

<210> 406

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 406

guguaucua cuggucuga 19

<210> 407

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 407

gugguuugug uaucuuacu 19

<210> 408

<211> 19

<212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 408
 acaguuaaca gugguguga 19
 <210> 409
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 409
 aacugaggca gccaccuaa 19
 <210> 410
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 410
 uguucaugaa uacacuuga 19
 <210> 411
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 411
 cuguucauga auacacuug 19
 <210> 412
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 412
 agauacucac uguucauga 19

<210> 413

<211> 19

<212> RNA

<213> HOmO sapiens

<400> 413

cagacgcaug aauguaaga 19

<210> 414

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 414

gcagcuaucu uacagacgc 19

<210> 415

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 415

ggcagcuauc uuacagacg 19

<210> 416

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 416

gguuugugua ucuuacugg 19

<210> 417

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 417	
gaggugguuu guguaucuu	19
<210> 418	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 418	
guggaggugg uuuguguau	19
<210> 419	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 419	
uacugacagu uaacagugg	19
<210> 420	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 420	
guguagcaug uaccuuauu	19
<210> 421	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 421	
aggugggcaa agaacuacu	19
<210> 422	
<211> 19	

<212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 422
 gugacccuga ggaugaaca 19
 <210> 423
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 423
 caggugggca aagaacuac 19
 <210> 424
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 424
 ccaggugggc aaagaacua 19
 <210> 425
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 425
 auccaggggc uguuuagcu 19
 <210> 426
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 426
 aagauccagg ggcuguuua 19

<210> 427

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 427

gcaugaaaca aaggcuuag 19

<210> 428

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 428

agcaugaaac aaaggcuua 19

<210> 429

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 429

uacuguagca ugaaacaaa 19

<210> 430

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 430

uagcaugaaa caaaggcuu 19

<210> 431

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

400> 431

guagcaugaa acaaaggcu 19

<210> 432

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 432

caguacugua gcaugaaac 19

<210> 433

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 433

guacuguagc augaaacaa 19

<210> 434

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 434

ucaguacugu agcaugaaa 19

<210> 435

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 435

uguagcauga aacaaaggc 19

<210> 436

<211> 19

<212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 436
 acuguagcau gaaacaaag 19
 <210> 437
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 437
 cuguagcaug aaacaaagg 19
 <210> 438
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 438
 aguacuguag caugaaaca 19
 <210> 439
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 439
 ccucaguacu guagcauga 19
 <210> 440
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 440
 cucaguacug uagcaugaa 19

<210> 441

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 441

ugccaggugu aaauuuuca 19

<210> 442

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 442

guguaauuuu ucaaguguc 19

<210> 443

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 443

agguguaauu uuucaagug 19

<210> 444

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 444

aagccuuguu ggccccuaa 19

<210> 445

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 445
gguguaauuu uucaagugu 19
<210> 446
<211> 19
<212> RNA
<213> Homo sapiens
<400> 446
aaguguucau ccucagggg 19
<210> 447
<211> 19
<212> RNA
<213> Homo sapiens
<400> 447
cagcucaacu cugcaguac 19
<210> 448
<211> 19
<212> RNA
<213> Homo sapiens
<400> 448
gcucaacucu gcaguacac 19
<210> 449
<211> 19
<212> RNA
<213> Homo sapiens
<400> 449
aaacaaacaa caaacacac 19
<210> 450
<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 450

gcaucagguu ggcacacaa 19

<210> 451

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 451

caacucugca guacacgau 19

<210> 452

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 452

acucugcagu acacgaugg 19

<210> 453

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 453

cagguguaau uuuucaagu 19

<210> 454

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 454

acacaagugu ucauccuca 19

<210> 455

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 455

uuaaacgcag cugccaggu

19

<210> 456

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 456

aaaaguucag ucgucucug

19

<210> 457

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 457

guucagucgu cucugucuu

19

<210> 458

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 458

aaggcuuaaa cgcagcugc

19

<210> 459

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 459
 acaacucaau gagcuuccu 19
 <210> 460
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 460
 ugagcuuccu gggaaacac 19
 <210> 461
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 461
 ccccaaaagu ucagucguc 19
 <210> 462
 <<211.> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 462
 aaaguucagu cgucucugu 19
 <210> 463
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 463
 gcacacaagu guucauccu 19
 <210> 464
 <211> 19

<212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 464
 cacaaguguu cauccucag 19
 <210> 465
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 465
 ucuagaugga agacccaga 19
 <210> 466
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 466
 cuagauggaa gacccagau 19
 <210> 467
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 467
 aaacacacuu ggucccuuc 19
 <210> 468
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 468
 uuguuggccc cuaagccuu 19

<210> 469

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 469

ucaaugagcu uccugggaa 19

<210> 470

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 470

cgcaguaguu cuuugccca 19

<210> 471

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 471

caguaguucu uugcccacc 19

<210> 472

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 472

gcaguaguuc uuugcccac 19

<210> 473

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 473

cuuaccaacu ggcuaggca 19

<210> 474

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 474

uucuuugccc accuggcuu 19

<210> 475

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 475

uuaccaacug gcuaggcau 19

<210> 476

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 476

ucuucuugau gacucggaa 19

<210> 477

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 477

acucuuaacau ucaugcguc 19

<210> 478

<211> 19

<212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 478
 uuacauucau gcgucugua 19
 <210> 479
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 479
 uaagguacau gcuacacac 19
 <210> 480
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 480
 uacucuuaca uucaugcgu 19
 <210> 481
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 481
 auucaugcgu cuguaagau 19
 <210> 482
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 482
 cucuuacauu caugcgucu 19

<210> 483

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 483

ucaugcgucu guaagauag 19

<210> 484

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> .484

aacaggucag uagugaugc 19

<210> 485

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 485

aggucaguag ugaugcucc 19

<210> 486

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 486

cccuaagccu uuguuucau 19

<210> 487

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 487

augcgucugu aagauagcu 19

<210> 488

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 488

ucuguaagau agcugccua 19

<210> 489

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 489

auagcugccu acaacaggu 19

<210> 490

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 490

acaggucagu agugaugcu 19

<210> 491

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 491

uagugaugcu ccgaucaga 19

<210> 492

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 492

acaccacugu uaacuguca 19

<210> 493

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 493

caccacuguu aacugucag 19

<210> 494

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 494

acuguuaacu gucaguaac 19

<210> 495

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 495

uguuaacugu caguaacaa 19

<210> 496

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 496

uauucaugaa cagugagua 19

<210> 497

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 497

ugucaaagau cccaaguga 19

<210> 498

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 498

cuuacauuca ugcgucugu 19

<210> 499

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 499

ugcgucugua agauagcug 19

<210> 500

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 500

uacaacaggu caguaguga 19

<210> 501

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 501
 caggucagua gugaugcuc 19
 <210> 502
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> HOMO sapiens
 <400> 502
 ucagaccagu aagauacac 19
 <210> 503
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 503
 aguaagauac acaaaccac 19
 <210> 504
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 504
 ucacaccacu guuaacugu 19
 <210> 505
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 505
 uuagguggcu gccucaguu 19
 <210> 506
 <211> 19

<212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 506
 ucaaguguau ucaugaaca 19
 <210> 507
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 507
 caaguguauu caugaacag 19
 <210> 508
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 508
 ucaugaacag ugaguaucu 19
 <210> 509
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 400> 509
 ucuuacauuc augcgucug 19
 <210> 510
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 510
 gcgucuguuaa gauagcugc 19

<210> 511

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 511

cgucuguaag auagcugcc 19

<210> 512

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 512

ccaguaagau acacaaacc 19

<210> 513

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 513

aagauacaca aaccaccuc 19

<210> 514

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 514

auacacaaac caccuccac 19

<210> 515

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 515

ccacuguuaa cugucagua 19

<210> 516

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 516

aaauaagguac augcuacac 19

<210> 517

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 517

aguaguucuu ugcccaccu 19

<210> 518

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 518

uguucauccu cagggucac 19

<210> 519

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 519

guaguucuuu gcccaccug 19

<210> 520

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 520

uaguucuuug cccaccugg 19

<210> 521

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 521

agcuaaacag ccccuggau 19

<210> 522

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 522

uaaacagccc cuggaucuu 19

<210> 523

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 523

cuaagccuuu guuucaugc 19

<210> 524

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 524

uaagccuuug uuucaugcu 19

<210> 525

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 525

uuuguuucau gcuacagua 19

<210> 526

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 526

aagccuuugu uucaugcua 19

<210> 527

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 527

agccuuuguu ucaugcuac 19

<210> 528

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 528

guuucaugcu acaguacug 19

<210> 529

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 529	
uuguuucaug cuacaguac	19
<210> 530	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 530	
uuucaugcua caguacuga	19
<210> 531	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 531	
gccuuuguuu caugcuaca	19
<210> 532	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 532	
cuuuguuuca ugcuaacagu	19
<210> 533	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 533	
ccuuuguuuc augcuacag	19
<210> 534	
<211> 19	

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 534

uguuucaugc uacaguacu 19

<210> 535

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 535

ucaugcuaca guacugagg 19

<210> 536

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens



REIVINDICAÇÕES

1. Método de tratar um paciente que sofre de uma desordem do ouvido, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende administrar ao paciente uma composição farmacêutica compreendendo um inibidor do polipeptídeo RTP801 em uma quantidade efetiva para tratar o paciente.

2. Método de tratar um paciente que sofre de uma úlcera de pressão, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende administrar ao paciente uma composição farmacêutica compreendendo um inibidor do polipeptídeo RTP801 em uma quantidade efetiva para tratar o paciente.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a desordem do ouvido é trauma acústico.

4. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o inibidor compreende um polinucleotídeo que compreende nucleotídeos consecutivos tendo uma sequência de comprimento e homologia suficientes a uma sequência presente na sequência de um gene que codifica RTP801 da forma apresentada na SEQ ID NO:1 para permitir hibridização do inibidor para o gene e prevenir expressão de RTP801 no paciente.

5. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o inibidor compreende um anticorpo que especificamente se liga a um epítopo presente em um polipeptídeo RTP801 que compreende aminoácidos consecutivos, a sequência dos quais é apresentada na figura 2 (SEQ ID No:2) e inibe a atividade do polipeptídeo RTP801 no paciente.

6. Método para tratar um paciente que sofre de uma desordem do ouvido ou uma úlcera de pressão, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende administrar ao paciente uma composição farmacêutica compreendendo uma
5 quantidade terapeuticamente efetiva de um Inibidor de polinucleotídeo RTP801 de maneira a, desta forma, tratar o paciente.

7. Método, de acordo com a reivindicação 6, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o polinucleotídeo é um siRNA.
10 NA.

8. Método, de acordo com a reivindicação 7, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o siRNA compreende nucleotídeos consecutivos tendo uma sequência idêntica a qualquer sequência apresentada em qualquer uma das tabelas A-D (SEQ
15 ID NOs:3-536).

9. Método, de acordo com a reivindicação 6, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o inibidor é selecionado do grupo que consiste em um siRNA, um vetor compreendendo um siRNA, um vetor que expressa um siRNA e uma molécula que é
20 endogenamente processada em um siRNA.

10. Uso de uma quantidade terapeuticamente efetiva de um inibidor de RTP801, **CARACTERIZADO** pelo fato de que é para a preparação de um medicamento para promover recuperação em um paciente que sofre de uma desordem do ouvido.

25 11. Uso de uma quantidade terapeuticamente efetiva de um inibidor de RTP801, **CARACTERIZADO** pelo fato de que é para a preparação de um medicamento para promover recuperação em um paciente que sofre de uma úlcera de pressão.

12. Uso, de acordo com a reivindicação 10, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a desordem do ouvido é trauma acústico.

13. Uso, de acordo com a reivindicação 10 ou 11, **5 CARACTERIZADO** pelo fato de que o inibidor compreende um polinucleotídeo que compreende nucleotídeos consecutivos tendo uma sequência de comprimento e homologia suficientes para uma sequência presente na sequência de um gene que codifica RTP801 da forma apresentada na SEQ ID NO:1 para permitir **10** hibridização do inibidor para o gene e prevenir expressão de RTP801 no paciente.

14. Uso, de acordo com a reivindicação 10 ou 11, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o inibidor de RTP801 é um anticorpo que especificamente se liga a um epítopo presente **15** em um polipeptídeo RTP801 que compreende aminoácidos consecutivos, a sequência dos quais é apresentada na figura 2 (SEQ ID No:2) e inibe a atividade do polipeptídeo RTP801 no paciente.

15. Uso, de acordo com a reivindicação 10 ou 11, **20 CARACTERIZADO** pelo fato de que o polinucleotídeo infraregula a expressão de um gene RTP801.

16. Uso, de acordo com a reivindicação 10 ou 11, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o polinucleotídeo é um siRNA.

25 17. Uso, de acordo com a reivindicação 16, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o siRNA compreende nucleotídeos consecutivos tendo uma sequência idêntica a qualquer sequência apresentada em qualquer uma das tabelas A-D (SEQ

ID NOs:3-536).

18. Uso, de acordo com a reivindicação 14, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o inibidor é selecionado do grupo que consiste em um siRNA, um vetor compreendendo um
5 siRNA, um vetor que expressa um siRNA e uma molécula que é endogenamente processada em um siRNA.

19. Método para tratar um paciente que sofre de uma condição selecionada de uma desordem respiratória, uma doença dos olhos, uma desordem microvascular, ou uma injúria
10 ou doença da medula óssea, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende administrar ao paciente uma composição farmacêutica compreendendo uma quantidade terapeuticamente efetiva de um siRNA que inibe expressão de um gene RTP801 compreendendo nucleotídeos consecutivos tendo uma sequência idêntica a qual-
15 quer sequência apresentada na tabela D (SEQ ID NOs: 345-536) de maneira a, desta forma, tratar o paciente.

20. Método, de acordo com a reivindicação 19, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a condição é uma doença dos olhos.

20 21. Método, de acordo com a reivindicação 20, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a doença dos olhos é degeneração macular.

22. Método, de acordo com a reivindicação 19, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a condição é uma desordem
25 respiratória.

23. Método, de acordo com a reivindicação 22, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a desordem respiratória é COPD.

24. Método, de acordo com a reivindicação 22, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a desordem respiratória é asma.

25. Método, de acordo com a reivindicação 22, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a desordem respiratória é bronquite crônica.

26. Método, de acordo com a reivindicação 22, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a desordem respiratória é enfisema.

27. Método, de acordo com a reivindicação 19, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a condição é uma desordem microvascular.

28. Método, de acordo com a reivindicação 27, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a desordem microvascular é retinopatia diabética.

29. Método, de acordo com a reivindicação 27, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a desordem microvascular é falha renal aguda.

30. Uso de uma quantidade terapeuticamente efetiva de um siRNA que inibe a expressão de um gene RTP801, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende nucleotídeos consecutivos tendo uma sequência idêntica a qualquer sequência apresentada na tabela D (SEQ ID NOs: 345-536) para a preparação de um medicamento para promover recuperação em um paciente que sofre de uma condição selecionada de uma desordem respiratória, uma doença dos olhos, uma desordem microvascular ou uma injúria ou doença da medula óssea.

31. Uso, de acordo com a reivindicação 30,

CARACTERIZADO pelo fato de que a condição é uma doença dos olhos.

32. Uso, de acordo com a reivindicação 31, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a doença dos olhos é degeneração macular.

33. Uso, de acordo com a reivindicação 30, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a condição é uma desordem respiratória.

34. Uso, de acordo com a reivindicação 33, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a desordem respiratória é COPD.

35. Uso, de acordo com a reivindicação 33, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a desordem respiratória é asma

36. Uso, de acordo com a reivindicação 33, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a desordem respiratória é bronquite crônica.

37. Uso, de acordo com a reivindicação 33, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a desordem respiratória é enfisema.

38. Uso, de acordo com a reivindicação 30, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a condição é uma desordem microvascular.

39. Uso, de acordo com a reivindicação 38, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a desordem microvascular é retinopatia diabética.

40. Uso, de acordo com a reivindicação 38, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a desordem microvascular é

falha renal aguda.

41. Composto, **CARACTERIZADO** pelo fato de que tem a estrutura:

5' (N)_x - Z3' (fita antisentido)

5 3' Z'-(N')_y 5' (fita sentido)

em que cada N e N' é um ribonucleotídeo que pode ser modificado ou não modificado em seu resíduo de açúcar e (N), e (N')_y é oligômero em que cada N ou N' consecutivo é unido ao próximo N ou N' por uma ligação covalente;

10 em que cada um de x e y é um número inteiro entre 19 e 40;

em que cada um de Z e Z' pode estar presente ou ausente, mas se presente é dTdT e é covalentemente anexado ao 3' terminus da fita em que ele está presente;

15 e em que a seqüência de (N)_x compreende uma das seqüências presentes na tabela D.

42. Composto, de acordo com a reivindicação 41, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a ligação covalente é uma ligação fosfodiéster, em que x = y, preferivelmente em que 20 x = y = 19, em que Z e Z' são ambos ausentes, em que pelo menos um ribonucleotídeo é modificado no seu resíduo de açúcar na posição 2', em que a fração na posição 2' é metóxi (2'-O-metila) em que ribonucleotídeos que alternam são modificados tanto nas fitas antisentido quanto sentido e em 25 que os ribonucleotídeos nas posições 5' e 3' termini da fita antisentido são modificados em seus resíduos de açúcar, e os ribonucleotídeos no 5' e 3' termini da fita sentido são não modificados nos seus resíduos de açúcar.

43. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 41-42, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a sequência de (N)_x compreende a sequência antisentido No. 257 da tabela D (SEQ ID NO:525) ou a sequência antisentido No. 260 da tabela D (SEQ ID NO:528).

44. Composto, de acordo com a reivindicação 43, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o composto não tem um fosfato terminal.

45. Composto, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende um oligorribonucleotídeo em que uma fita compreende nucleotídeos consecutivos tendo, de 5' a 3', a sequência apresentada na SEQ ID NOS: 441-536 ou um homólogo deste em que em até 2 dos nucleotídeos em cada região terminal a base é alterada.

46. Composto, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende um oligorribonucleotídeo em que uma fita compreende nucleotídeos consecutivos tendo, de 5' a 3', a sequência apresentada em SEQ ID NOS 345-440 em que uma pluralidade de bases pode ser modificada, preferivelmente por uma modificação 2-O-metila, ou um homólogo deste em que em até 2 dos nucleotídeos em cada região terminal uma base é alterada.

47. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 41-46, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende um grupo 2' O-Me no primeiro, terceiro, quinto, sétimo, nono, décimo primeiro, décimo terceiro, décimo quinto, décimo sétimo e décimo nono nucleotídeo da fita antisentido e o segundo, quarto, sexto, oitavo, décimo, décimo segundo, décimo quarto, décimo sexto e décimo oitavo nucleotídeo da fita sen-

tido.

48. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 41-47, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o composto é fosforilado ou não fosforilado.

5 49. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 41-48, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o dinucleotídeo dTdT é covalentemente anexado ao 3' terminus.

50. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 41-49, **CARACTERIZADO** pelo fato de que em pelo
10 menos um nucleotídeo um resíduo de açúcar é modificado.

51. Composto, de acordo com a reivindicação 50, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a modificação é uma modificação 2'-O-metila.

52. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 41-51, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o grupo
15 2' OH é substituído por um grupo ou fração selecionado do grupo que compreende -H-OCH₃, -OCH₂CH₃, -OCH₂CH₂ 20 CH₃, -NH₂, e F.

53. Método de tratar um paciente que sofre de uma
20 condição selecionada de uma desordem respiratória, uma doença dos olhos, uma desordem microvascular, uma desordem do ouvido, um úlcera de pressão ou um injúria ou doença da medula óssea, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende administrar
ao paciente uma composição farmacêutica compreendendo um
25 composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 41-52, em uma quantidade terapeuticamente efetiva de maneira a, desta forma, tratar o paciente.

54. Método, de acordo com a reivindicação 53,

CARACTERIZADO pelo fato de que a condição é a doença dos olhos AMD.

55. Método, de acordo com a reivindicação 53, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a condição é a desordem de trauma acústico.

56. Uso de uma quantidade terapeuticamente efetiva de um composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 41-52, **CARACTERIZADO** pelo fato de que é para a preparação de um medicamento para promover recuperação em um paciente que sofre de uma condição selecionada de uma desordem respiratória, uma doença dos olhos, uma desordem microvascular, uma desordem do ouvido, um úlcera de pressão ou injúria ou doença da medula óssea.

57. Composição farmacêutica, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende dois ou mais compostos, de acordo com qualquer uma das reivindicações 41-52.

58. Composição farmacêutica, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende dois ou mais compostos em que o primeiro composto é um oligorribonucleotídeo da tabela D e o segundo composto é um oligorribonucleotídeo de acordo com qualquer uma das tabelas A-C ou um anticorpo ou aptâmero.

59. Composição, de acordo com a reivindicação 57, **CARACTERIZADO** pelo fato de que um ou mais dos compostos é um oligorribonucleotídeo selecionado das ID No.s 257, 260-262, e 264-268 da tabela D.

60. Composição, de acordo com a reivindicação 58, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o primeiro composto é um oligorribonucleotídeo selecionado das ID No.s 257, 260-262,

e 264-268 da tabela D.

61. Composição, de acordo com a reivindicação 58, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o segundo composto é um oligorribonucleotídeo selecionado das ID Nos: 14, 22, 23, 25, 27, 39, 41, 42, 49 e 50 da tabela A.

62. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 57-61, **CARACTERIZADO** pelo fato de que os ditos dois compostos são fisicamente misturados juntos em quantidades que geram atividade benéfica.

63. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 57-61, **CARACTERIZADO** pelo fato de que os ditos dois compostos são covalentemente ou não covalentemente ligados.

64. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 57-61, **CARACTERIZADO** pelo fato de que os ditos dois compostos são unidos juntos por um ligante de ácido nucléico de um comprimento que varia de 2-100, preferivelmente 2-50 ou 2-30 nucleotídeos.

65. Uso de uma composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 57-64, **CARACTERIZADO** pelo fato de que é para o tratamento de uma desordem respiratória, uma doença dos olhos, uma desordem microvascular, uma úlcera de pressão ou uma injúria ou doença da medula óssea.

Humano RTP801 polinucleotideo (SEQ ID NO:1)

```

TTTGGCCCTC GAGGCCAGA ATTGGGACG AGGGGGGAG GTGGAGCCT GAGCCTGCA 60
CGGCTCTGG CGGCTCTCG TGGTGGCAG GGTTCGAC ACCGATTCA GCGCGGAGC 120
GCACTTCTCT TAGCGTTCT CGCTGACCG GCTAGCTGG GCTTCTACG TCGGCACTC 180
TGAGTTGATC AGCAACGCC CTGCGCTCTG TCTTACCAT GCTTAGCCT TGGGACGCT 240
TCTGCTGCTC GTCCACCTCC TCTTGGCCT GGTCTTGGC CGGAACTCC ACCCCAGATC 300
CGCGCGCGCG CTCAGCTGG GGTGGGCGA CCGGAGCA GGGGTTGAC CGCTCCAGA 360
GCTTGAGAG CTCGCACTG GATGCTCTG ACAGCAGCA CAGTGGCTC GCGCGGAGG 420
AAGACACGCG TTACTGGAT GGGGTGCTT TCGCGACTT CGAGCTGCTC AGTGACCTG 480
AGGATGAACA CTGTGTGCT AACCTGATC AGCTGCTGA CGAGGCTCT GCGCGGCGC 540
GGTGGGCTC TCGAGCCTC GCGCGCTGC TGATGCTAG CCACTTGGTA AGCGAGGTC 600
GCAAGAACT ACTGCGCTC GCTACAGCG AGCGTTCGG CTTGGGGGG GCGCTGCTG 660
AGCTTCTCT GAGGAGGCG AAGAGTCCG ACAGGCTGG CGAGCTGCA CTCGACCCCA 720
GCTGCTGCG CAGCTTCCG CTGACCTCG TCTGCGCTT GAGCTGAGA CTCTGCGCA 780
AGATCAGGG GCTGTTAGC TCGCGCACT CTGCTTCTT GCTTGGCTC AGCGAGTCC 840
TGAGCTGAG CAGTGGCTT CGAGTATCA AGAGAAAGT GZAGAGCTG GAGAGCTTC 900
TCATTTAGC CTGTTCACT TCAGCTGAG GGGGCGACA GTGCGTCCA AGACAGAGC 960
GACTGAATT TTGCGCTCA GACTAGCGC AGGAGCTAG GAGTATTC CTTGCTTGG 1020
AAACTGAGG CAGCCACTA AGTGGAGGT GGGGGAATG TGTTCGCG GAGCTCAT 1080
GAGTGTGCT GGGTGGCTG TGCAATGGG AGAGATGCC CTGACTACT TAGCTGAA 1140
CAAGGCTTA GGGGCCAAG AGGCTTCCG CTGATGTGT GTGTAGCAT TACCTTAT 1200
TTTTGTAC TGACGTTA CAGTGGTGT ACATCAGAG AGCAGCTGG CTGCTCGCG 1260
CGCAGCGCG CGCAGGCTA AGGAGAGCG AGTCTCTCT CAGCAGCGC GAGGCGAGG 1320
GGCAGTGGG AGTCTGCGA GGTGTTTGT GATCTTACT GGTCTGAGG GACCAAGCT 1380
GTTTGTGTT TGTTTGAT CTGTTTTT TATCGGAGC ATCTACTG AGCTTGTGA 1440
GGAGCTATC TTACAGAGG ATGATGTAA GATAGGAG GGTGCTGTY CAGGATCAC 1500
TTGGATCTT TGACACTGA AATTTACG CTGCGAGCT GCTTTAGCC TTCCCGCAT 1560
GTGTACTGA GATTTAGCT GCGAGGCGG GGGCTGAGG GGTGGGGCT GGAACCTCT 1620
CCCCGAGGA GTGCACTCG GGTCTTCAT CGAGAGCTT TTAGTGAAG ATAAGATCT 1680
CAGTCTCAT GATGACTT GATGTTCAG TATTAGACC TATGATAT TTTTACTT 1740
TCTATTAAG ATGTTTCTA AAACAAAAA AAAAAAAA AA 1782

```

Figura 1

Humano RTP801 polinucleotídeo (SEQ ID NO:2)

MPSLNDPES SSTSSPSL PRTTPDRFP RSANCSATRE EGFDRSTSLR 50
SSDCESLDSS NSGPGPEEDT AYLDGVSLPD FELLSDPEDE HLCANLMQLL 100
QESLAQARLG SRRPARLME SOLVSQVGKE LLRLAYSEPC GLRGALLDVC 150
VEQGRSCHSV GQLALDPSLV PTFQLTLVLR LDSRLNPKIQ GLFSSANSFP 200
LPGFSQSLTL STGFRVIRKK LYSSEQLLIE EC 232

Figura 2

Redd1 humano
NM_019058

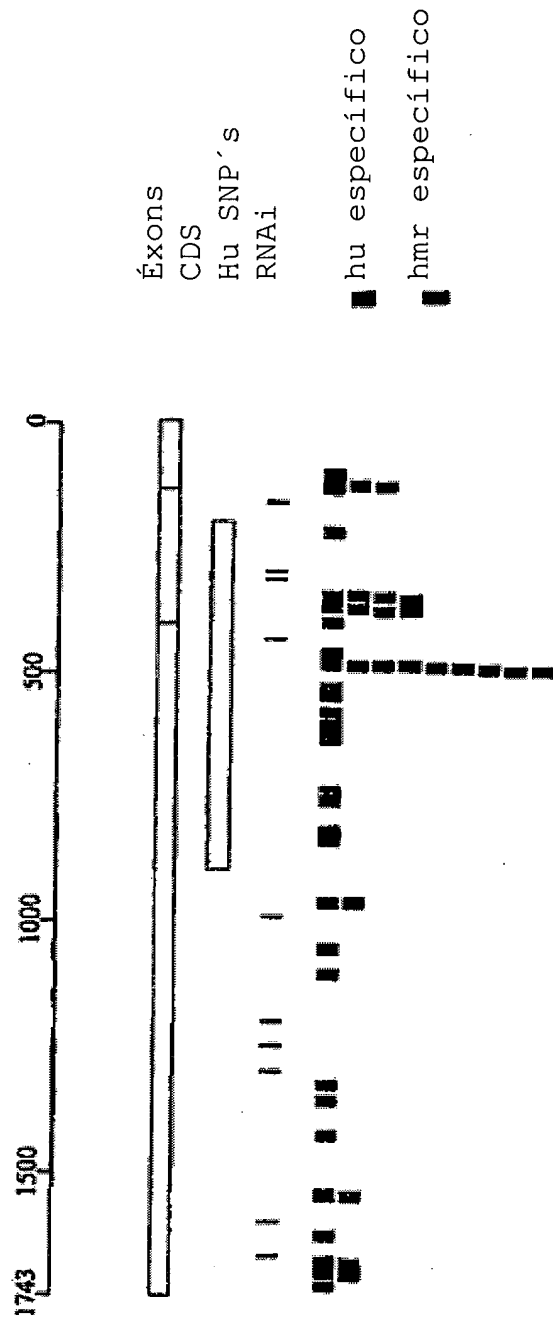
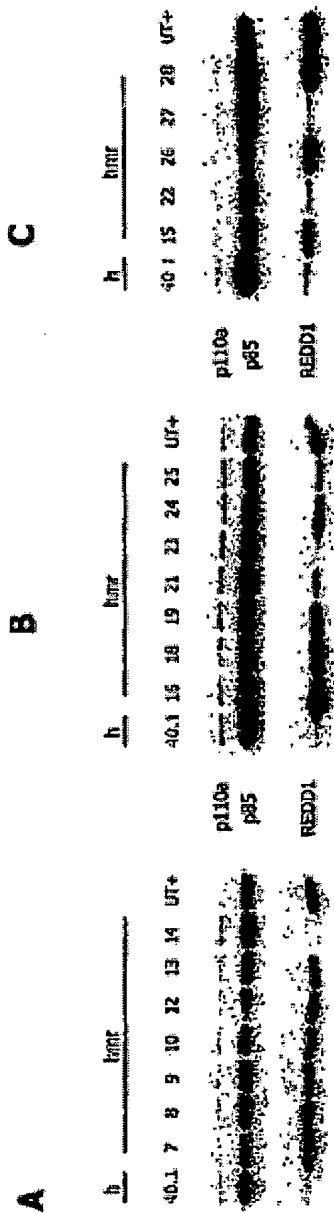


Figura 3

Experimento 1



Experimento 2

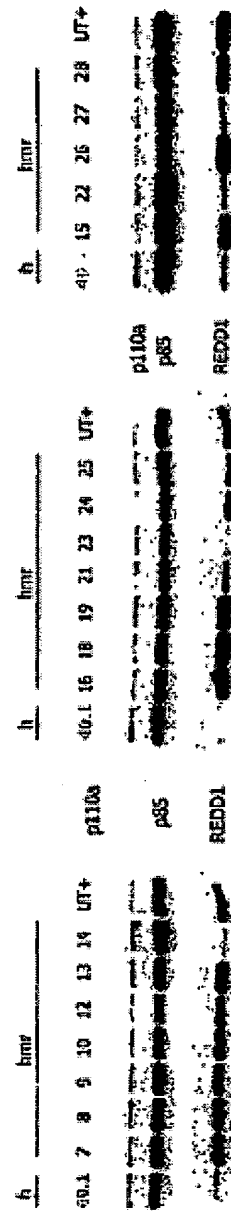


Figura 4 parte I

Experimento 1

h	h	hr	h	h	hr	h	h	hr
40.1	36	37	38	39	41	42	43	UT+
40.1	45	46	47	48	UT+			
40.1	29	30	31	32	33	34	35	UT+
40.1	45	46	47	48	UT+			

Experimento 2

[illegible]

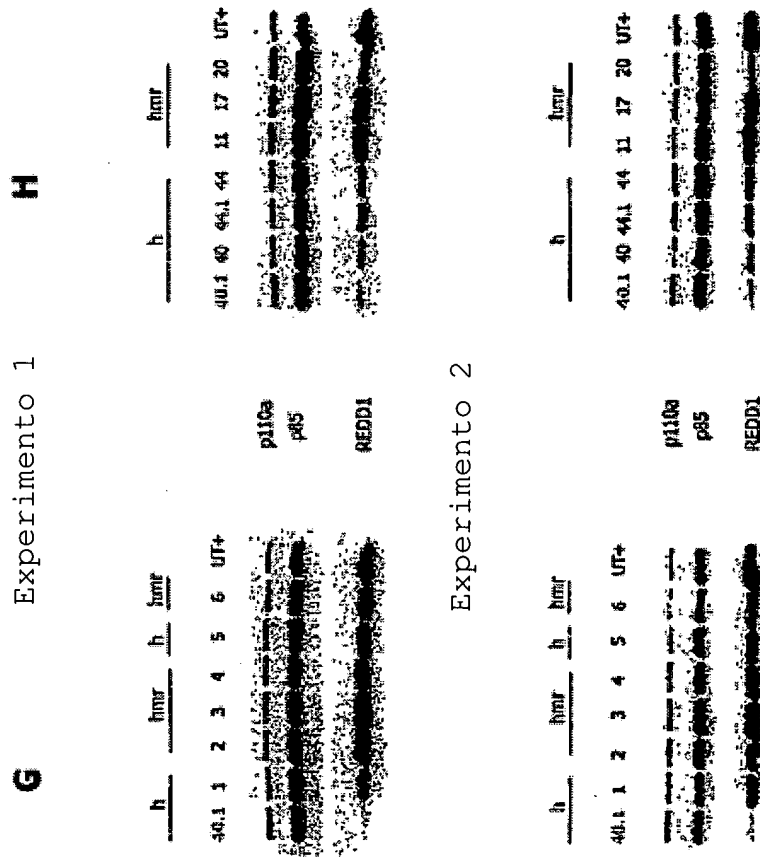
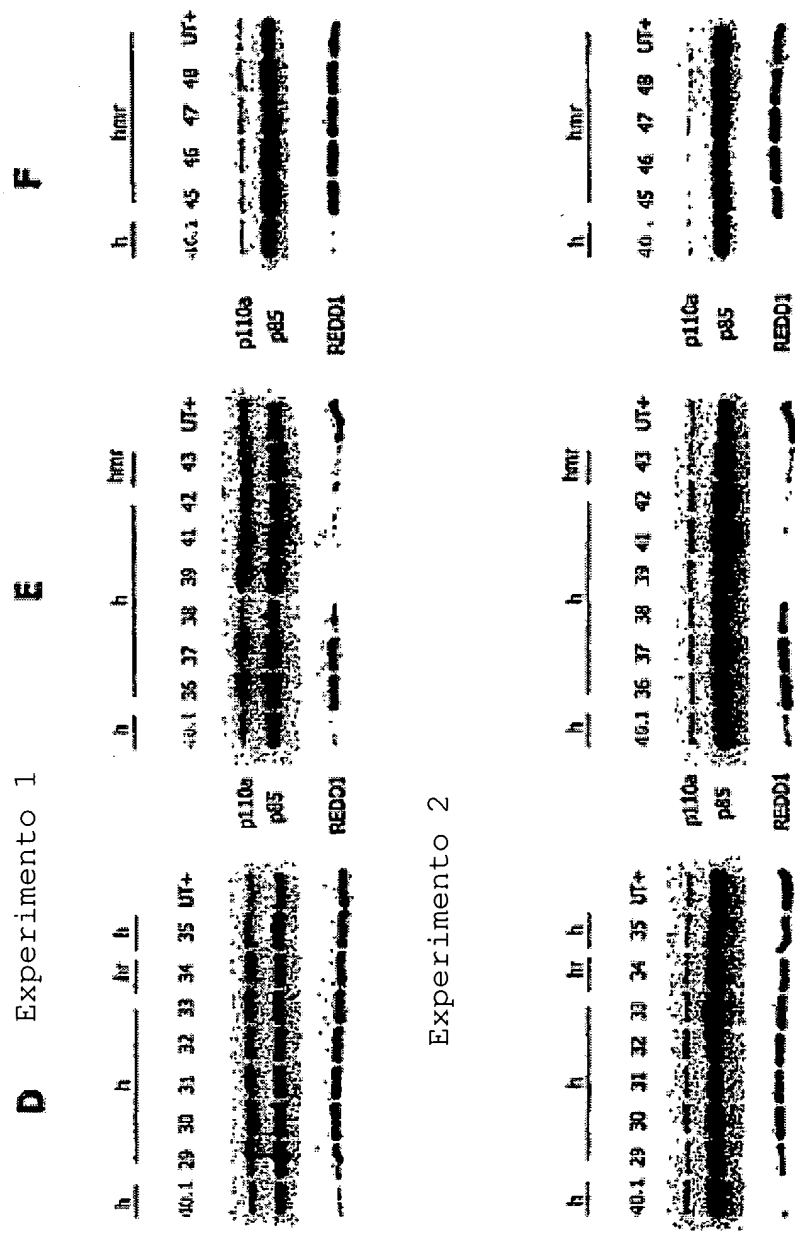


Figura 4 parte III



Experimento 2

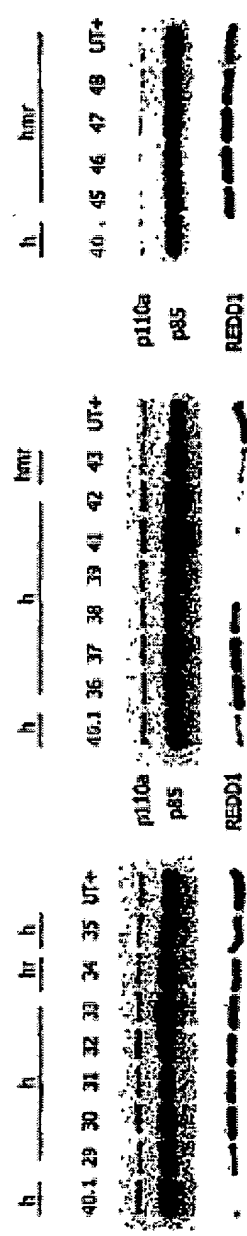


Figura 5 parte II

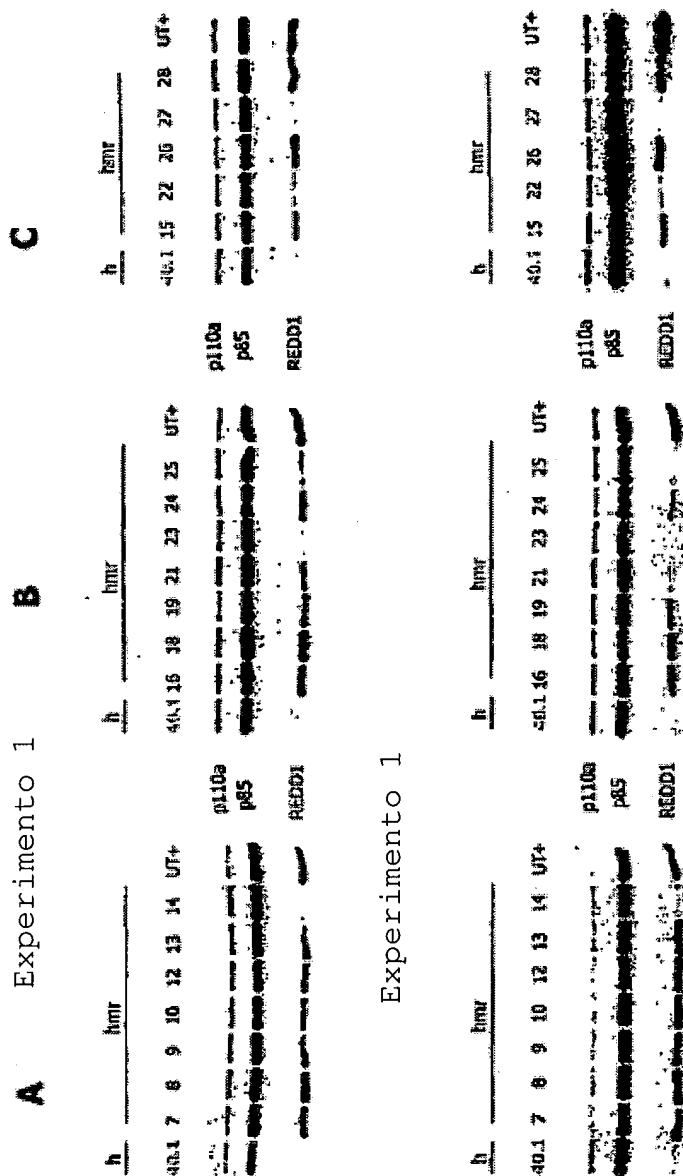
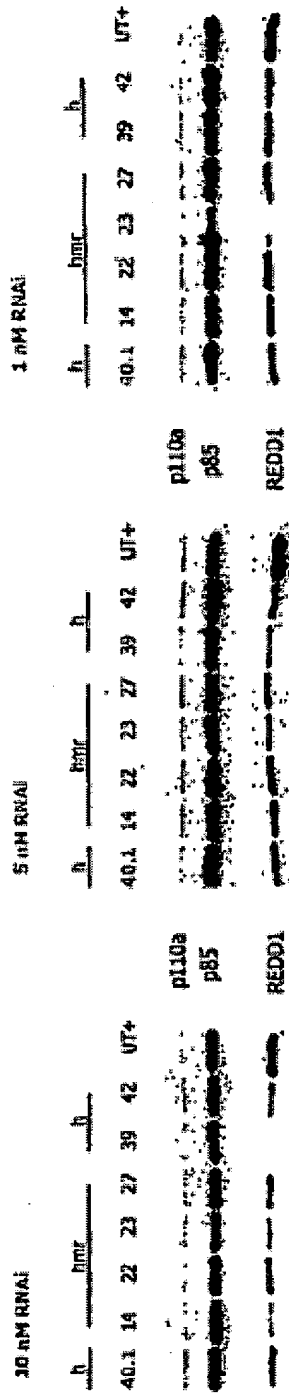


Figura 5 parte I

A Experimento 1

B

C



Experimento 2

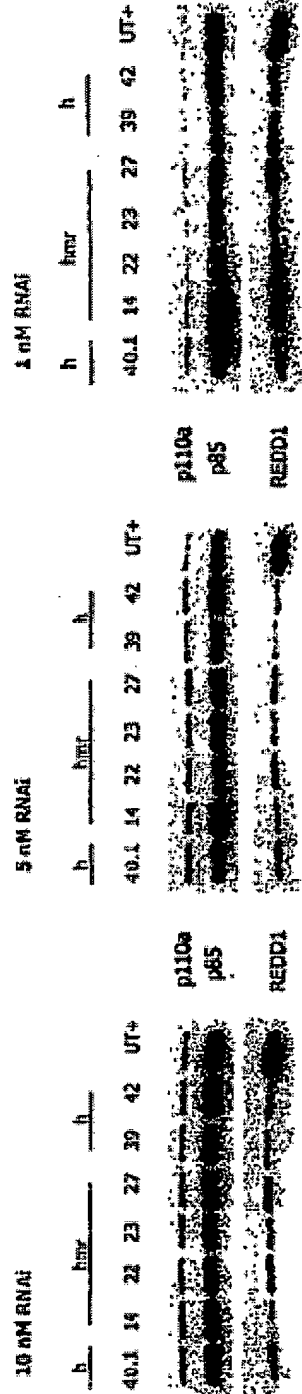


Figura 6

Experimento 1

h	hnr	h
40.1	14 22 23 27 39 42	UT+
p110a		
p85		
REDD1		

Experimento 2

h	hnr	h
40.1	14 22 23 27 39 42	UT+
p110a		
p85		
REDD1		

Figura 7

Figura 8
Extravasamento de vaso sanguíneo em camundongos KO RTP801
comparado ao controle após indução por CNV

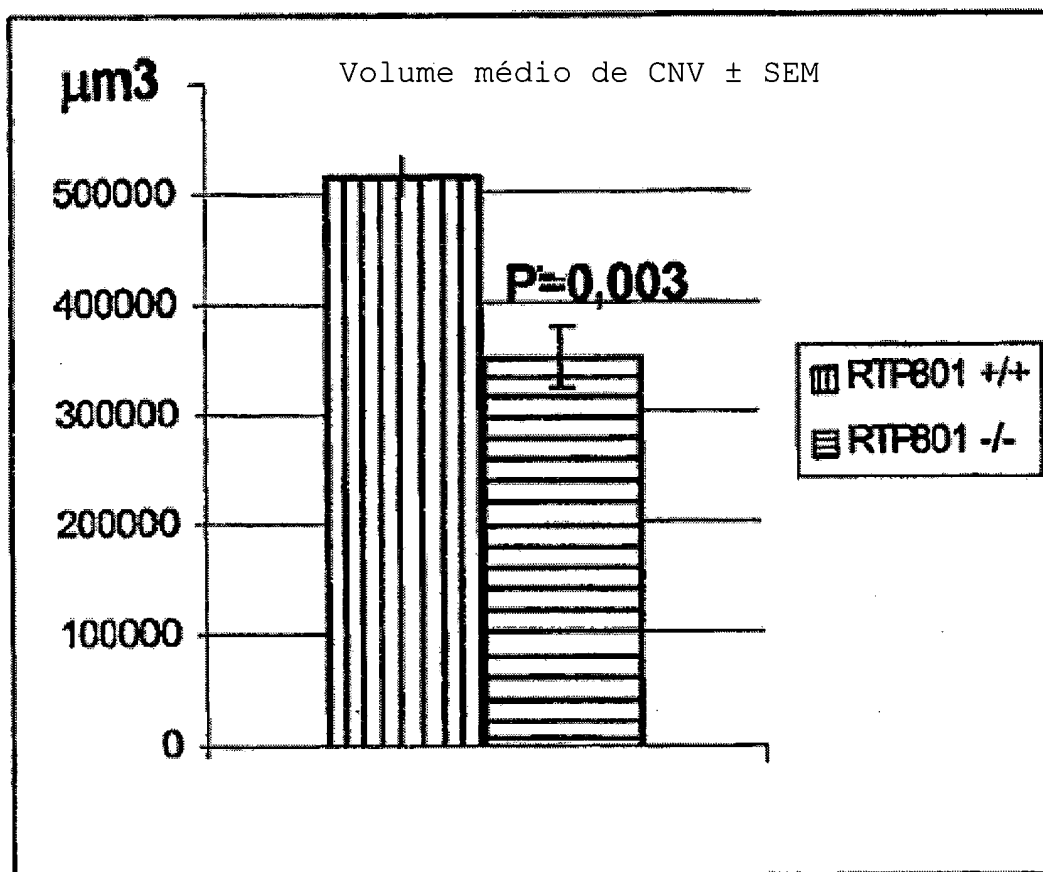


Figura 9
Redução do volume de CNV em resposta ao RNAsi de RTP801 (REDD14) comparado aos controles.

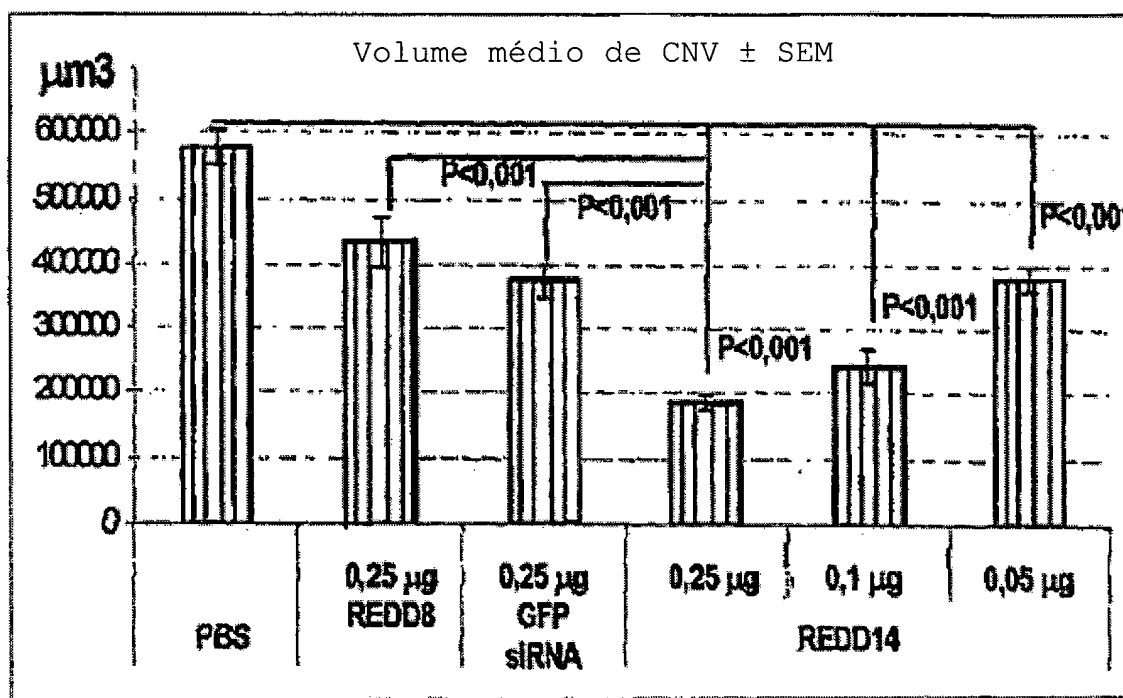


Figura 10

Redução na expressão de RTP801 nas coróides de macacos tratados com laser em resposta ao RNAsi de RTP801 comparado ao controle, medidos por PCR de tempo real.

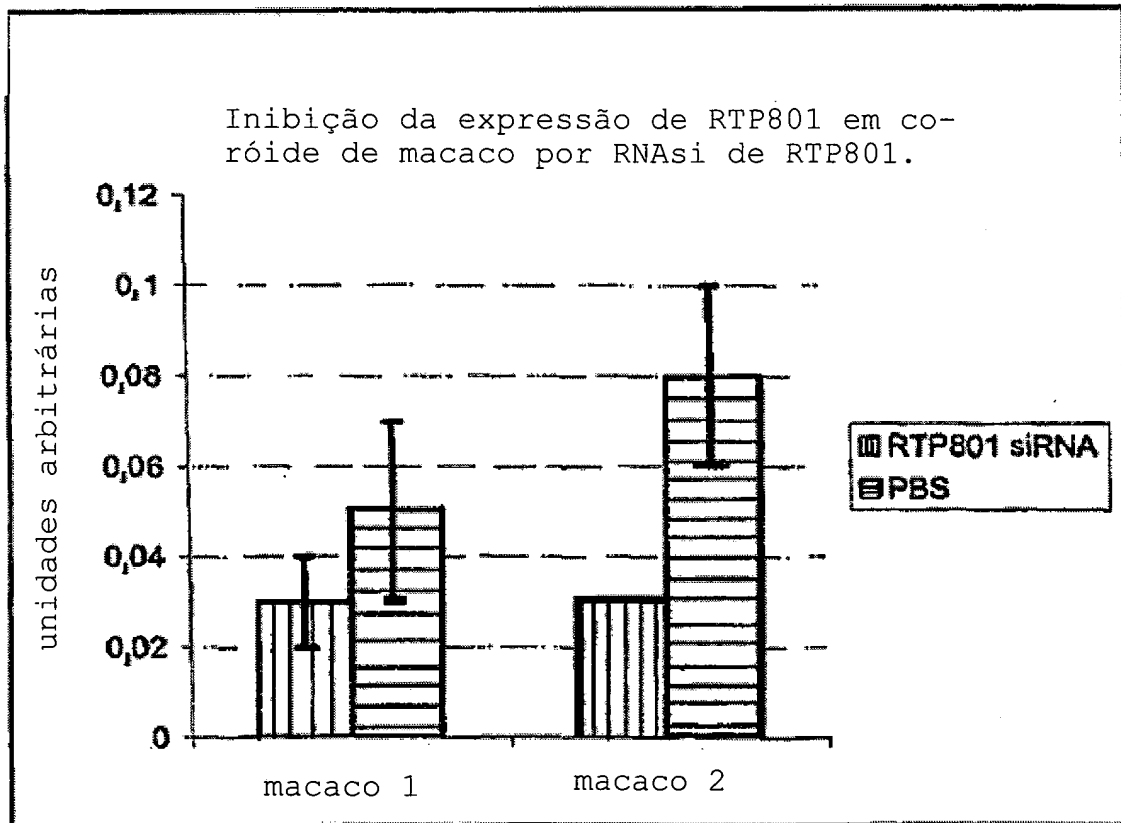


Figura 11

Redução do extravasamento em um modelo não primata CNV em resposta ao RNAsi de RTP801 comparado ao controle.

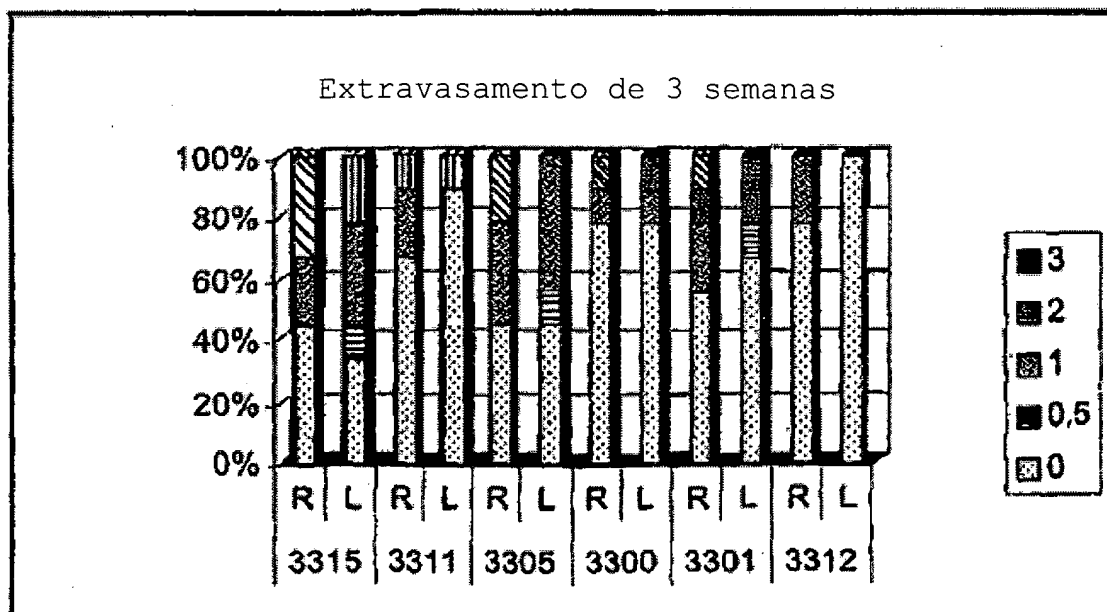
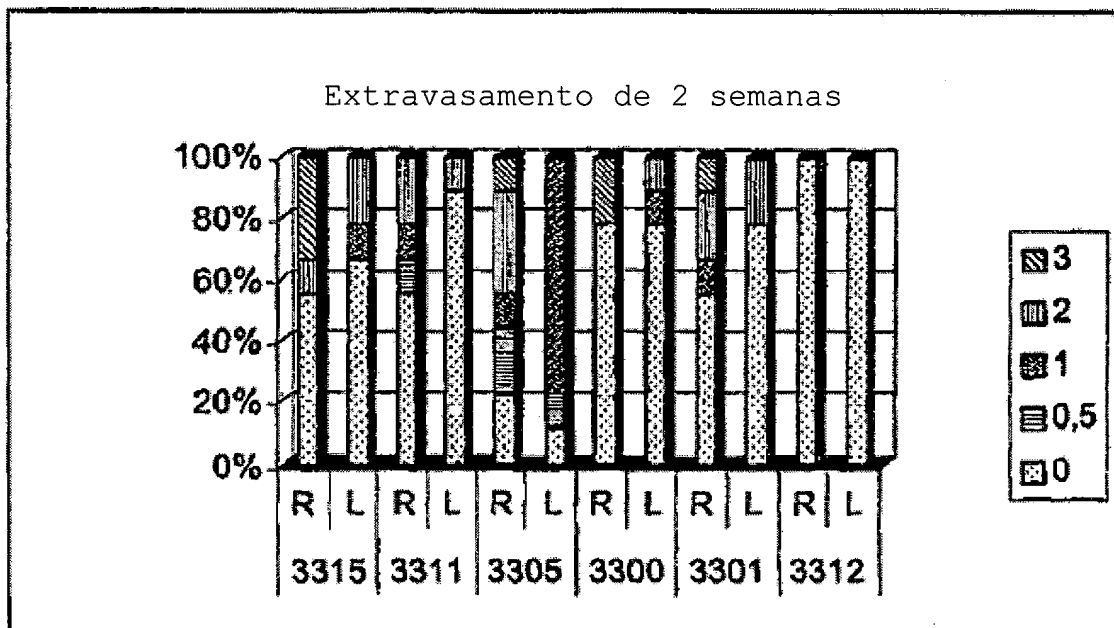


Figura 12

Redução da neovascularização em um modelo não primata CNV em resposta ao RNAsi de RTP801 comparado ao controle.

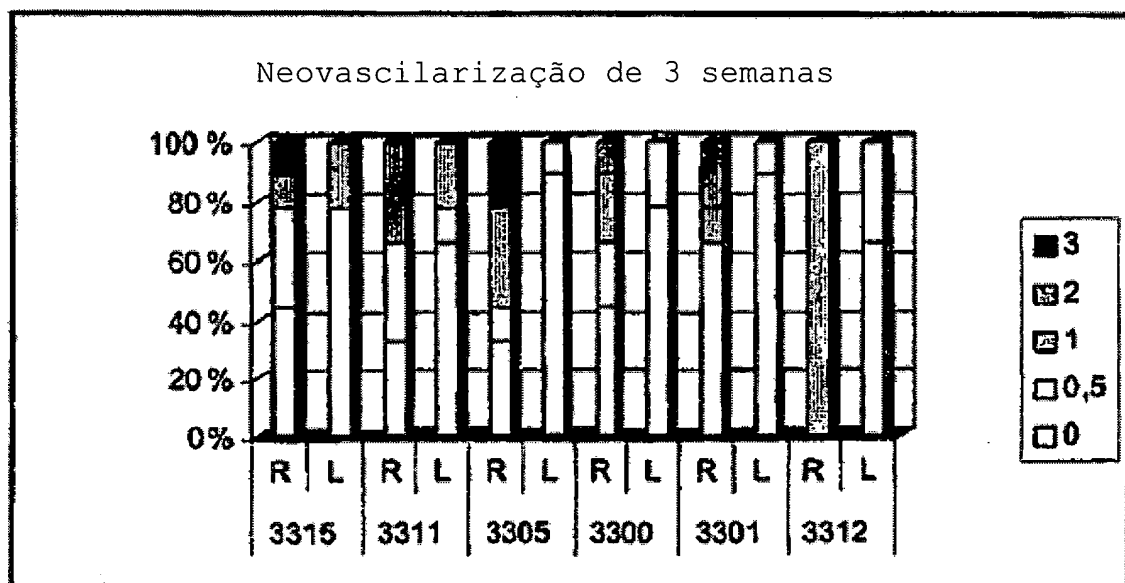
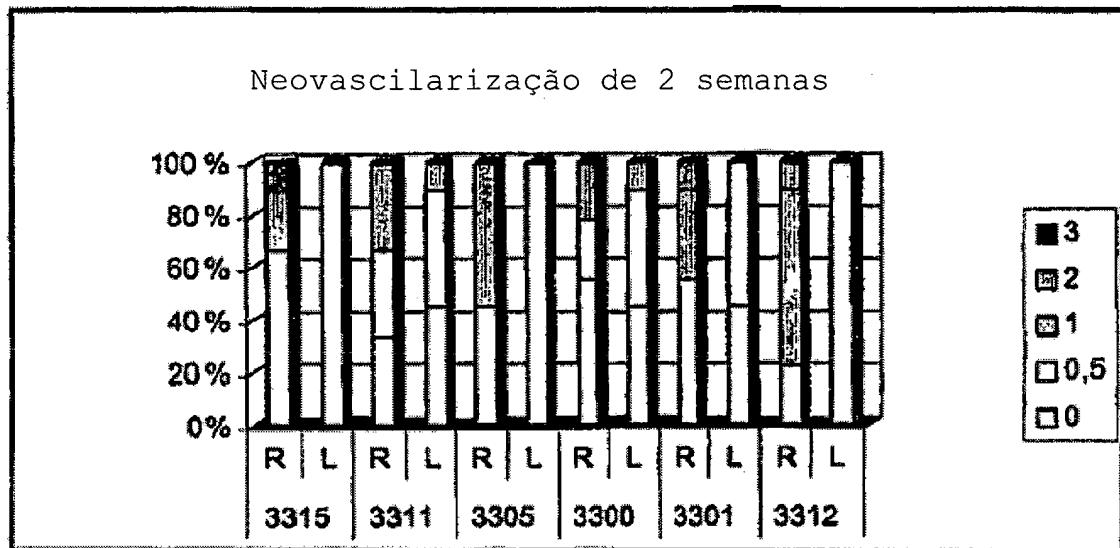
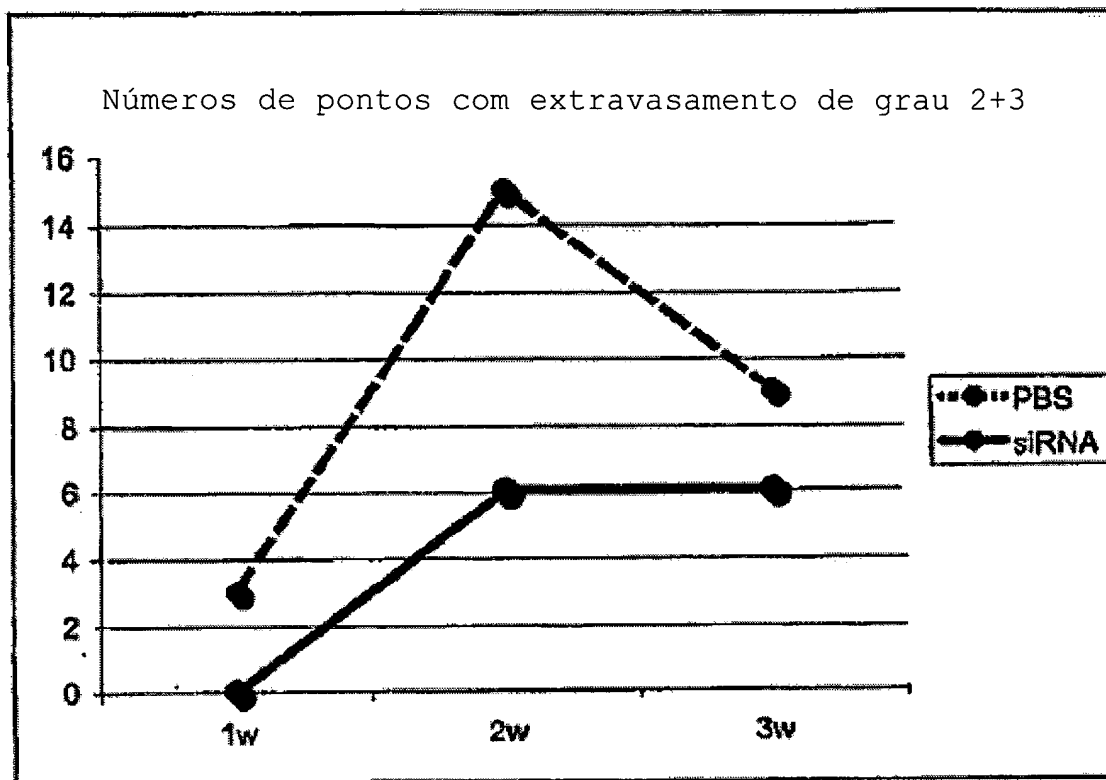


Figura 13

a)



b)

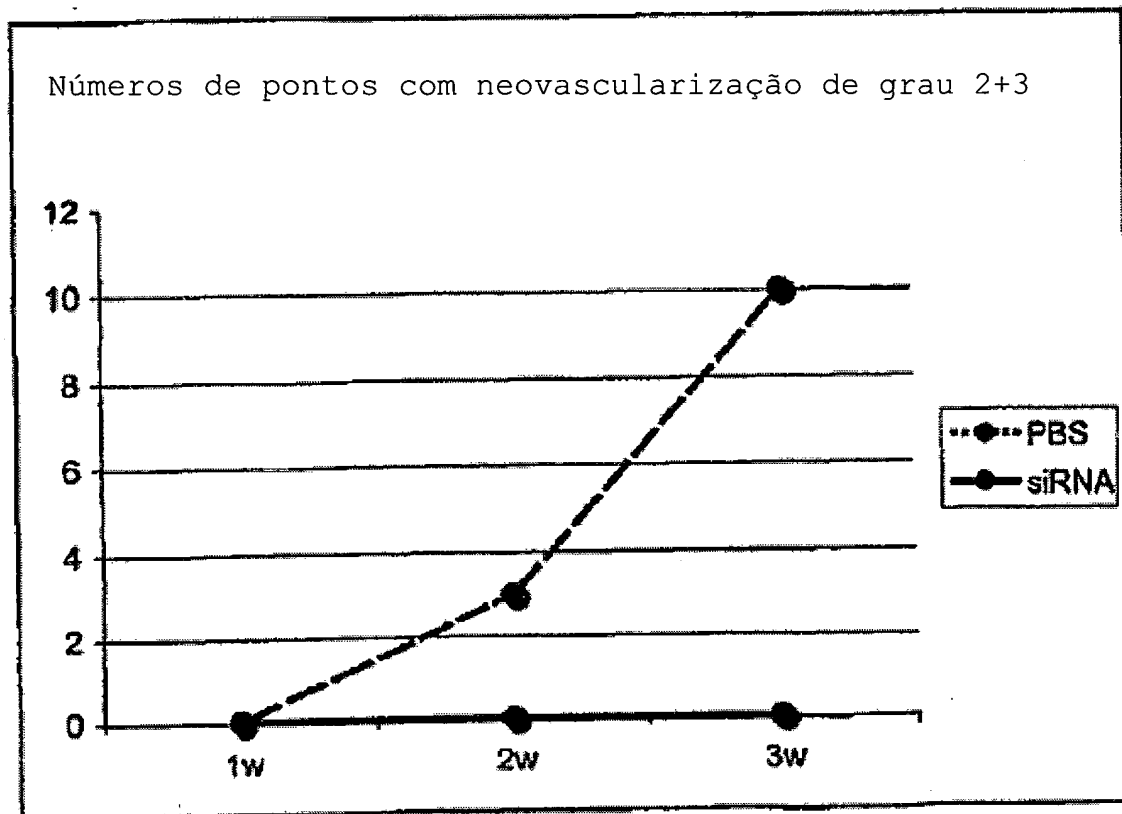


Figura 14

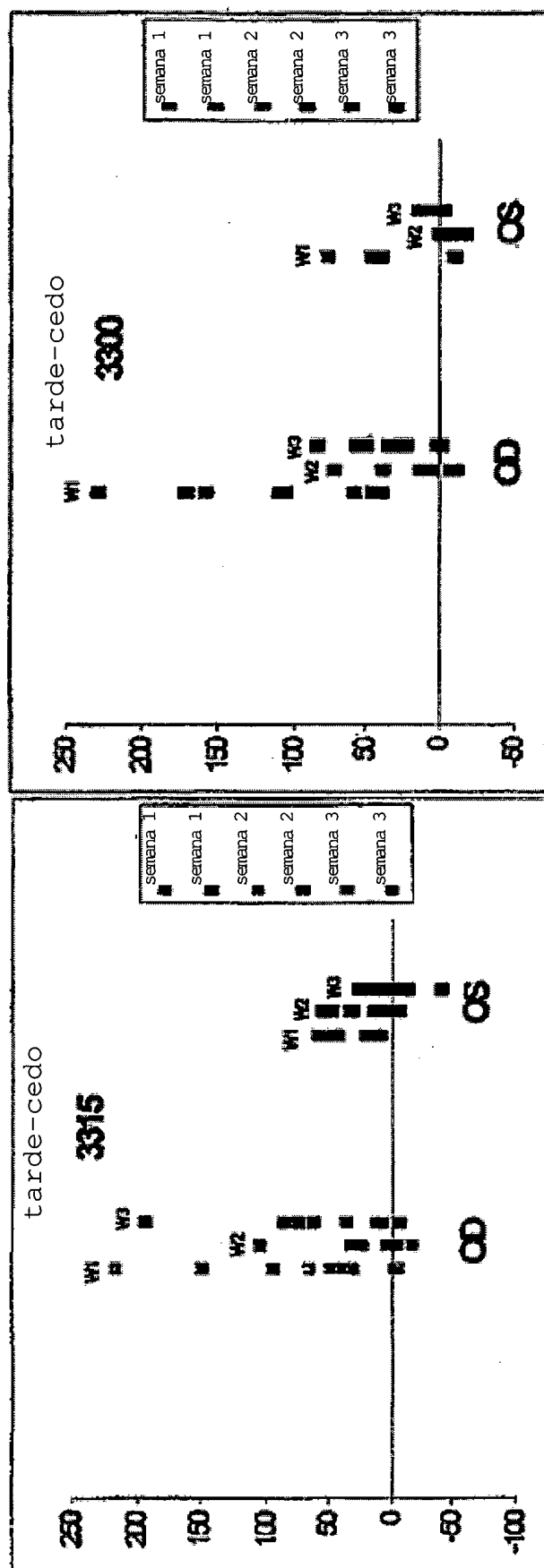
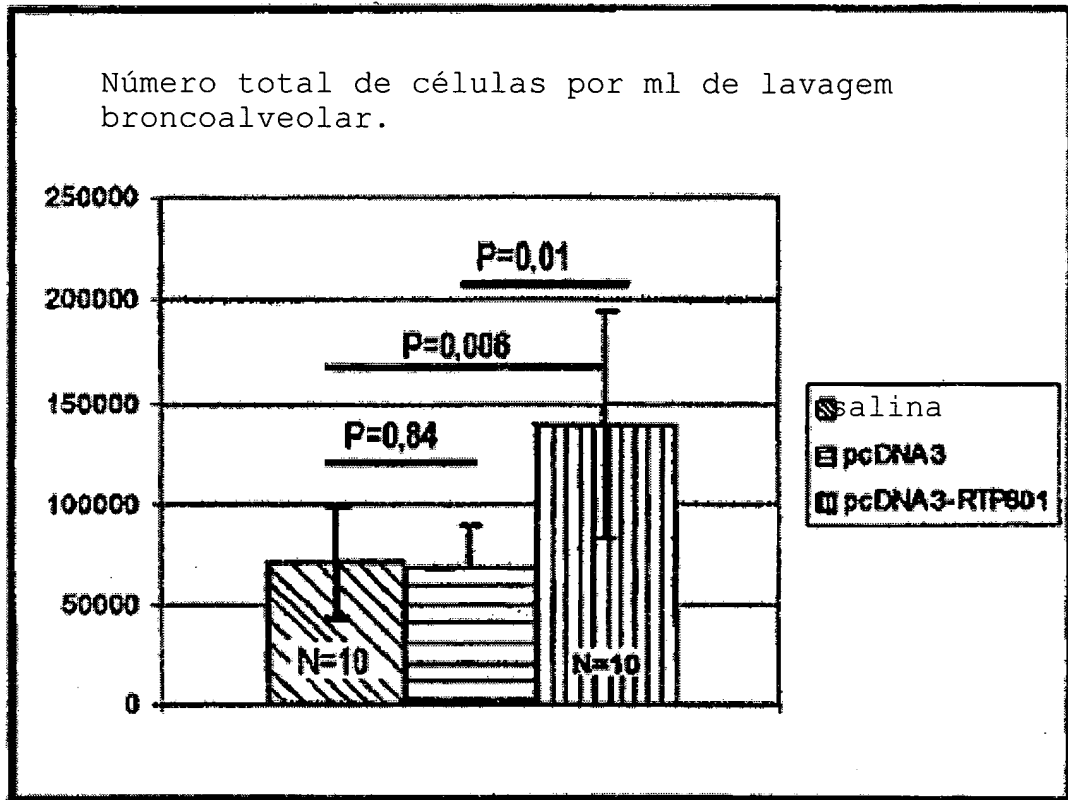


Figura 15

a.



b.

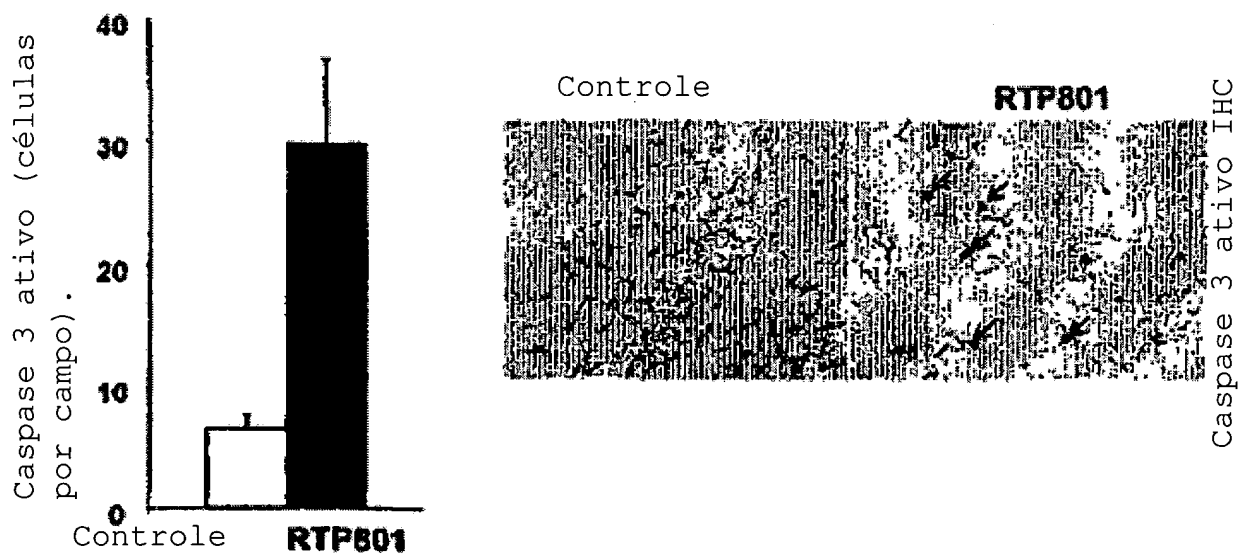


Figura 15

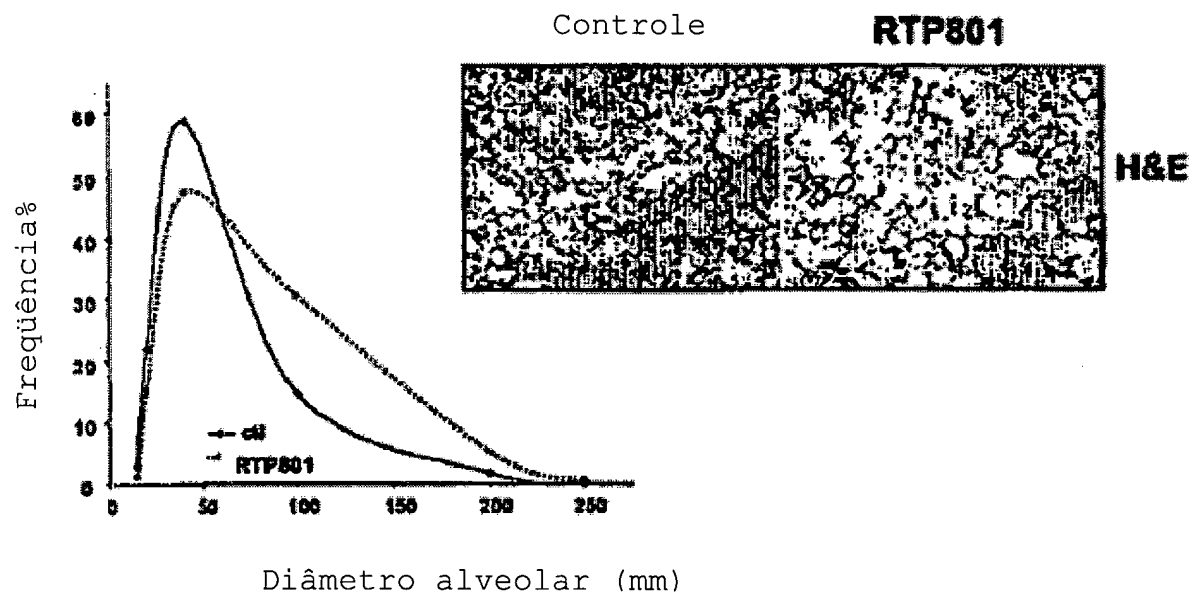
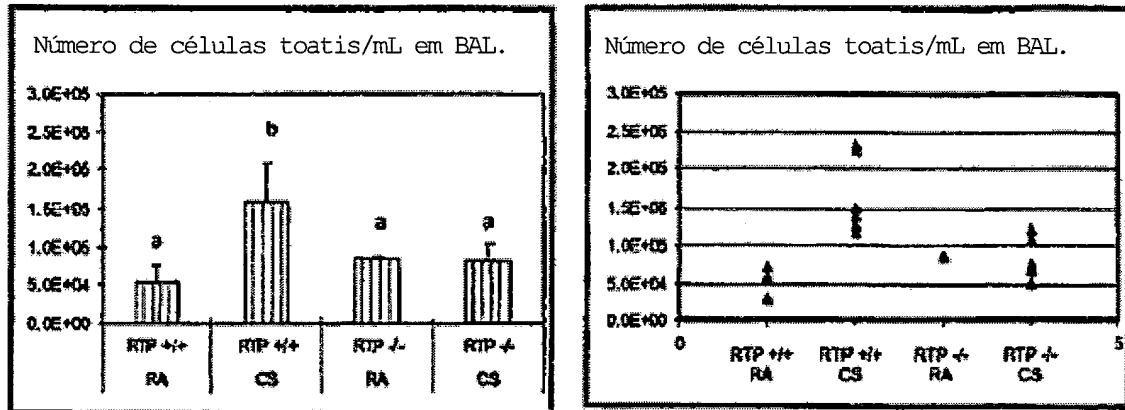
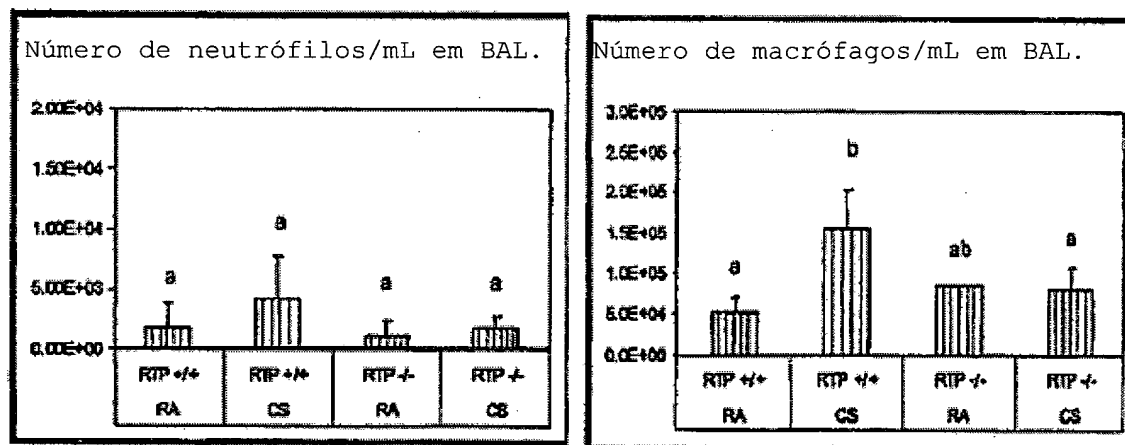


Figura 16

a.



b.



c.

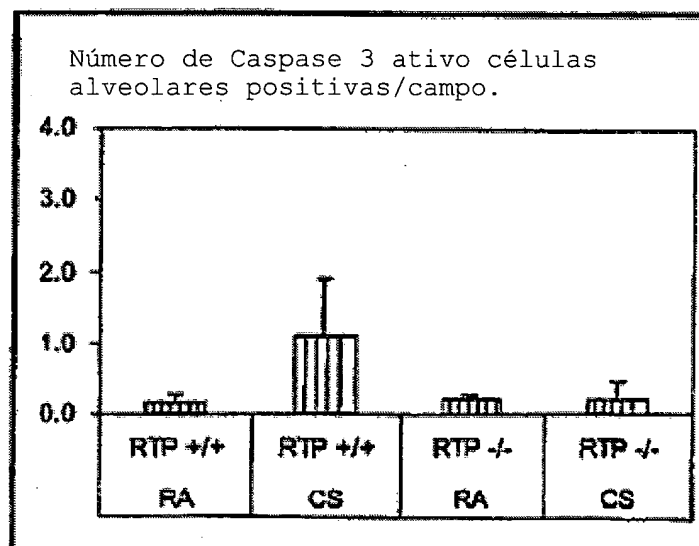
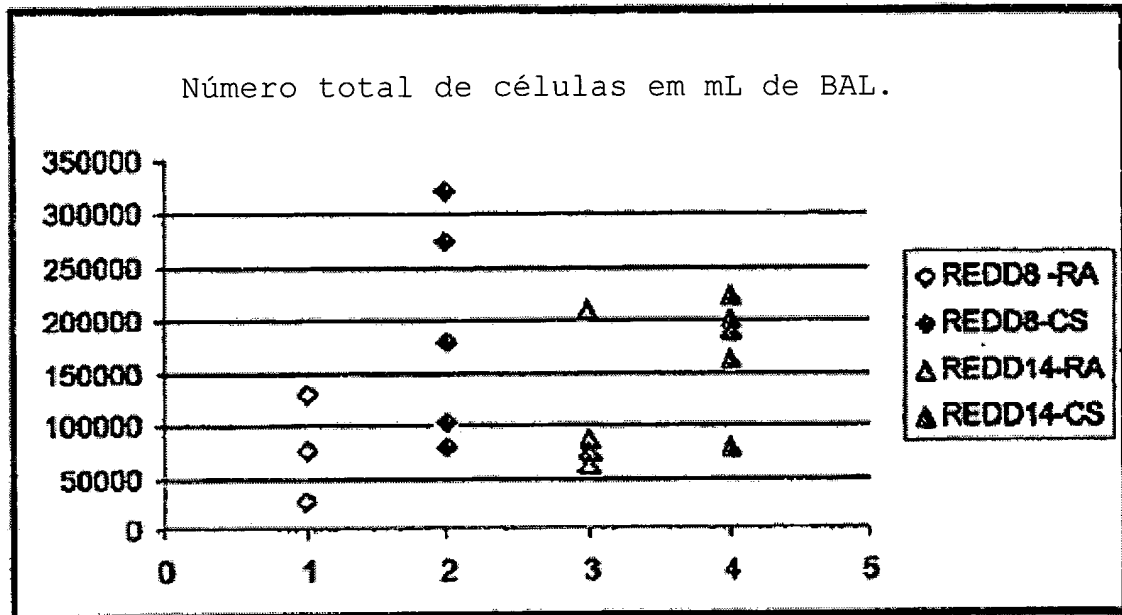


Figura 17

a.



b.

Intensidades de células expressando
RTP801 no pulmão.

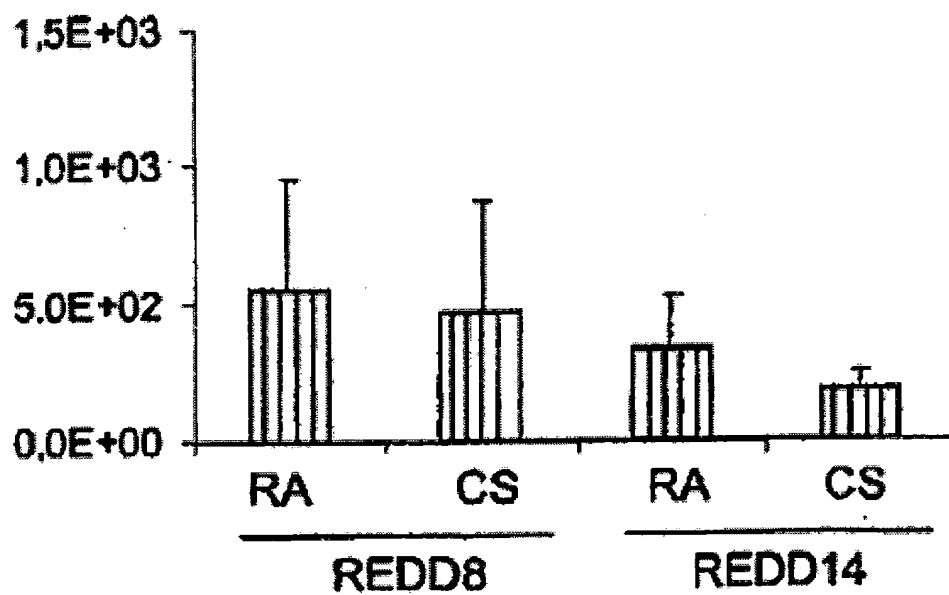


Figura 17

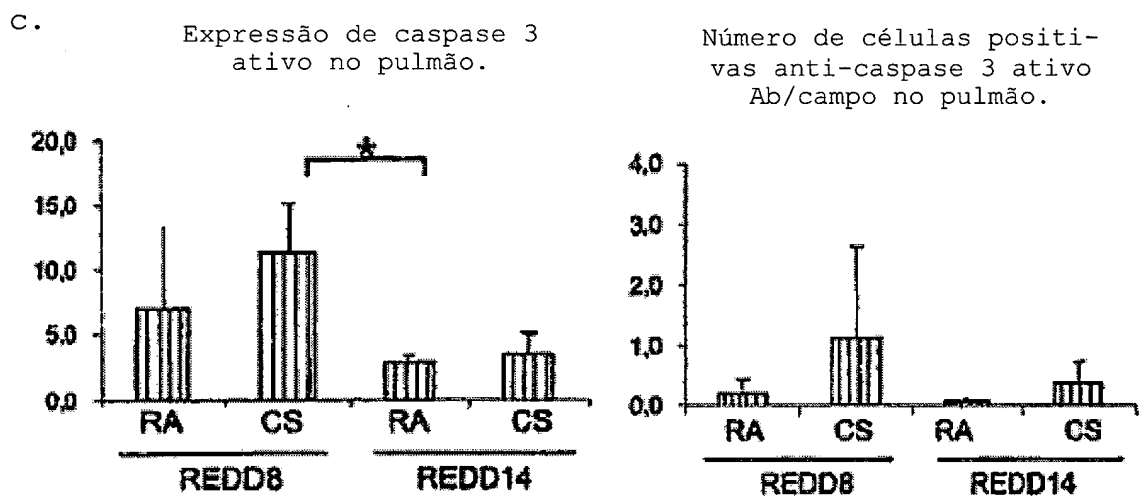


Figura 18

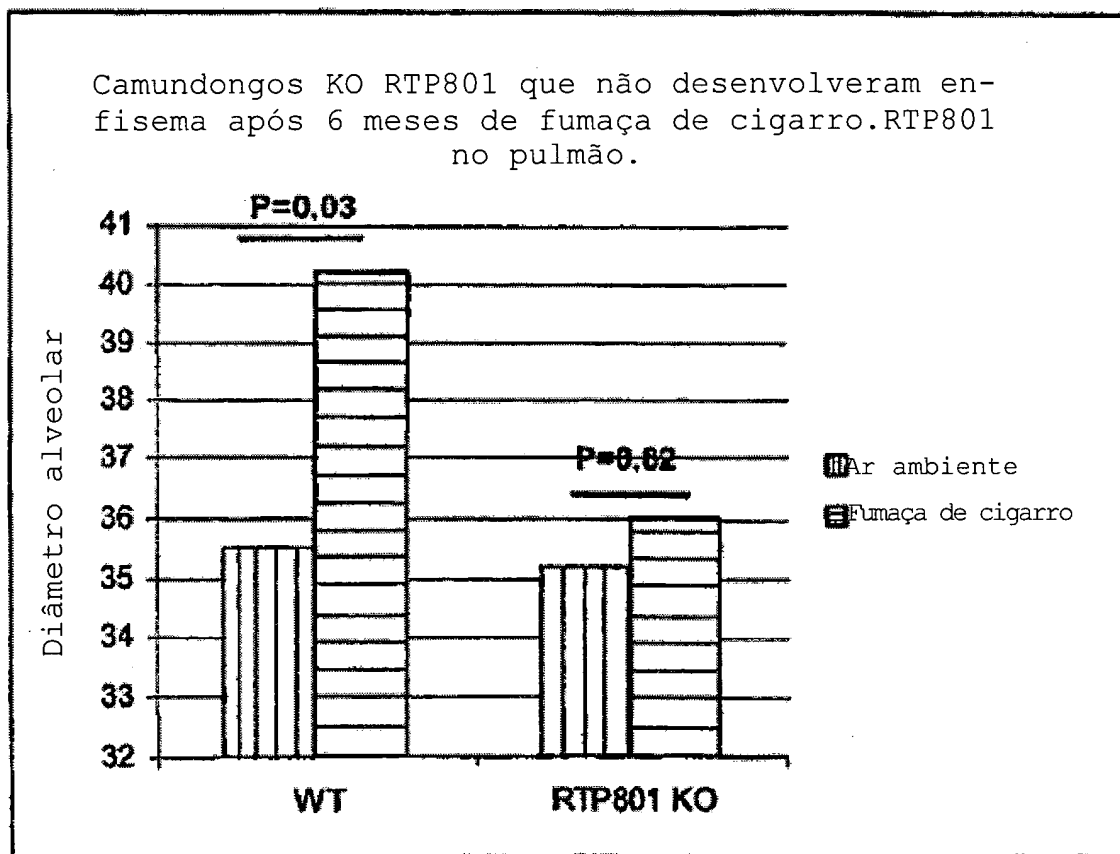


Figura 19

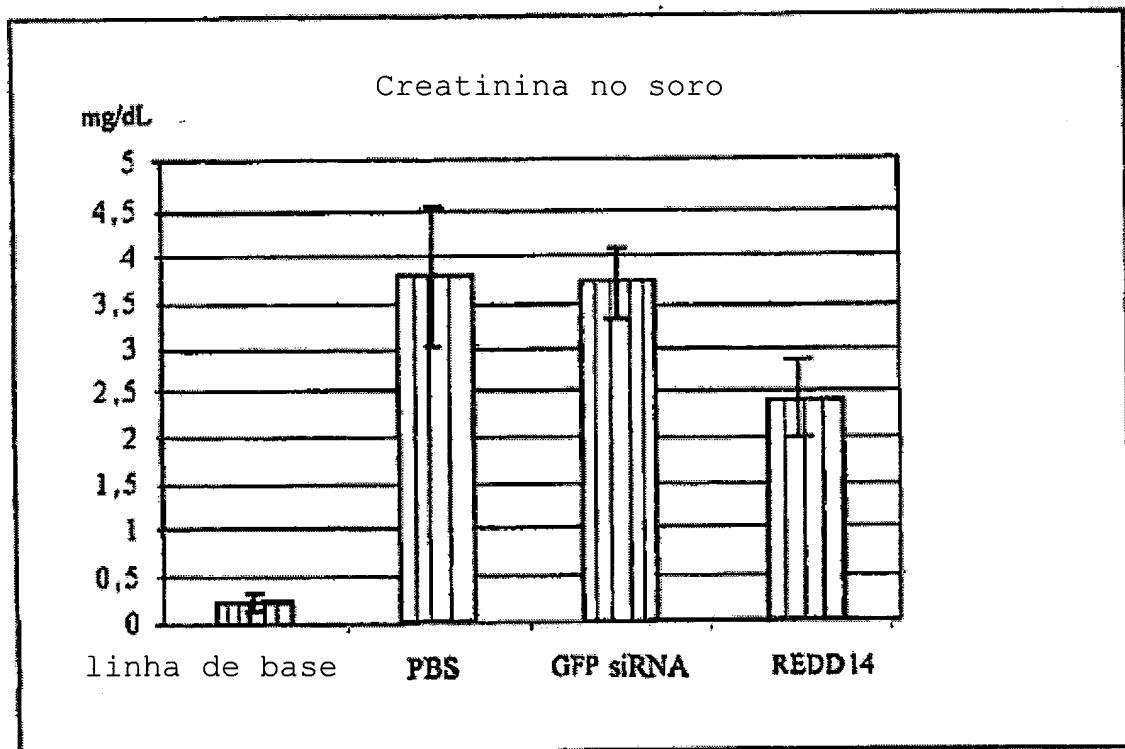


Figura 20

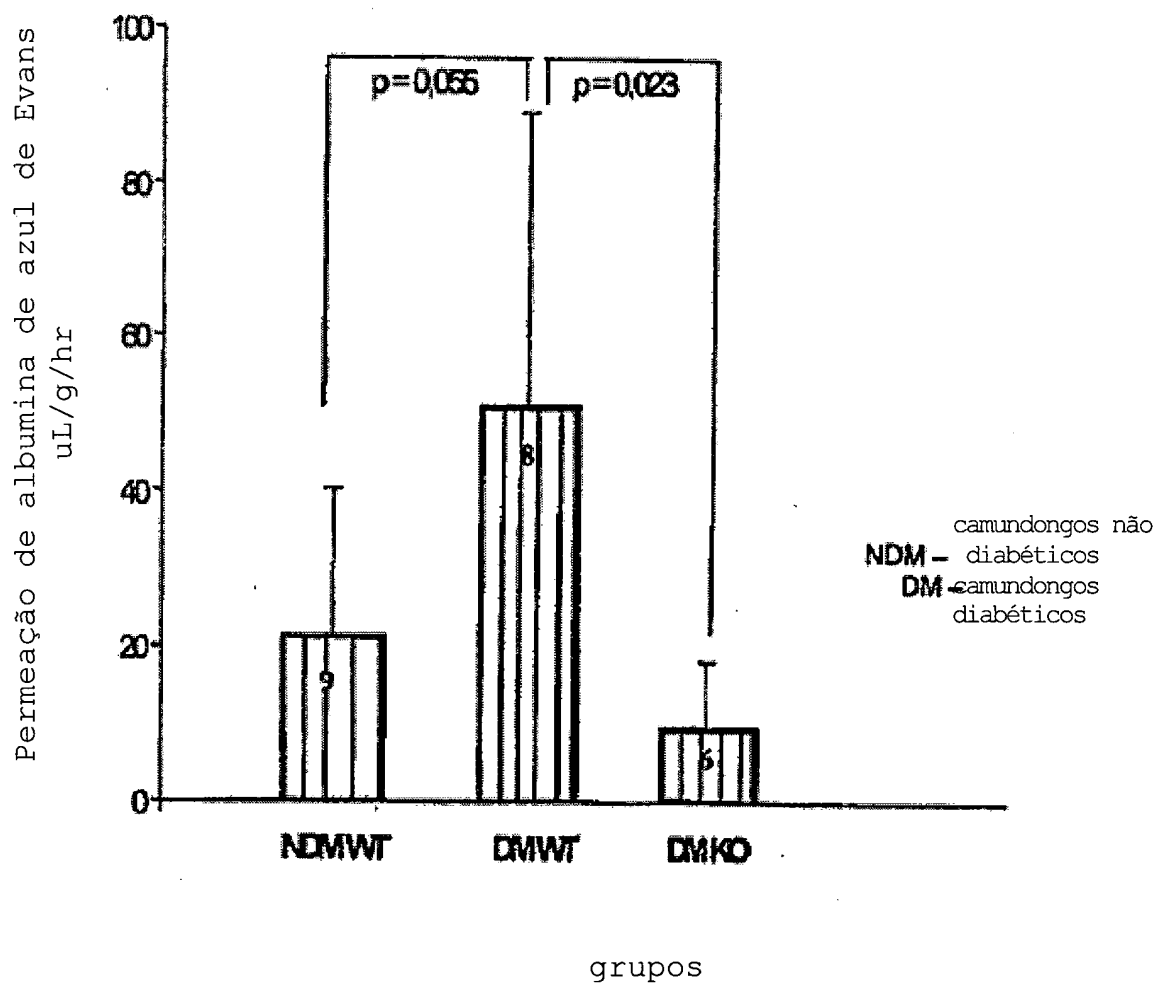


Figura 21

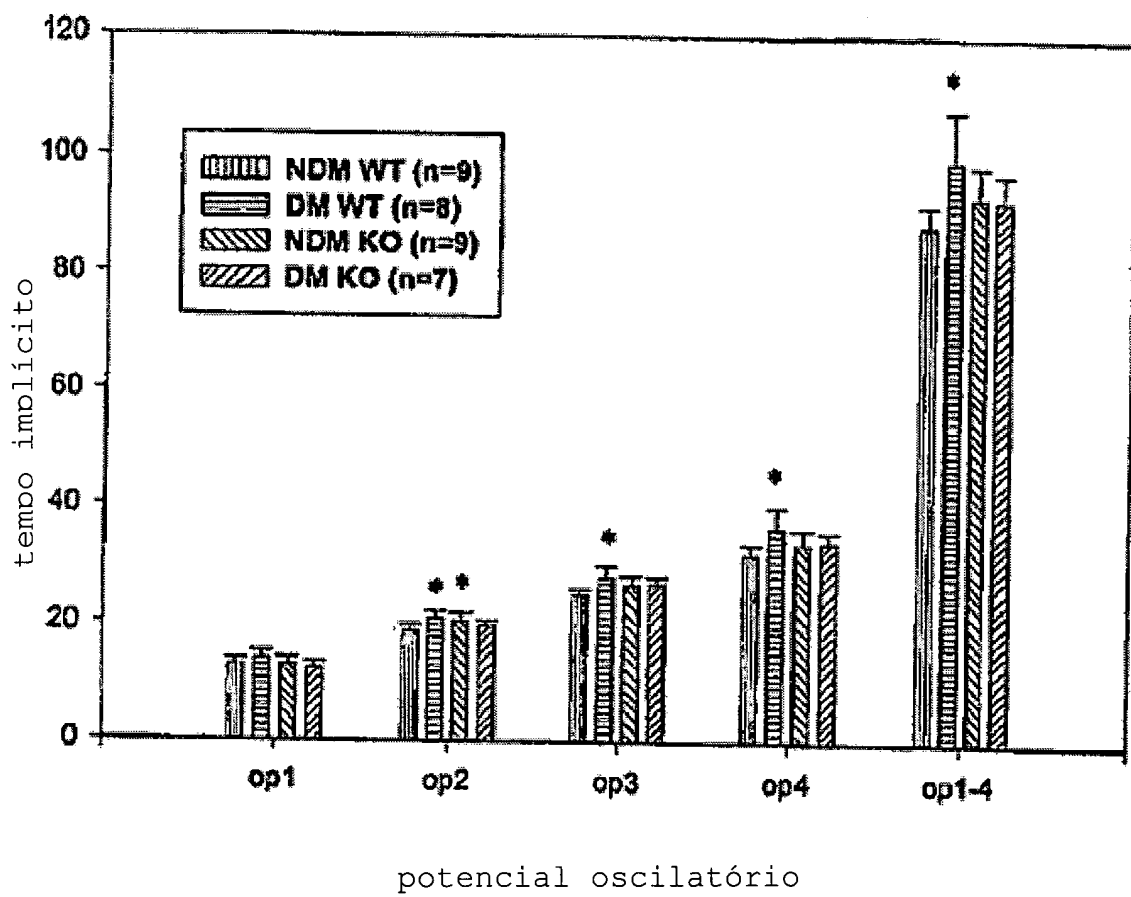


Figura 22

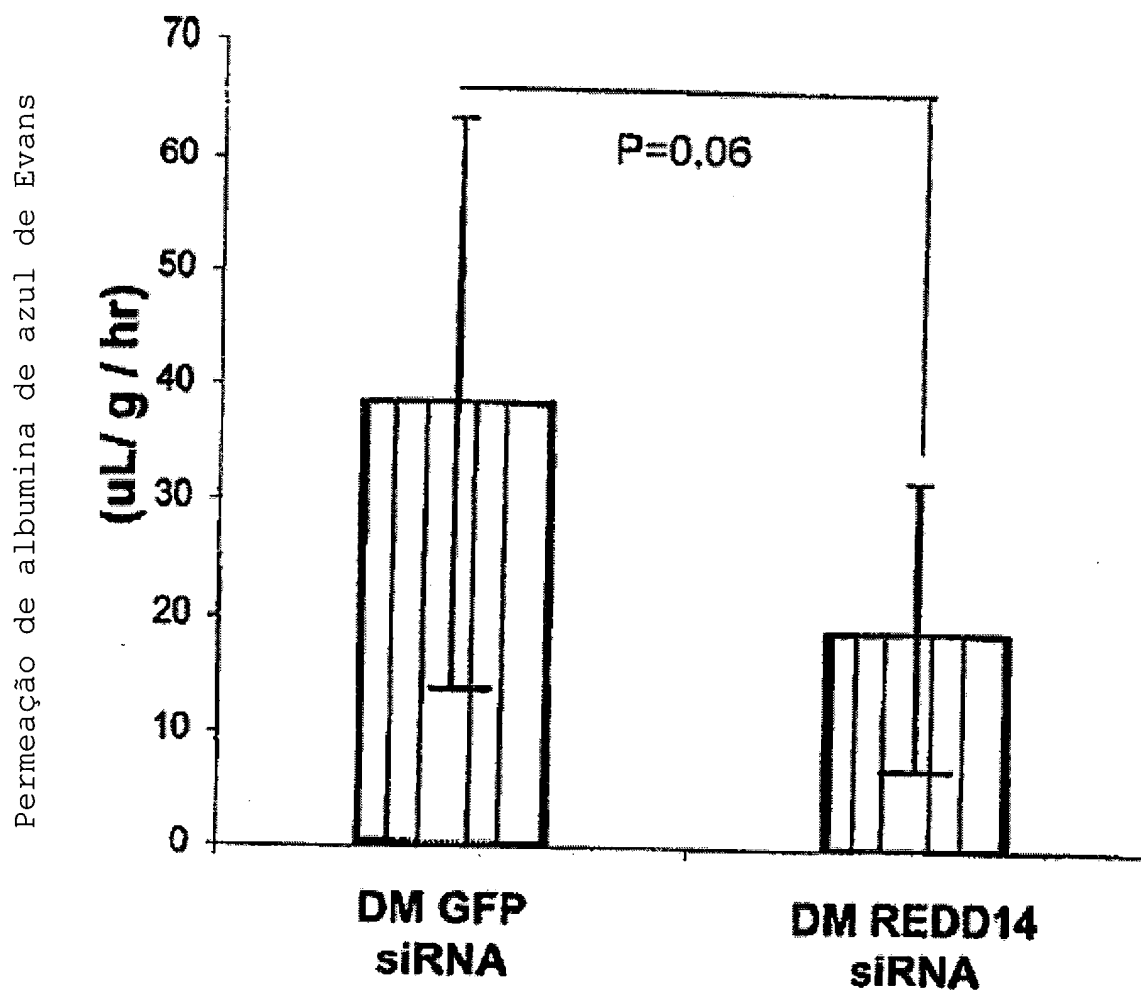


Figura 23

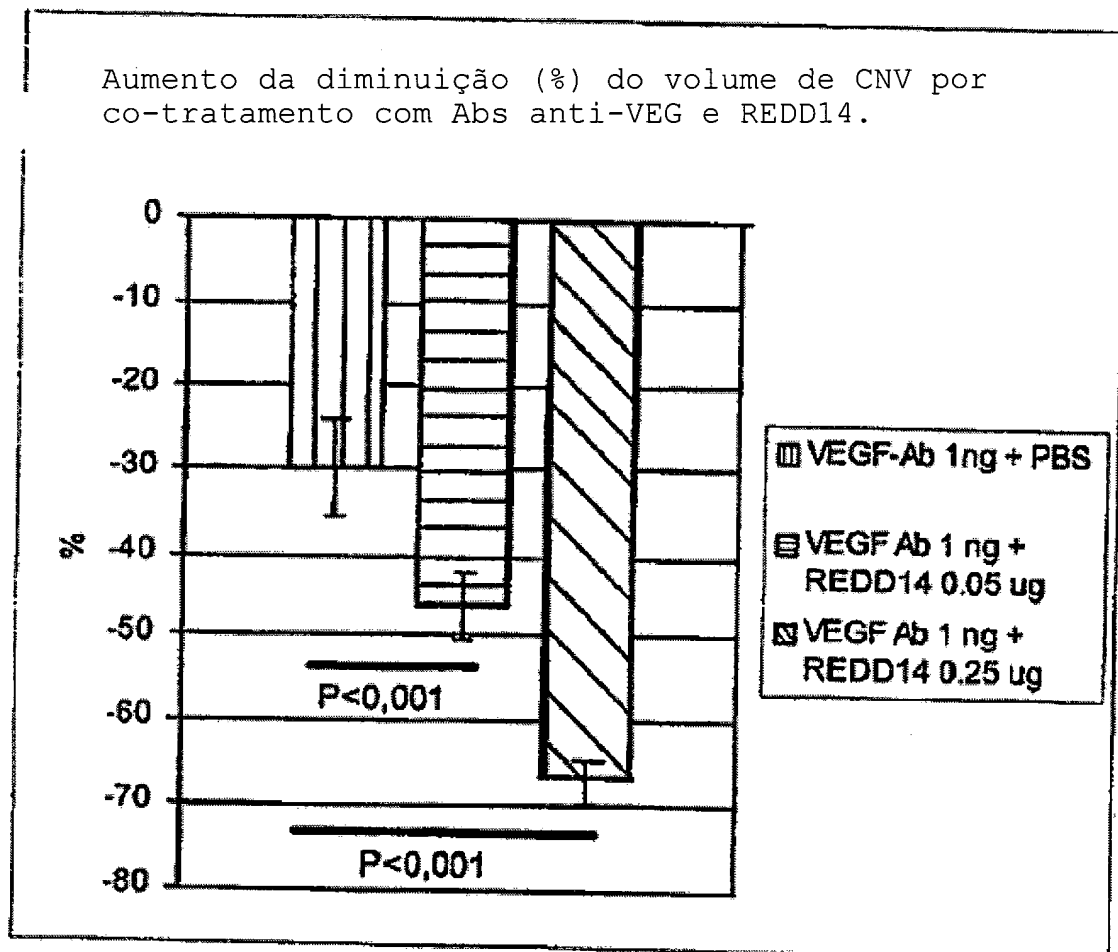
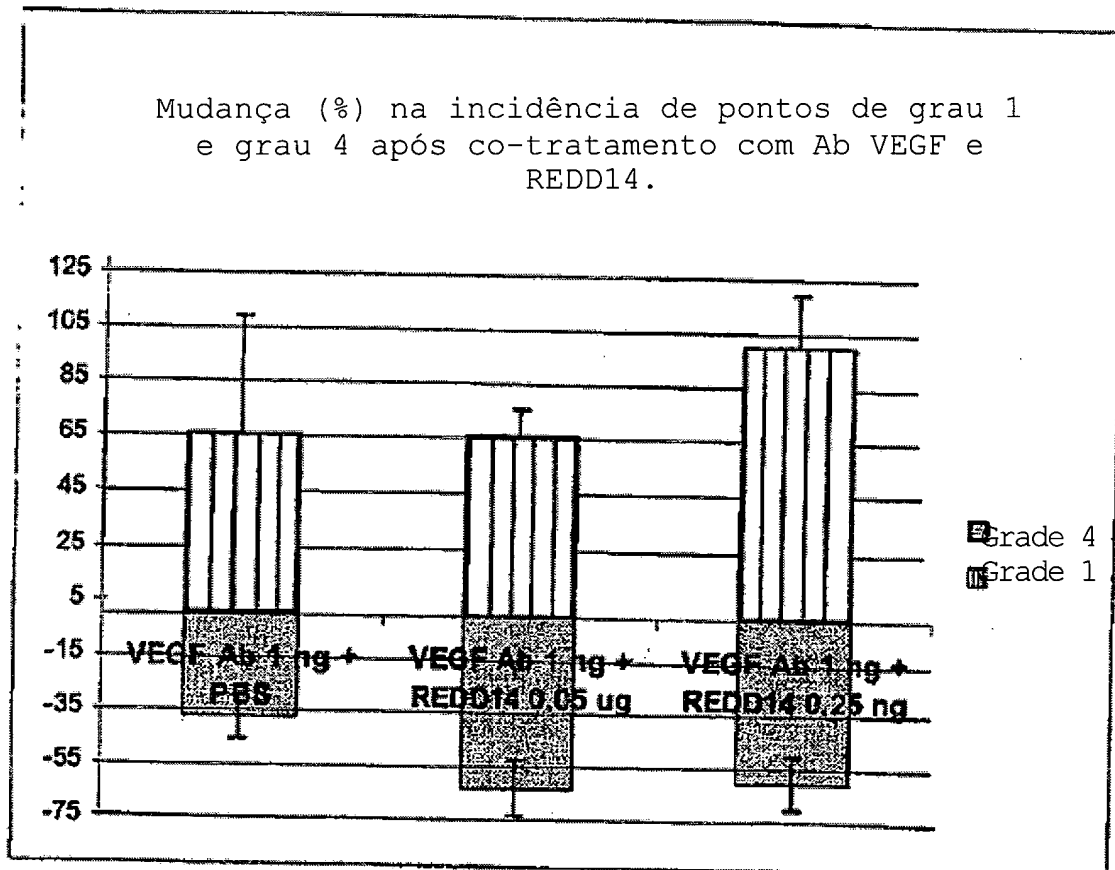


Figura 24



}

Figura 25

Mudanças na expressão de genes (% de linha de base) em RPE e retina neural 5 dias após CNV induzida por lesão a laser.

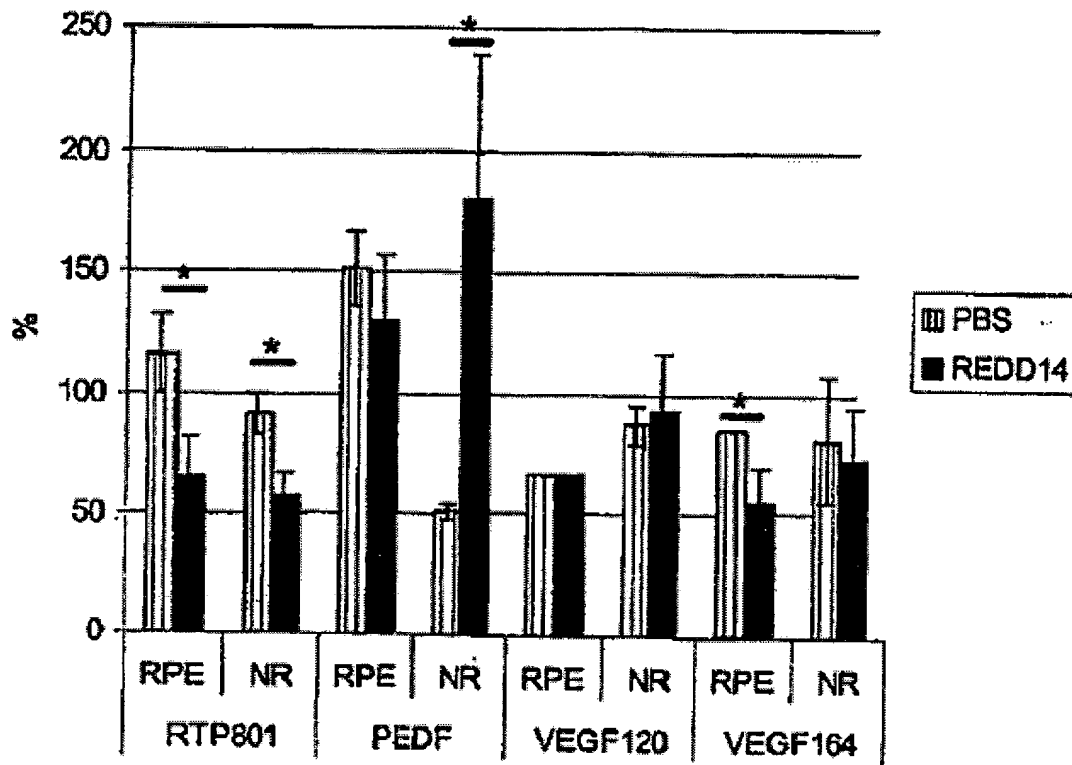
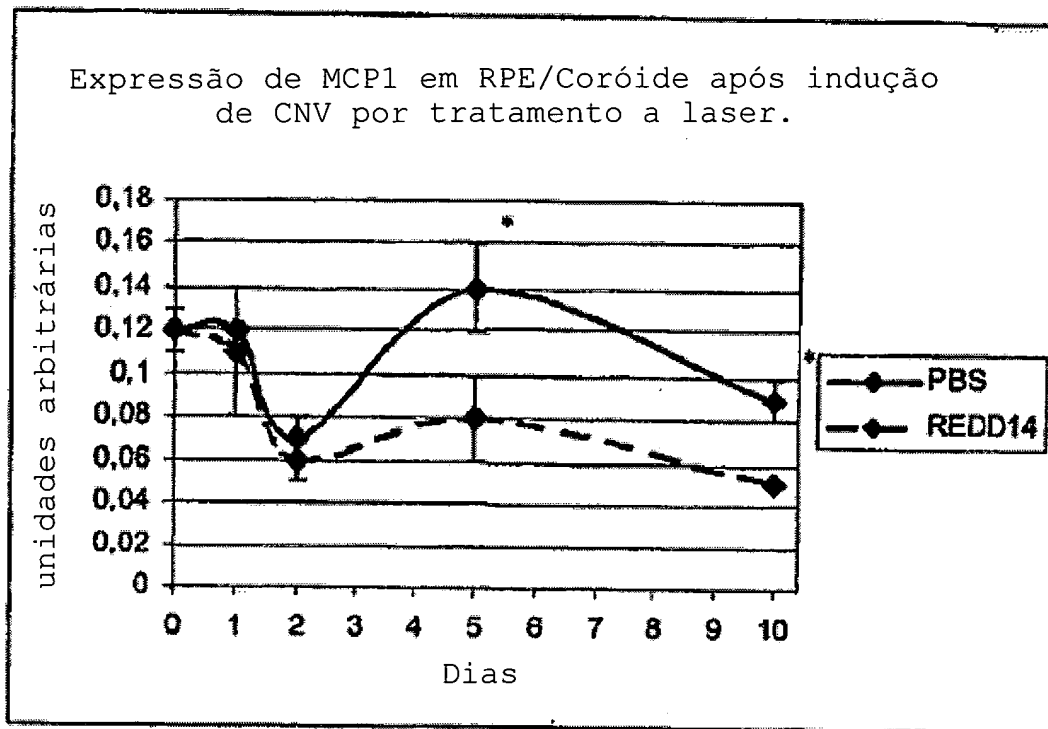


Figura 26

a)



b)

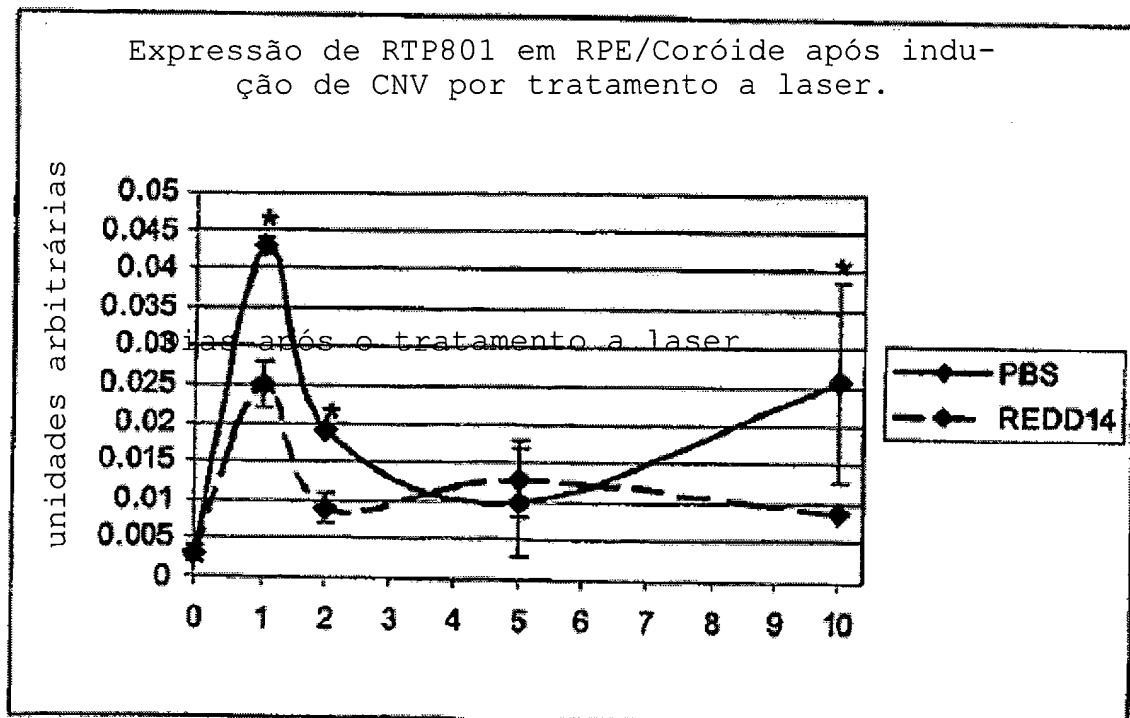


Figura 27

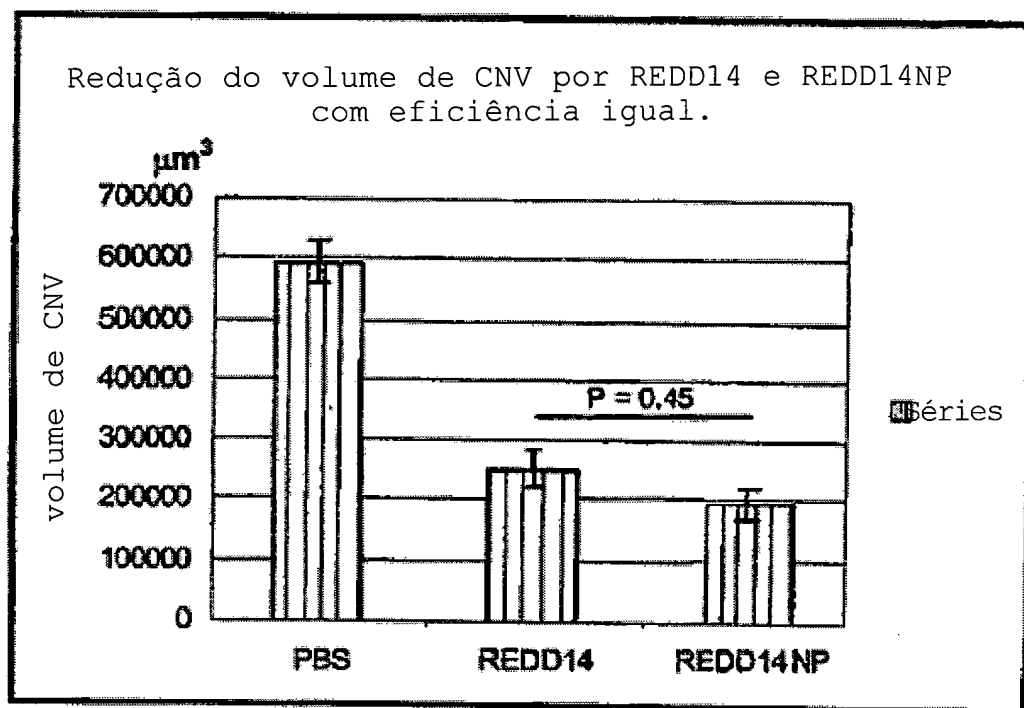


Figura 28

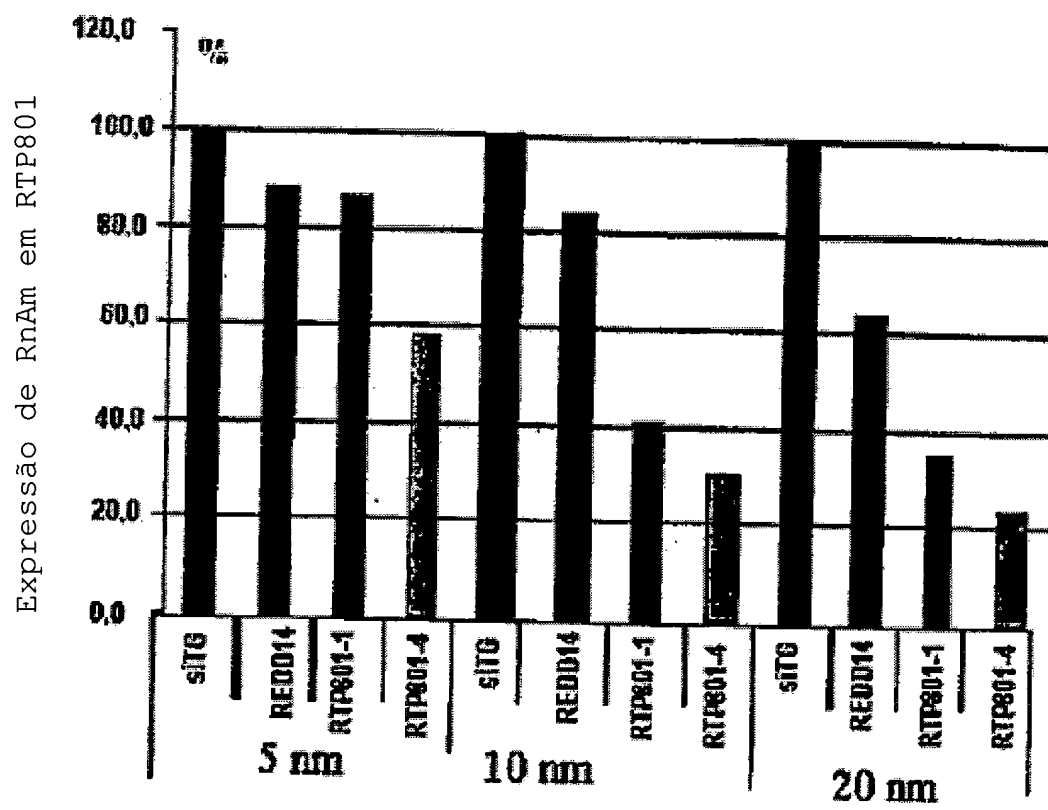


Figura 29

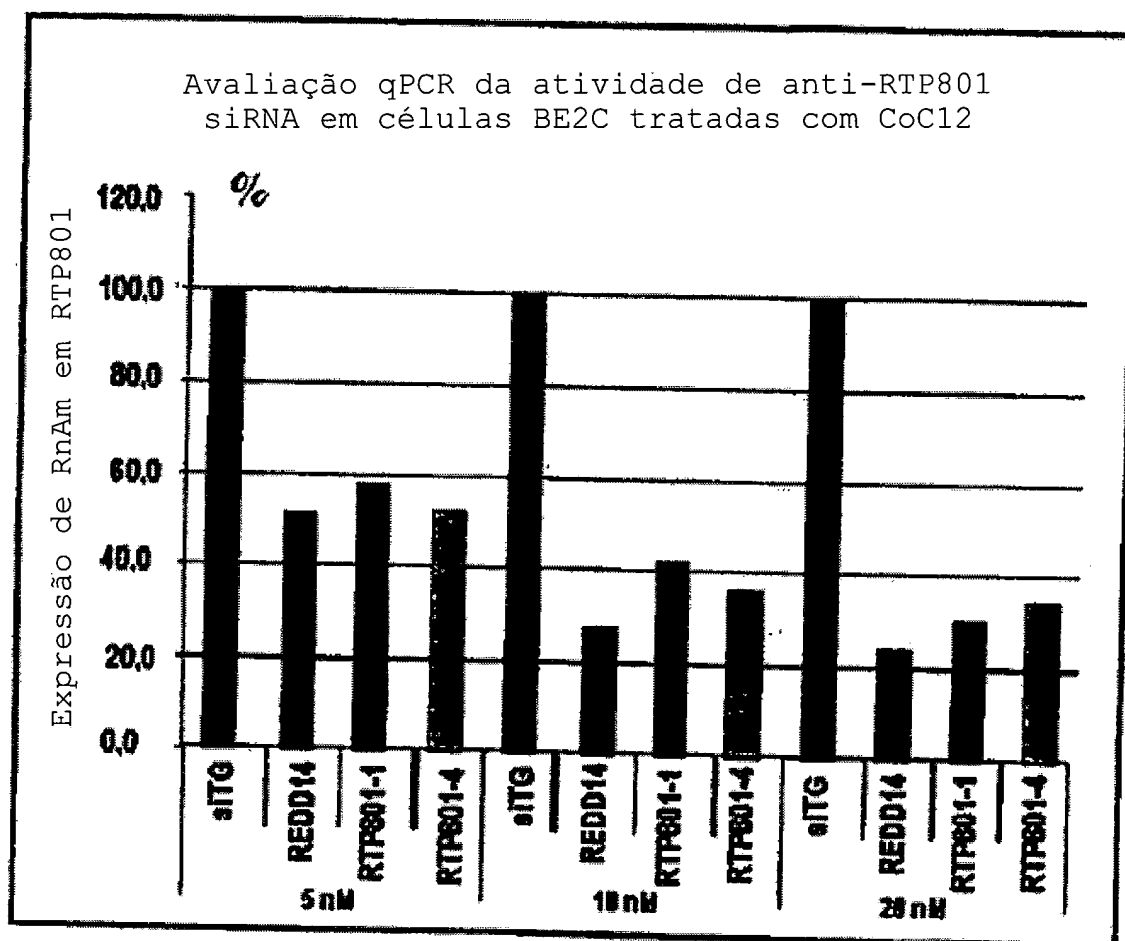
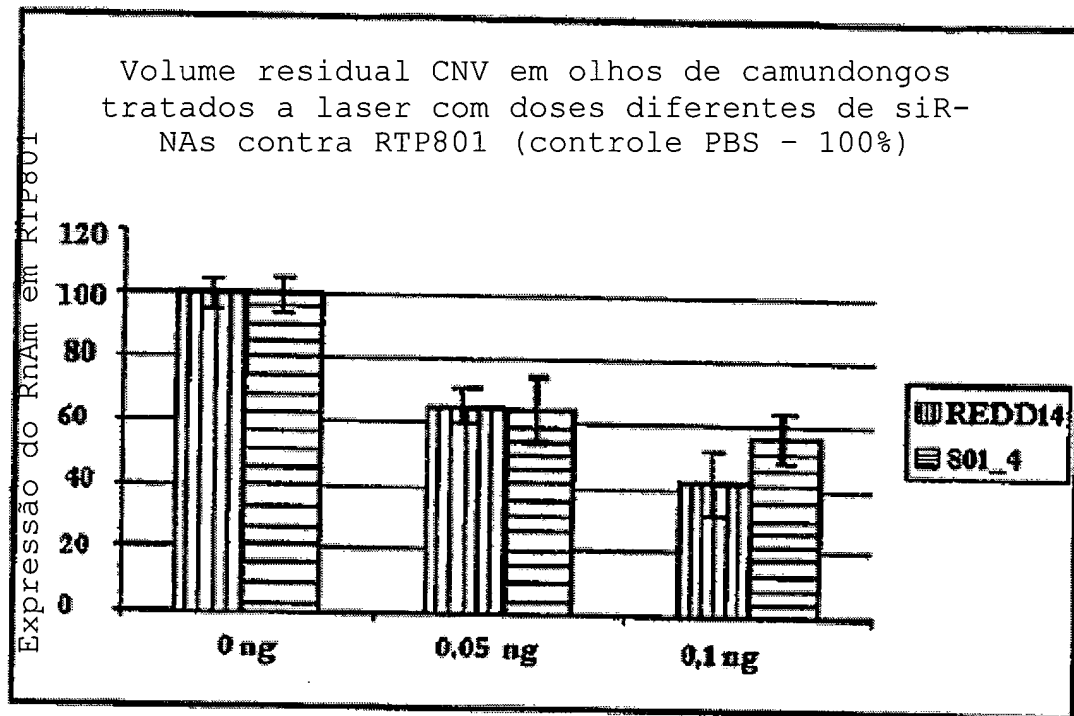


Figura 30



RESUMO

"USOS TERAPÊUTICOS DE INIBIDORES DE RTP801"

A presente invenção fornece moléculas, composições, métodos e usos inéditos para tratar desordens microvasculares, desordens nos olhos, condições respiratórias e desordens de
5 ouvido com base na inibição do gene e/ou proteína RTP801.