

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

(22) Data de pedido: <b>2006.12.29</b>	(73) Titular(es): <b>ALCON RESEARCH, LTD.</b> <b>6201 SOUTH FREEWAY FORT WORTH, TX</b> <b>76134-2099</b> <b>US</b>
(30) Prioridade(s): <b>2005.12.29 US 754796 P</b>	
(43) Data de publicação do pedido: <b>2008.09.10</b>	
(45) Data e BPI da concessão: <b>2012.08.22</b> <b>211/2012</b>	(72) Inventor(es): <b>DAVID P. BINGAMAN</b> <b>US</b> <b>JON E. CHATTERTON</b> <b>US</b>
	(74) Mandatário: <b>MANUEL ANTÓNIO DURÃES DA CONCEIÇÃO ROCHA</b> <b>AV LIBERDADE, Nº. 69 - 3º D 1250-148 LISBOA</b> <b>PT</b>

(54) Epígrafe: **INIBIÇÃO DO IGF-1R MEDIADA POR ARNI PARA O TRATAMENTO DA ANGIOGÉNESE OCULAR**

(57) Resumo:

APRESENTA-SE UM MÉTODO DE INTERFERÊNCIA COM ARN PARA INIBIR A EXPRESSÃO DE MARN DE IGF1R PARA TRATAR PACIENTES COM ANGIOGÉNESE OCULAR, EM PARTICULAR PARA TRATAR EDEMA RETINIANO, RETINOPATIA DIABÉTICA, SEQUELAS ASSOCIADAS À ISQUEMIA RETINIANA, NEOVASCULARIZAÇÃO DO SEGMENTO POSTERIOR (PSNV) E GLAUCOMA NEOVASCULAR, E PARA TRATAR PACIENTES EM RISCO DE VIREM A PADECER DE TAIS PATOLOGIAS.

**RESUMO****"INIBIÇÃO DO IGF-1R MEDIADA POR ARNi PARA O TRATAMENTO DA ANGIOGÊNESE OCULAR"**

Apresenta-se um método de interferência com ARN para inibir a expressão de mRNA de IGF1R para tratar pacientes com angiogênese ocular, em particular para tratar edema retiniano, retinopatia diabética, sequelas associadas à isquemia retiniana, neovascularização do segmento posterior (PSNV) e glaucoma neovascular, e para tratar pacientes em risco de virem a padecer de tais patologias.

**DESCRIÇÃO****"INIBIÇÃO DO IGF-1R MEDIADA POR ARNi PARA O TRATAMENTO DA ANGIOGÉNESE OCULAR"**

## CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção, insere-se no campo das composições de ARN de interferência para a inibição da expressão do receptor do factor 1 de crescimento semelhante a insulina (IGF-1R), a proteína codificada pelo mRNA de IGF-1R, na angiogénese ocular, incluindo as alterações celulares resultantes da interacção entre o factor 1 de crescimento semelhante a insulina (IGF-1) e o IGF-1R, que conduzam directa ou indirectamente à neovascularização ocular, ao edema retiniano, à retinopatia diabética, às sequelas associadas à isquemia retiniana, à neovascularização do segmento posterior e ao glaucoma neovascular.

## ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

A retinopatia diabética (DR) é uma doença ocular que se desenvolve em diabéticos, devido a alterações nas células que revestem os vasos sanguíneos, isto é, o endotélio microvascular retiniano. Em casos de *diabetes mellitus*, a hiperglicemia pode provocar lesões de diversas maneiras. Por exemplo, a glicose, ou um metabolito da glicose, liga-se aos grupos amino das proteínas, provocando lesões teciduais. Além disso, o excesso de glicose entra nas vias dos polióis, daí resultando acumulações de sorbitol. As células da retina

não conseguem metabolizar o sorbitol, o que pode contribuir para uma pressão osmótica intracelular elevada, edema intracelular, difusão deficiente, hipoxia tecidual, lesões das células capilares e debilitação capilar. A retinopatia diabética implica o espessamento das membranas de suporte capilar, o que pode impedir, por sua vez, que os pericitos, que são o tipo de células perivasculares predominantes nos capilares retinianos, entrem em contacto com as células endoteliais. A morte dos pericitos e das células endoteliais ocorre por meio de um mecanismo apoptótico, durante a retinopatia diabética, em que a perda de pericitos aumenta provavelmente, a permeabilidade dos capilares e conduz à degradação da barreira hemato-retiniana e à desregulação da corrente sanguínea. A debilitação dos capilares origina a formação de aneurismas e mais perdas de sangue. Estes efeitos da hiperglicemia também podem prejudicar as funções neuronais na retina. A patologia DR está associada a microaneurismas retiniais, hemorragias, exsudados e retinite proliferante, isto é, há um crescimento maciço de tecido neovascular e de tecido conjuntivo na superfície interior da retina. A retinopatia diabética pode ser de tipo espontâneo, sendo progressivamente caracterizada por microaneurismas, hemorragias intra-retiniais pontilhadas, exsudados amarelos e cerosos, manchas de tipo algodão em rama e edema macular. Isto é uma fase precoce da retinopatia diabética, designada por retinopatia diabética não proliferativa.

O documento WO 03/100059 descreve reagentes de siARN e anti-sentido que são capazes de bloquear a expressão do receptor IGF-1R. Estes reagentes são recomendados para utilização como inibidores do crescimento tumoral em doenças malignas, tais como diferentes tipos de cancros. Bohula et

*al.*, J.BioLChem., Vol. 278 (2003), pp 15991-15997, descrevem diversos siARN e a sua utilização para regular a proliferação de células tumorais. Sohail *et al.*, Nucleic Acid Research (2003), no. 7 e 38, descrevem diversos siARN, enquanto poderosos reagentes de interferência com ARN para serem testados em células do cancro mamário humano. O documento US 2004/0086860 explica processos para a preparação de cadeias duplas de ARN e de cadeias singulares de ARN. Smith *et al.*, Nature Medicine, Dezembro de 1999, 1390-1394, descrevem experiências que visam a regulação da neovascularização retinal dependente do factor de crescimento endotelial vascular, por meio do receptor do factor 1 de crescimento semelhante à insulina, tendo sido testado o efeito de JB3. Kim *et al.*, American Journal of Pathology, Dezembro de 2004, pp 2177-2185, descrevem a inibição da angiogénese ocular por acção de diversos siARN que visam, no entanto, os genes das vias do factor de crescimento endotelial vascular. Unsöld *et al.*, Molecular Vision 2004, pp 468-474, descrevem a utilização de uma molécula química pequena, com a designação de MAE 87, enquanto receptor do inibidor da tirosina-cinase nos murganhos. O documento US 2005/0282761 descreve compostos, composições e processos para modular a expressão do receptor da hormona do crescimento.

À medida que a patologia microvascular induzida pelos diabetes for progredindo, os capilares retiniais irão ficar eventualmente obstruídos e irão originar áreas multifocais de hipoxia isquémica no interior da retina. As condições hipóxicas em tecidos não tratados por perfusão induzem a produção de factores de crescimento capazes de estimularem o crescimento anormal de novos vasos sanguíneos, a partir

dos vasos existentes (angiogénese). Estes novos vasos sanguíneos patológicos crescem dentro do humor vítreo e podem provocar a perda de visão, que é uma patologia designada por retinopatia diabética proliferativa (PDR), uma vez que os novos vasos sanguíneos são frágeis e têm tendência para derramar sangue dentro do olho. O tipo proliferativo de DR caracteriza-se pela neovascularização da retina e do disco óptico, podendo haver projecção para dentro do humor vítreo, proliferação de tecido fibroso, hemorragia do humor vítreo e descolamento da retina.

A neovascularização também ocorre num tipo de glaucoma conhecido pela designação de glaucoma neovascular, em que tem lugar um aumento da pressão intraocular resultante do desenvolvimento de tecido conjuntivo e de novos vasos sanguíneos sobre a malha trabecular. O glaucoma neovascular é uma forma de glaucoma secundário provocado pela neovascularização no ângulo da câmara.

A neovascularização do segmento posterior (PSNV) é uma patologia que ameaça a visão, sendo responsável pelas duas causas mais vulgares de cegueira adquirida nos países desenvolvidos: degeneração molecular exsudativa associada à idade (AMD) e PDR. Até há pouco tempo, os únicos tratamentos consagrados para a PSNV, que ocorre durante a AMD exsudativa, eram a fotocoagulação a laser ou a terapia fotodinâmica com VISUDYNE™. Estas duas terapias implicam a oclusão da vasculatura afectada, daí resultando uma lesão permanente de retina, induzida pelo laser, sem contudo resolver a causa subjacente da neovascularização. A recorrência de neovascularização a partir da mesma zona é vulgar. Para os pacientes com PDR, as intervenções cirúrgicas com vitrectomia e remoção das membranas pré-

retinais são as únicas opções presentemente existentes, bem como uma terapia a laser, designada por fotocoagulação panretinal, para evitar a geração de mais vasos novos.

Os esforços farmacêuticos actuais têm incidido sobre a inibição dos efeitos de factores angiogénicos potentes, tais como VEGF. Recentemente, foi aprovada a injeção intravitreal de LUCENTIS™, que é um fragmento de um anticorpo anti-VEGF, para o tratamento de AMD. Este fragmento de anticorpo foi concebido para se ligar ao VEGF, para inibir a formação de novos vasos sanguíneos. O produto LUCENTIS também é utilizado em experiências clínicas, para o tratamento do edema macular diabético. Outras metodologias compreendem a utilização de moléculas pequenas de ARN interferente, destinadas ao VEGF ou ao seu receptor.

O corpo central da hormona de crescimento (GH)/IGF1 está implicado na DR, conforme demonstrado pelos resultados que indicam um aumento de IGF1 nos tecidos e fluidos oculares de pacientes que padecem de DR progressiva. Além disso, os pacientes tratados subcutaneamente com octreótido, que é um análogo da somatostatina, que inibe o corpo central de GH/IGF1, revelaram, de forma empírica, melhorias no edema macular diabético e na PDR. No modelo de OIR de murganho, o tratamento com um inibidor de GH ou com um antagonista de IGF1R reduziu, significativamente, a neovascularização retinal. Num modelo de murganho diabético, a terapia com IGF-1, induzido por plasmídeos, inverteu o fluxo arterial e a angiogénese diabética agravada.

O IGF1R é um membro da família de receptores da tirosina-cinase. Foram já descritas diversas moléculas pequenas, inibidoras dos receptores de tirosina-cinase (RTKi), que inibem a neovascularização retinal e/ou a

neovascularização coroidal nos murganhos. Cada uma destas moléculas inibe diversas cinases, podendo ser eficazes para bloquear a neovascularização; no entanto, a cada uma delas está associado o risco concomitante de originar efeitos secundários tóxicos. Um fármaco de moléculas pequenas que consiga inibir a totalidade das cinases, necessário para bloquear a neovascularização, também pode inibir, eventualmente, uma cinase que seja necessária para a sobrevivência celular.

A presente invenção respeita esta falta de especificidade de inibição dos receptores das tirosina-cinases, concretamente o receptor do factor 1 de crescimento semelhante à insulina. A presente invenção proporciona diversos ARN interferentes, destinados ao IGF1R na angiogénese e na permeabilidade vascular.

#### DESCRIÇÃO ABREVIADA DA INVENÇÃO

A presente invenção tem por objecto diversos ARN interferentes que silenciam a expressão do mRNA do IGF1R, reduzindo assim a actividade do complexo interligado IGF-1/IGF-1R e tratando a angiogénese ocular, devido ao facto de determinarem uma diminuição da actividade celular pré-angiogénica e angiogénica ocular. O IGF-1R é activado pela ligação do IGF-1 ao domínio extracelular do receptor. Por sua vez, a activação da cinase tem por resultado a estimulação de diferentes substratos intracelulares.

O termo "angiogénese ocular", tal como aqui utilizado, abrange as patologias pré-angiogénicas oculares e as patologias angiogénicas oculares, compreendendo todas as modificações celulares resultantes da interacção entre IGF-1

e IGF-IR que determinem, directa ou indirectamente, por exemplo, a angiogénese ocular, a neovascularização ocular, o edema retinal, a retinopatia diabética, sequelas associadas à isquémia retinal, PSNV, permeabilidade vascular e glaucoma neovascular. Os diversos ARN interferentes, da presente invenção, são úteis para tratar pacientes que padeçam, por exemplo, de angiogénese ocular, neovascularização ocular, edema retinal, retinopatia diabética, sequelas associadas à isquemia retinal, neovascularização do segmento posterior (PSNV) e glaucoma neovascular, ou pacientes em risco de virem a padecer de tais patologias.

É possível utilizar uma forma de realização da presente invenção para a prática de um processo para atenuar a expressão de um mRNA de IGFIR num paciente. O processo consiste em administrar ao paciente uma composição que contenha uma quantidade eficaz de ARN interferente, tal como um siARN com um comprimento compreendido entre 19 e 49 nucleótidos, e um veículo farmacologicamente aceitável. A administração é efectuada num olho do paciente para atenuar a expressão de um agente de angiogénese ocular em causa num ser humano.

De acordo com uma forma de realização da presente invenção, o ARN interferente compreende uma cadeia nucleotídica codificadora, uma cadeia nucleotídica anti-sentido e uma região de complementaridade pelo menos quase perfeita que possua pelo menos 19 nucleótidos contíguos. Além disso, a cadeia anti-sentido híbrida, em condições fisiológicas, com uma parcela de um mRNA correspondente à SEQ ID NO: 1 que é a sequência de cDNA codificador que codifica o IGF1R (nº NM\_000875 de admissão no GenBank) e possui uma região de complementaridade pelo menos quase

perfeita que contém pelo menos 19 nucleótidos contíguos com a parcela hibridante do mRNA correspondente à SEQ ID NO:1. A administração de uma tal composição atenua a expressão de um mRNA de IGF1R do paciente.

A sequência do IGF1R, depositada sob o nº NM\_000875 e aqui designada por SEQ ID NO:1, é a sequência seguinte:

```

ttttttttt ttttgagaaa gggaatttca tcccaaataa aaggaatgaa gtctggctcc      60
ggaggagggg ccccgacctc gctgtggggg ctctgtttc tctccgccgc gctctcgtc      120
tggccgacga gtggagaaat ctgctggcca ggcacgcaca tccgcaacga ctatcagcag      180
ctgaagcgcc tggagaactg cacggtgatc gagggctacc tccacatcct gctcatctcc      240
aaggccgagg actaccgcag ctaccgctc cccaagctca cggtcattac cgagtacttg      300
ctgctgttcc gagtggctgg cctcgagagc ctcggagacc tttcccca cctcacggtc      360
atccgctgct ggaaactctt ctacaactac gccctgggtca tttcgagat gaccaatctc      420
aaggatattg ggctttacaa cctgaggaac attactcggg gggccatcag gattgagaaa      480
aatgctgacc tctgttacct ctccactgtg gactggctcc tgatcctgga tgcgggtgcc      540
aataactaca ttgtggggaa taagcccca aaggaatgtg gggacctgtg tccagggacc      600
atggaggaga agccgatgtg tgagaagacc accatcaaca atgagtacaa ctaccgctgc      660
tggaccacaa accgctgcc aaaaatgtgc ccaagcacgt gtgggaagcg ggcgtgcacc      720
gagaacaatg agtctgcc ccccgagtgc ctgggcagct gcagcgcgcc tgacaacgac      780
acggcctgtg tagcttgccg cactactac tatgccgtg tctgtgtgcc tgcctgccg      840
cccaacacct acaggttga gggctggcgc tgtgtggacc gtgacttctg cgccaacatc      900
ctcagcgccg agagcagcga ctccgagggg tttgtgatcc acgacggcga gtgcatgcag      960
gagtgccctt cgggcttcat ccgcaacggc agccagagca tgtactgcat cccttgtgaa     1020
ggtccttgcc cgaaggctctg tgaggaagaa aagaaaacaa agaccattga ttctgttact     1080
tctgctcaga tgctccaagg atgcaccatc ttcaagggca atttgctcat taacatccga     1140
cgggggaata acattgcttc agagctggag aacttcatgg ggctcatcga ggtggtgacg     1200
ggctacgtga agatccgcc ttctcatgcc ttggtctcct tgccttctt aaaaaacctt     1260
cgcctcatcc taggagagga gcagctagaa gggaattact ctttctacgt cctcgacaac     1320
cagaacttgc agcaactgtg ggactgggac caccgcaacc tgaccatcaa agcagggaaa     1380
atgtactttg ctttcaatcc caaattatgt gtttccgaaa tttaccgcat ggaggaagtg     1440
acggggacta aagggcgcca aagcaaaggg gacataaaca ccaggaacaa cggggagaga     1500

```

gcctcctgtg aaagtgacgt cctgcatttc acctccacca ccacgtcgaa gaatcgcatt 1560  
atcataacct ggcaccggta ccggccccct gactacaggg atctcatcag cttcaccggt 1620  
tactacaagg aagcaccctt taagaatgtc acagagtatg atgggcagga tgcctgcggc 1680  
tccaacagct ggaacatggt ggacgtggac ctcccgccca acaaggacgt ggagcccggc 1740  
atcttactac atgggctgaa gccctggact cagtacgccg tttacgtcaa ggctgtgacc 1800  
ctcacatggt tggagaacga ccatatccgt ggggccaaga gtgagatcct gtacattcgc 1860  
accaatgctt cagttccttc cattcccttg gacgttcttt cagcatcgaa ctccctcttct 1920  
cagttaatcg tgaagtggaa ccctccctct ctgcccaacg gcaacctgag ttactacatt 1980  
gtgctgctggc agcggcagcc tcaggacggc tacctttacc ggcaacaatta ctgctccaaa 2040  
gacaaaatcc ccatcaggaa gtatgccgac ggcaccatcg acattgagga ggtcacagag 2100  
aaccccaaga ctgaggtgtg tgggtggggag aaagggcctt gctgctgctg ccccaaaact 2160  
gaagccgaga agcaggccga gaaggaggag gctgaatacc gcaaagtctt tgagaatttc 2220  
ctgcacaact ccatcttctg gcccagacct gaaaggaagc ggagagatgt catgcaagtg 2280  
gccaacacca ccatgtccag ccgaagcagg aacaccacgg ccgcagacac ctacaacatc 2340  
accgaccggg aagagctgga gacagagtac ctttctttg agagcagagt ggataacaag 2400  
gagagaactg tcatttctaa ccttcggcct ttcacattgt accgcatcga tatccacagc 2460  
tgcaaccacg aggctgagaa gctgggctgc agcgcctcca acttcgtctt tgcaaggact 2520  
atgcccgcag aaggagcaga tgacattcct gggccagtga cctgggagcc aaggcctgaa 2580  
aactccatct ttttaaagtg gccggaacct gagaatcca atggattgat tctaattgat 2640  
gaaataaaat acggatcaca agttgaggat cagcgagaat gtgtgtccag acaggaatac 2700  
aggaagtatg gaggggcaa gctaaaccgg ctaaaccgg ggaactacac agcccggatt 2760  
caggccacat ctctctctgg gaatgggtcg tggacagatc ctgtgttctt ctatgtccag 2820  
gccaaaacag gatatgaaaa ctcatccat ctgatcatcg ctctgcccg cgtgtcctg 2880  
ttgatcgtgg gaggttgggt gattatgctg tacgtcttcc atagaaagag aaataacagc 2940  
aggctgggga atggagtgt gtatgcctct gtgaaccgg agtacttcag cgctgctgat 3000  
gtgtacgttc ctgatgagt ggaggtggct cgggagaaga tcaccatgag ccgggaactt 3060  
gggcaggggt cgtttgggat ggtctatgaa ggagttgcca aggtgtggt gaaagatgaa 3120  
cctgaaacca gagtggccat taaaacagt aacgaggccg caagcatgag tgagaggatt 3180  
gagtttctca acgaagcttc tgtgatgaag gagttcaatt gtcaccatgt ggtgctgatt 3240  
ctgggtgtgg tgtccaagg ccagccaaca ctggtcatca tggactgat gacacggggc 3300  
gatctcaaaa gttatctccg gtctctgagg ccagaaatgg agaataatcc agtcctagca 3360  
cctccaagcc tgagcaagat gattcagatg gccggagaga ttgcagacgg catggcatac 3420  
ctcaacgcc ataagttcgt ccacagagac ctgctgccc ggaattgcat ggtagccgaa 3480  
gatttcacag tcaaaatcgg agattttggt atgacgcgag atatctatga gacagactat 3540

taccggaag gaggcaaagg gctgctgccc gtgctgctgga tgtctctga gtcctcaag	3600
gatggagtct tcaccactta ctcggacgtc tggctcttcg gggctcctct ctgggagatc	3660
gccacactgg ccgagcagcc ctaccagggc ttgtccaacg agcaagtcct tcgcttcgtc	3720
atggagggcg gccttctgga caagccagac aactgtcctg acatgctgtt tgaactgatg	3780
cgcatgtgct ggcagtataa ccccaagatg aggccttcct tcctggagat catcagcagc	3840
atcaaagagg agatggagcc tggcttcctg gaggtctcct tctactacag cgaggagaac	3900
aagctgcccg agccggagga gctggacctg gagccagaga acatggagag cgccccctg	3960
gaccctcgg cctcctcgtc ctccctgcca ctgcccgaca gacactcagg acacaaggcc	4020
gagaacggcc ccggccctgg ggtgctggtc ctccgcgcca gcttcgacga gagacagcct	4080
tacgcccaca tgaacggggg ccgcaagaac gagcgggctt tgccgctgcc ccagtcttcg	4140
acctgctgat ccttgatcc tgaatctgtg caaacagtaa cgtgtgca cgcgacgcg	4200
ggtggggggg gagagagagt ttaacaatc cattcacaag cctcctgtac ctcagtggat	4260
cttcagtctt gcccttctg cccgcgggag acagcttctc tgcaagtaaa cacatttggg	4320
atgttccttt tttaatatg caagcagctt ttattccct gcccaaacc ttaactgaca	4380
tgggccttta agaaccctta tgacaacact taatagcaac agagcacttg agaaccagtc	4440
tcctcactct gtcctgtcc tccctgttc tcctttctc tctcctctct gcttcataac	4500
ggaaaaataa ttgccacaag tccagctggg aagccctttt tatcagtttg aggaagtggc	4560
tgtccctgtg gcccatcca accactgtac acaccgcct gacaccgtgg gtcattacaa	4620
aaaaacacgt ggagatggaa atttttacct ttatctttca cttttctagg gacatgaaat	4680
ttacaaaggg ccatcgttca tccaaggctg ttaccatttt aacgctgcct aattttgcca	4740
aaatcctgaa ctttctccct catcgcccg gcgctgattc ctggtgtccg gaggcattggg	4800
tgagcatggc agctggttgc tccatttgag agacacgctg gcgacacact ccgtccatcc	4860
gactgcccct gctgtgctgc tcaaggccac aggcacacag gtctcattgc ttctgactag	4920
attattattt gggggaactg gacacaatag gtctttctct cagtgaaggt ggggagaagc	4980
tgaaccggc	4989

De acordo com uma forma de realização da presente invenção, é concebido um ARN interferente destinado a um mARN correspondente à SEQ ID NO:1 que compreende os nucleótidos 401, 635, 1062, 1548, 1604, 1643, 1766, 1922, 2012, 2069, 2210, 2416, 2423, 2654, 2909, 3339, 3416, 3464, 3476, 3505, 3512, 3781, 3782, 3881, 4064, 4158, 4411, 4487, 4904, 4905, 4909, 3329, 2323 ou 2887.

A presente invenção também tem por objecto a administração de um segundo ARN interferente a um paciente, para além da administração de um primeiro ARN interferente. Isso consiste em administrar ao paciente um segundo ARN interferente que tenha um comprimento compreendido entre 19 e 49 nucleótidos e que compreenda uma cadeia nucleotídica codificadora, uma cadeia nucleotídica anti-sentido e uma região de complementaridade pelo menos quase perfeita que tenha pelo menos 19 nucleótidos; em que a cadeia anti-sentido do segundo ARN interferente hibrida, em condições fisiológicas, com uma segunda parcela de mARN correspondente à SEQ ID NO:1 e em que a cadeia anti-sentido tem uma região de complementaridade pelo menos quase perfeita que possua pelo menos 19 nucleótidos contíguos com a segunda parcela de mARN hibridante correspondente à SEQ ID NO:1. Além disso, é possível administrar de modo igual um terceiro, um quarto ou um quinto, etc. ARN interferente.

Outra forma de realização da presente invenção consiste em atenuar a expressão do mARN do IGF1R num paciente, consistindo isso em administrar ao paciente uma composição que compreenda uma quantidade eficaz de ARN interferente de cadeia singular que possua um comprimento compreendido entre 19 e 49 nucleótidos e um veículo farmacologicamente aceitável.

Para atenuar a expressão do mARN do IGF1R, faz-se hibridar o ARN interferente de cadeia singular, em condições fisiológicas, com uma parcela de mARN correspondente à SEQ ID NO:1 que compreende os nucleótidos 401, 635, 1062, 1548, 1604, 1643, 1766, 1922, 2012, 2069, 2210, 2416, 2423, 2654, 2909, 3339, 3416, 3464, 3476, 3505, 3512, 3781, 3782, 3881, 4064, 4158, 4411, 4487, 4904, 4905,

4909, 3329, 2323 ou 2887, possuindo o ARN interferente uma região de complementaridade pelo menos quase perfeita que possui pelo menos 19 nucleótidos contíguos com a parcela hibridante de ARN correspondente à SEQ ID NO:1. A expressão do mARN do IGF1R é assim atenuada.

A invenção tem por objecto a sua utilização no tratamento da angiogénese ocular num paciente que disso necessite. Tal utilização consiste em administrar ao olho do paciente uma composição que contenha uma quantidade eficaz de ARN interferente com um comprimento compreendido entre 19 e 49 nucleótidos e um veículo farmacologicamente aceitável, possuindo o ARN interferente uma cadeia nucleotídica codificadora, uma cadeia nucleotídica anti-sentido e uma região de complementaridade pelo menos quase perfeita que possui pelo menos 19 nucleótidos contíguos. A cadeia anti-sentido hibrida, em condições fisiológicas, com uma parcela de mARN correspondente à SEQ ID NO:1 e possui uma região de complementaridade pelo menos quase perfeita que possui pelo menos 19 nucleótidos contíguos com a parcela hibridante de mARN correspondente à SEQ ID NO:1. Deste modo, é assim tratada a angiogénese ocular.

A prática de tratamento da angiogénese ocular num paciente que disso necessite, consiste em administrar ao olho do paciente uma composição que contenha uma quantidade eficaz de ARN interferente, que possua um comprimento compreendido entre 19 e 49 nucleótidos, e um veículo farmacologicamente aceitável, compreendendo o ARN interferente uma região que possua pelo menos 13 nucleótidos contíguos que tenham uma complementaridade sequencial pelo menos igual a 90%, ou uma identidade sequencial pelo menos igual a 90%, com os 13 penúltimos nucleótidos da extremidade 3' de um mARN correspondente a uma qualquer das

sequências designadas por SEQ ID NO:2 e SEQ ID NO:8 - SEQ ID NO:40, sendo assim tratada, deste modo, a angiogénese ocular.

Uma outra forma de realização da presente invenção é a sua utilização para atenuar a expressão de um mARN do IGF1R num paciente, consistindo isso em administrar ao paciente uma composição que contenha uma quantidade eficaz de ARN interferente, que possua um comprimento compreendido entre 19 e 49 nucleótidos, e um veículo farmacologicamente aceitável, em que o ARN interferente compreende uma região que possui pelo menos 13 nucleótidos contíguos que têm uma complementaridade sequencial pelo menos igual a 90%, ou uma identidade sequencial pelo menos igual a 90%, com os 13 penúltimos nucleótidos da extremidade 3' de um mARN correspondente a uma qualquer das sequências designadas por SEQ ID NO:2 e SEQ ID NO:8 - SEQ ID NO:40.

De acordo com uma outra forma de realização da presente invenção, a região dos nucleótidos contíguos é uma região que possui pelo menos 14 nucleótidos contíguos que têm uma complementaridade sequencial pelo menos igual a 85%, ou uma identidade sequencial pelo menos a 85%, com os penúltimos 14 nucleótidos da extremidade 3' de um mARN correspondente à sequência do identificador de sequências. De acordo ainda com uma outra forma de realização da invenção, a região de nucleótidos contíguos é uma região que possui pelo menos 15, 16, 17 ou 18 nucleótidos contíguos com uma complementaridade sequencial pelo menos igual a 80%, ou com uma identidade sequencial pelo menos igual a 80%, respectivamente com os penúltimos 15, 16, 17 ou 18 nucleótidos da extremidade 3' de um mARN correspondente à sequência identificada pelo identificador de sequências.

Uma outra forma de realização da presente invenção diz respeito a uma composição utilizada para tratar a angiogénese ocular num paciente que disso necessite, consistindo tal prática em administrar ao paciente uma composição que compreenda uma molécula de siARN de cadeia dupla que regule negativamente a expressão de um gene de IGF1R por interferência com um ARN, em que cada cadeia da molécula de siARN possui, independentemente, um comprimento entre cerca de 19 e cerca de 27 nucleótidos; e em que uma cadeia da molécula de siARN compreende uma sequência nucleotídica que possui uma complementaridade substancial com um mRNA correspondente ao gene de IGF1R, respectivamente, pelo que a molécula de siARN comanda a clivagem do mRNA por interferência com o ARN.

Uma outra forma de realização da presente invenção diz respeito a uma composição que compreende ARN interferente que possui um comprimento compreendido entre 19 e 49 nucleótidos e que possui uma sequência nucleotídica de uma qualquer das sequências designadas por SEQ ID NO:2 e SEQ ID NO:8 - SEQ ID NO:40, ou um seu complemento, e um veículo farmacologicamente aceitável. De acordo com uma forma de realização, isola-se o ARN interferente. O termo "isolado" significa que o ARN interferente está totalmente isento e separado do seu meio natural.

Uma outra forma de realização da presente invenção diz respeito a uma composição que compreende uma molécula de siARN de cadeia dupla que regula negativamente a expressão de um gene de IGF1R por interferência com ARN, em que cada cadeia da molécula de siARN possui, independentemente, um comprimento compreendido entre cerca de 19 e cerca de 27 nucleótidos; e uma cadeia da molécula de siARN compreende

uma sequência nucleotídica que tem uma complementaridade substancial com um mRNA correspondente ao gene de IGF1R, respectivamente, pelo que a molécula de siARN comanda a clivagem do mRNA por interferência com ARN.

A presente invenção tem uma vantagem relativamente às moléculas pequenas inibidoras de IGF-1R, uma vez que resolve um efeito secundário indesejável observado com as terapias actuais com moléculas pequenas, *v.g.*, a falta de especificidade.

#### DESCRIÇÃO ABREVIADA DO DESENHO

Para se perceber melhor os aperfeiçoamentos e objectivos da invenção enumerados antes, e não só, efectuar-se-á uma descrição mais particular da invenção, abreviadamente descrita *supra*, fazendo referência a formas de realização concretas que irão ser ilustradas por meio do desenho anexo. Faz-se observar que este desenho ilustra apenas formas de realização típicas da invenção e por tal motivo não deve ser considerado como limitativo do seu âmbito, sendo a invenção descrita com mais especificidade e pormenores graças à utilização desse desenho anexo.

A figura ilustra uma transferência de Western de IGF-1R $\beta$  de células HeLa transfectadas com os siARN #6, #8, #17 e #18 de IGF1R e com um siARN de controlo isento de RISC, cada um deles nas concentrações de 10 nM, 1 nM e 0,1 nM; e com um siARN de controlo (NTC2), sem alvo, na concentração de 10 nM; e a solução tampão como controlo (-siARN). As setas indicam as posições do IGF-1R $\beta$  de 97 kDa, do precursor de IGF-1R de 200 kDa e das bandas de actina de 42 kDa.

## DESCRIÇÃO MINUCIOSA DA INVENÇÃO

Os casos especiais aqui apresentados são apenas exemplificativos e têm por objecto ilustrar as formas de realização preferenciais da presente invenção, admitindo-se assim que é feita a descrição mais útil e de mais fácil compreensão dos princípios e dos aspectos conceptuais de diversas formas de realização da presente invenção. Neste contexto, não há a intenção de apresentar pormenores estruturais da invenção com uma minúcia que vá para além da necessária para a compreensão fundamental da invenção, admitindo-se que a memória descritiva, conjuntamente com os desenhos e/ou exemplos, permite aos especialistas na matéria levar à prática as diversas formas da invenção.

As definições e explicações a seguir apresentadas têm por objecto enquadrar qualquer construção futura, a não ser que sejam modificadas clara e inequivocamente nos exemplos subsequentes ou nos casos em que a aplicação de tais significações faça com que qualquer frase ou interpretação fiquem desprovidas ou praticamente desprovidas de sentido. Nos casos em que a frase ou o termo fiquem sem sentido, ou praticamente sem sentido, deve ser considerada a definição da 3ª Edição do Dicionário Webster.

Segundo a utilização presente, todos os valores percentuais dizem respeito a percentagens em peso, salvo quando especificado de outro modo.

Tal como aqui utilizado, um "fluido" é uma substância contínua e amorfa cujas moléculas se movem livremente entre si e que têm a tendência para assumirem a forma do recipiente que as contém, por exemplo, um líquido ou um gás.

Tal como aqui utilizado, o termo "prestador de cuidados de saúde" é conhecido na especialidade e designa, concretamente um médico, uma pessoa com autoridade para prescrever um medicamento (quer directa quer indirectamente) e um veterinário. Em determinadas formas de realização, o prestador de cuidados de saúde pode ser um indivíduo que forneça um medicamento sem prescrição, por exemplo, fornecendo um medicamento livre e claramente.

Tal como aqui utilizados, os termos "identificar pacientes" e "diagnosticar" são utilizados indiferentemente a propósito da detecção de uma "predisposição", "maior propensão", "risco", "maior risco" e não só.

Tal como aqui utilizado, o termo "outra patologia retinal ou do nervo óptico" designa e identifica pelo menos uma patologia seleccionada entre degeneração macular associada à idade, catarata, neuropatia óptica isquémica aguda (AION), commotio retinal, descolamento da retina, roturas ou perfurações da retina, retinopatia diabética e retinopatia iatrogénica e outras retinopatias isquémicas ou neuropatias ópticas, miopia, retinite pigmentosa e não só.

A interferência com ARN (RNAi) é um processo segundo o qual se utiliza ARN de cadeia dupla (dsRNA) para obliterar a expressão de genes. Sem pretendermos estabelecer associações com qualquer teoria, a RNAi começa com a clivagem de cadeias mais compridas dos dsRNA, originando diversos ARN interferentes pequenos (siARN), por acção de uma enzima semelhante a RNaseIII, designada por dicer. Os siARN são os dsRNA com um comprimento compreendido normalmente entre cerca de 19 e 28 nucleótidos, ou entre 20 e 25 nucleótidos, ou com 21 ou 22 nucleótidos, e contêm frequentemente excrescências de dois nucleótidos na extremidade 3' e grupos

fosfato em 5' e hidroxilo em 3'. Uma cadeia do siARN está incorporada num complexo ribonucleoproteínico conhecido pela designação de complexo de obliteração induzida pelo ARN (RISC). O RISC utiliza esta cadeia de siARN para identificar moléculas de mARN que sejam pelo menos parcialmente complementares com a cadeia do siARN incorporado e depois cliva estes mARN destinatários ou inibe a sua tradução. Assim sendo, a cadeia de siARN que é incorporada no RISC, é designada por cadeia guia ou cadeia anti-sentido. A outra cadeia de siARN, conhecida pela designação de cadeia passageira ou cadeia codificadora, é eliminada do siARN e é, pelo menos parcialmente, homóloga com o mARN alvo. Os especialistas na matéria sabem que é possível, em princípio, incorporar qualquer cadeia de um siARN num RISC, que irá funcionar como cadeia guia. No entanto, o projecto e concepção de siARN (v.g., menor estabilidade da hélice dupla de siARN na extremidade 5' da cadeia anti-sentido) pode favorecer a incorporação da cadeia anti-sentido no RISC.

A clivagem dos mARN, induzida pelo RISC, os quais possuem uma sequência pelo menos parcialmente complementar com a cadeia guia, origina uma diminuição do nível de estabilidade do mARN e da correspondente proteína codificada por este mARN. Em alternativa, o RISC também pode reduzir a expressão da correspondente proteína através da repressão traducional sem clivagem do mARN alvo. Há outras moléculas de ARN e outras moléculas semelhantes a ARN que também podem interagir com o RISC e obliterar a expressão génica. Como exemplos de outras moléculas de ARN que podem interagir com o RISC refere-se as hélices duplas fechadas e curtas de ARN (shARN), os siARN de cadeia singular, os microRNA (miRNA) e as cadeias duplas

icosaeptaméricas (27 meros) de substrato dicer. O termo "siARN", tal como aqui utilizado, designa um ARN interferente de cadeia dupla, salvo quando especificado de outro modo. Como exemplos de moléculas semelhantes a ARN, que podem interagir com o RISC, refere-se as moléculas de ARN que contêm um ou vários nucleótidos quimicamente modificados, um ou vários desoxirribonucleótidos e/ou uma ou várias pontes não fosfodiéster. Para os objectivos da presente análise descritiva, todas as moléculas de ARN, ou semelhantes a ARN, que consigam interagir com o RISC e participar nas modificações induzidas pelo RISC na expressão génica irão aqui ser designadas por "ARN interferentes". Assim sendo, os siRNA, shARN, miRNA e as cadeias duplas de 27 meros de substrato dicer são subconjuntos dos "ARN interferentes"

Presume-se que os ARN interferentes, das formas de realização da presente invenção, actuem de uma maneira catalítica para a clivagem do mRNA alvo, isto é, o ARN interferente consegue efectuar a inibição do mRNA alvo em quantidades subestequimétricas. Comparativamente com as terapias anti-sentido, é necessário significativamente menos ARN interferente para se obter um efeito terapêutico em tais condições de clivagem.

A presente invenção diz respeito à utilização de ARN interferente para inibir a expressão do mRNA do receptor do factor 1 de crescimento semelhante à insulina (IGF-1R), interferindo assim com a ligação do ligando e interferindo com a subsequente proliferação e angiogénese. De acordo com a presente invenção, os diversos ARN interferentes administrados exogenamente, ou expressos endogenamente, determinam a obliteração da expressão de IGF1R em tecidos oculares.

As sequências de ácidos nucleicos aqui citadas estão escritas na direção de 5' para 3', salvo quando indicado de outro modo. O termo "ácido nucleico", tal como aqui utilizado, refere-se a ADN ou a ARN ou a uma sua forma modificada que contenha as bases purínicas ou pirimidínicas presentes no ADN (adenina "A," citosina "C," guanina "G," timina "T") ou no ARN (adenina "A," citosina "C," guanina "G," uracilo "U"). Os ARN interferentes aqui previstos podem compreender bases "T", particularmente nas extremidades 3', embora as bases "T" não ocorram naturalmente no ARN. O termo "ácido nucleico" abrange os termos "oligonucleótido" e "polinucleótido" e pode designar uma molécula de cadeia singular ou uma molécula de cadeia dupla. Uma molécula de cadeia dupla forma-se pelo emparelhamento de bases Watson-Crick entre bases A e T, entre bases C e G e entre bases A e U. As cadeias de uma molécula de cadeia dupla podem ter uma complementaridade parcial, substancial ou total entre si e irão formar um híbrido duplo cuja força de ligação depende da natureza e do grau de complementaridade da sequência de bases.

Deduz-se facilmente uma sequência de mRNA a partir da sequência do ADN correspondente. Por exemplo, a SEQ ID NO:1 proporciona a sequência da cadeia codificadora de ADN correspondente ao mRNA para o IGF1R. A sequência de mRNA é idêntica à sequência da cadeia codificadora de ADN com as bases "T" substituídas por bases "U". Assim sendo, conhece-se a sequência do mRNA do IGF1R a partir da SEQ ID NO:1.

*mARN do receptor do factor 1 de crescimento semelhante à insula (IGF1R):* o IGF-1R é um membro da família dos receptores de tirosina-cinase. A clivagem proteolítica do precursor de IGF-1R gera a subunidade  $\alpha$  extracelular de

ligação ao ligando e a subunidade  $\beta$  transmembranar que contém o domínio intracelular de tirosina-cinase. O IGF-1R possui duas subunidades  $\alpha$  e duas subunidades  $\beta$  ligadas por pontes dissulfureto. A ligação ao ligando desencadeia a autotransfosforilação que favorece a proliferação e a sobrevivência celular.

As actividades biológicas do factor 1 de crescimento insulínico são induzidas através de IGF-1R. Observou-se um aumento de IGF-1 em fluidos e tecidos oculares de pacientes com retinopatia diabética em progressão. Foram encontrados diversos factores de crescimento proangiogénicos, incluindo o factor 1 de crescimento semelhante à insulina, em tecidos e fluidos de pacientes com angiogénese ocular. Os pacientes tratados subcutaneamente com octreótido, que é uma somatostatina análoga que inibe o corpo central de GH/IGF1, manifestam melhorias gerais em DME e PDR. No modelo de OIR de murganho, o tratamento com um inibidor de GH, ou com um antagonista de IGF-1R, reduz de forma significativa a neovascularização retinal. O IGF-1 estimula a produção endotelial retinal de factor de crescimento endotelial vascular *in vitro*. Num modelo de murganho diabético, a terapia com IGF-1, induzido por plasmídeos, reverteu o fluxo arterial e o aumento de angiogénese de origem diabética. Deste modo, prevê-se aqui a inibição da expressão do IGF-1R para tratar a angiogénese ocular, incluindo a actividade celular pré-angiogénica e angiogénica.

A base de dados 'GenBank' do Centro Nacional para Informação Biotecnológica fornece em [ncbi.nlm.nih.gov](http://ncbi.nlm.nih.gov) a sequência de ADN para o IGF1R, com o número de admissão NM\_000875, apresentada na "Listagem de Sequências" com a designação de SEQ ID NO:1. A SEQ ID NO:1 proporciona a

sequência da cadeia codificadora de ADN que corresponde ao mRNA que codifica o IGF1R (com a excepção de bases "T" em vez de bases "U"). A sequência codificadora para IGF1R abrange os nucleótidos 46-4149.

Os equivalentes da sequência supramencionada de mRNA de IGF1R são alternativas de formas unidas, formas alélicas, isozimas ou um dos seus cognados. Um cognado é um mRNA de IGF1R proveniente de uma outra espécie de mamíferos, com uma sequência homóloga da SEQ ID NO:1 (um ortólogo).

*Atenuação da expressão de um mRNA:* a frase "atenuação da expressão de um mRNA", tal como aqui utilizada, significa a administração ou a expressão de uma quantidade de ARN interferente (v.g., um siARN) para reduzir a tradução do mRNA alvo em proteínas, quer através da clivagem do mRNA, quer através da inibição directa da tradução. A redução da expressão do mRNA alvo, ou da proteína correspondente, é vulgarmente designada por "inactivação" e é calculada relativamente aos níveis presentes após a administração ou expressão de um ARN de controlo sem alvo (v.g., um siARN de controlo sem alvo). Nas formas de realização aqui apresentadas está prevista uma inactivação da expressão de uma quantidade correspondente a valores compreendidos entre 50% e 100%. No entanto, não é necessário que sejam alcançados tais níveis de inactivação, para os objectivos da presente invenção. De acordo com uma forma de realização, administra-se um ARN interferente de cadeia singular dirigido ao IGF1R para reduzir a produção de IGF1R, inibindo assim a via de sinalização do IGF1R. De acordo com outras formas de realização, são administrados dois ou vários ARN

interferentes dirigidos aos mARN dos IGF1R para reduzir a expressão. Ainda de acordo com outras formas de realização, administra-se um primeiro ARN interferente dirigido ao mARN do IGF1R e um segundo ARN interferente dirigido a um outro mARN do receptor da tirosina-cinase para se conseguir reduzir a actividade celular ocular pré-angiogénica e angiogénica.

Normalmente, avalia-se a inactivação medindo os níveis de mARN, recorrendo a uma amplificação quantitativa por reacção em cadeia com polimerase (qPCR), ou medindo os níveis de proteínas por transferência de Western ou por meio de ensaios imunoabsorventes ligados a enzimas (ELISA). A análise dos níveis de proteínas permite avaliar simultaneamente a clivagem do mARN e também a inibição da tradução. Há outras técnicas para a medição da inactivação, entre as quais se refere a hibridação em solução de ARN, a protecção para nucleases, a hibridação Northern, a monitorização da expressão génica com uma micromatriz, a ligação de anticorpos, radioimunoensaios e a análise de células activadas pela fluorescência.

Conclui-se que também há inibição dos agentes aqui citados, num ser humano ou num mamífero, observando uma melhoria num sintoma de angiogénese ocular, tal como, por exemplo, uma melhoria no edema retinal, na retinopatia diabética, na isquemia retinal ou na neovascularização do segmento posterior (PSNV).

*ARN interferente:* de acordo com uma forma de realização da invenção, o ARN interferente (v.g., siARN) tem uma cadeia codificadora e uma cadeia anti-sentido, compreendendo as cadeias codificadora e anti-sentido uma região de complementaridade pelo menos quase perfeita que

possui pelo menos 19 nucleótidos contíguos. De acordo com uma outra forma de realização da invenção, o ARN interferente (v.g., siARN) possui uma cadeia codificadora e uma cadeia anti-sentido, compreendendo a cadeia anti-sentido uma região de complementaridade pelo menos quase perfeita que possui pelo menos 19 nucleótidos contíguos a uma sequência destinatária de mRNA de IGF1R e possuindo a cadeia codificadora uma região de identidade quase perfeita que possui pelo menos 19 nucleótidos contíguos com uma sequência destinatária de mRNA de IGF1R, respectivamente. De acordo com uma outra forma de realização da invenção, o ARN interferente compreende uma região que possui pelo menos 13, 14, 15, 16, 17 ou 18 nucleótidos contíguos com percentagens de complementaridade sequencial, ou com percentagens de identidade sequencial, com os penúltimos 13, 14, 15, 16, 17 ou 18 nucleótidos, respectivamente, da extremidade 3' de um ARN que corresponde à sequência destinatária correspondente num mRNA.

Cada cadeia do ARN interferente tem um comprimento compreendido entre 19 e 49 nucleótidos e por isso pode ser um comprimento de 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 ou 49 nucleótidos.

A cadeia anti-sentido de um siARN é o agente guia activo do siARN, visto que a cadeia anti-sentido é incorporada no RISC, permitindo assim ao RISC identificar diversos mRNA destinatários que possuam uma complementaridade, pelo menos parcial, com a cadeia de siARN anti-sentido para clivagem ou para repressão da tradução.

Em formas de realização da presente invenção, as sequências destinatárias de ARN interferente (v.g.,

sequências destinatárias de siARN), contidas numa sequência de mRNA alvo, são selecionadas utilizando ferramentas de concepção e projecto disponíveis. Os diversos ARN interferentes correspondentes a uma sequência destinatária de IGF1R, são depois testados por transfecção de células em que tem lugar a expressão do mRNA alvo, seguindo-se a avaliação da inactivação, conforme descrito *supra*.

As técnicas para a selecção de sequências destinatárias para os diversos siARN são as descritas por Tuschl, T. *et al.*, "The siARN User Guide", revista em 6 de Maio de 2004 e disponível no web site da Universidade de Rockefeller; as descritas em Technical Bulletin #506, "siARN Design Guidelines," Ambion Inc. no web site da Ambion; e as fornecidas por outras ferramentas de projecto e concepção disponíveis em web sites, por exemplo, os web sites de Invitrogen, Dharmacon, Integrated ADN Technologies, Genscript ou Proligo. Os parâmetros iniciais de pesquisa podem ter conteúdos G/C compreendidos entre 35% e 55% e comprimentos de siARN compreendidos entre 19 e 27 nucleótidos. A sequência destinatária pode estar localizada na região codificadora ou nas regiões não traduzidas de 5' ou 3' do mRNA.

Uma variante de uma sequência destinatária de ADN de 19 nucleótidos para o mRNA de IGF1R é a que é constituída pelos nucleótidos 401 a 419 da SEQ ID NO:1:

**5' - TCTTCGAGATGACCAATCT -3' SEQ ID NO:2.**

Um siARN da invenção destinado a uma correspondente sequência de mRNA identificada por SEQ ID NO:2 e que possua

cadeias de 21 nucleótidos e uma excrescência de dois nucleótidos em 3' é:

**5'-UCUUCGAGAUGACCAAUCUNN-3'                   SEQ ID NO:3**  
**3'-NNAGAAGCUCUACUGGUUAGA-5'                   SEQ ID NO:4.**

Cada resíduo "N" pode ser qualquer nucleótido (A, C, G, U, T) ou qualquer nucleótido modificado. A extremidade 3' pode ter um número qualquer "N" de resíduos, variando entre 1, 2, 3, 4, 5 e 6. Os resíduos "N" de qualquer cadeia podem ser iguais (v.g., UU, AA, CC, GG ou TT) ou diferentes (v.g., AC, AG, AU, CA, CG, CU, GA, GC, GU, UA, UC ou UG). As excrescências em 3' podem ser iguais ou diferentes. De acordo com uma forma de realização, ambas as cadeias possuem uma excrescência 3'UU.

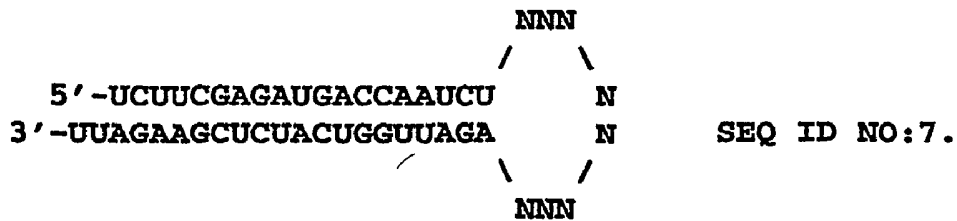
Um siARN da invenção destinado a uma correspondente sequência de mRNA identificada por SEQ ID NO:2 e que possua cadeias de 21 nucleótidos e uma excrescência 3'UU em cada cadeia é:

**5'-UCUUCGAGAUGACCAAUCUUU-3'                   SEQ ID NO:5**  
**3'-UUAGAAGCUCUACUGGUUAGA-5'                   SEQ ID NO:6.**

O ARN interferente também pode ter uma excrescência de nucleótidos em 5', ou pode ter as extremidades a condizer. Um siARN da invenção destinado a uma correspondente sequência de mRNA identificada por SEQ ID NO:2 e que possua cadeias de 19 nucleótidos com extremidades a condizer é:

**5'-UCUUCGAGAUGACCAAUCU -3'                   SEQ ID NO:41**  
**3'-AGAAGCUCUACUGGUUAGA -5'                   SEQ ID NO:42.**

As cadeias de um ARN interferente de cadeia dupla (v.g., um siARN) podem ser ligadas para formarem uma estrutura de hélice dupla fechada ou unciforme (v.g., um shARN). Um shARN da invenção destinada a uma correspondente sequência de mARN identificada por SEQ ID NO:1 e com uma região de hélice dupla fechada de 19 pb e com uma excrescência 3'UU é:



O símbolo N representa um nucleótido A, T, C, G, U ou uma forma modificada conhecida pelos especialistas na matéria. O número de nucleótidos N no laço fechado é um número compreendido entre 3 a 23 inclusive, ou entre 5 e 15, ou entre 7 e 13, ou entre 4 e 9, ou entre 9 e 11, ou então o número de nucleótidos N é igual a 9. Alguns dos nucleótidos do laço fechado podem estar implicados em interacções do tipo pares de bases com outros nucleótidos de laço fechado. Como exemplos de sequências de oligonucleótidos que é possível utilizar para se obter um laço fechado refere-se 5'-UUCAAGAGA-3' (Brummelkamp, T.R. *et al.* (2002) *Science* 296: 550) e 5'-UUUGUGUAG-3' (Castanotto, D. *et al.* (2002) *ARN* 8:1454). Um especialista na matéria conclui facilmente que o oligonucleótido de cadeia singular forma uma estrutura em hélice dupla fechada ou unciforme que compreende uma região de cadeia dupla capaz de interactivar com a maquinaria do RNAi.

A sequência relevante do siARN identificada *supra* pode ser prolongada na extremidade 3' para facilitar o projecto

e concepção de hélices duplas icosaeptaméricas (27 meros) de substrato dicer. O prolongamento da sequência relevante de ADN de 19 nucleótidos (SEQ ID NO:2), identificada na sequência do ADN do IGF1R (SEQ ID NO:1), com mais 6 nucleótidos, proporciona uma sequência destinatária relevante de ADN de 25 nucleótidos que vai desde o nucleótido 401 ao 425 da SEQ ID NO:1:

**5' - TCTTCGAGATGACCAATCTCAAGGA -3' SEQ ID NO:43.**

Uma hélice dupla de 27 meros de substrato dicer da presente invenção, destinada a uma correspondente sequência de ARN identificada por SEQ ID NO:43, é:

**5' - UCUUCGAGAUGACCAAUCUCAAGGA -3' SEQ ID NO:44**  
**3' - UUAGAAGCUCUACUGGUAGAGUCCU -5' SEQ ID NO:45.**

Os dois nucleótidos da extremidade 3' da cadeia codificadora (isto é, os nucleótidos GA da SEQ ID NO:44) podem ser desoxinucleótidos para um processamento reforçado. O projecto e concepção de hélices duplas de 27 meros de substrato dicer, a partir de sequências destinatárias relevantes de 19-21 nucleótidos, tal como aqui previsto, está complementado e analisado no web site de 'Integrated DNA Technologies' (IDT) pelos autores Kim, D.-H. et al., (Fevereiro de 2005) Nature Biotechnology 23:2; 222-226.

Quando os diversos ARN interferentes são produzidos por síntese química, a fosforilação na posição 5' do nucleótido na extremidade 5' de uma ou de ambas as cadeias (se existirem) pode reforçar a eficácia do siARN e a especificidade do complexo de RISC ligado, mas isso não é

obrigatório, uma vez que a fosforilação pode ocorrer intracelularmente.

O quadro 1 enumera exemplos de sequências relevantes de ADN de IGF1R da SEQ ID NO:1 a partir das quais os siARN da presente invenção são projectados e concebidos da maneira explicitada anteriormente. O IGF1R codifica o receptor do factor 1 de crescimento semelhante à insulina, conforme se disse *supra*.

**Quadro 1. Sequências relevantes de IGF1R para os siARN**

<b>Sequência relevante de IGF1R</b>	<b># de nucleótidos iniciais tomando como referência a SEQ ID NO:1</b>	<b>SEQ ID NO:</b>
TCTTCGAGATGACCAATCT	401	2
TCAACAATGAGTACAATA	635	8
GACCATTGATTCTGTTACT	1062	9
GAAGAATCGCATCATCATA	1548	10
TCATCAGCTTCACCGTTTA	1604	11
AGAATGTCACAGAGTATGA	1643	12
GGACTCAGTACGCCGTTTA	1766	13
AGTTAATCGTGAAGTGGAA	1922	14
ACCTTTACCGGCACAATTA	2012	15
ACGGCACCATCGACATTGA	2069	16
TTGAGAATTTCTGCACAA	2210	17
TCTAACCTTCGGCCTTTCA	2416	18
TTCGGCCTTTCACATTGTA	2423	19
GATCACAAGTTGAGGATCA	2654	20
TGTACGTCTTCCATAGAAA	2909	21
GGAGAATAATCCAGTCCTA	3339	22
CATACCTCAACGCCAATAA	3416	23
ATTGCATGGTAGCCGAAGA	3464	24

<b>Sequência relevante de IGF1R</b>	<b># de nucleótidos iniciais tomando como referência a SEQ ID NO:1</b>	<b>SEQ ID NO:</b>
CCGAAGATTTACAGTCAA	3476	25
TTTGGTATGACGCGAGATA	3505	26
TGACGCGAGATATCTATGA	3512	27
CGCATGTGCTGGCAGTATA	3781	28
GCATGTGCTGGCAGTATAA	3782	29
TCTACTACAGCGAGGAGAA	3881	30
TCGACGAGAGACAGCCTTA	4064	31
TCCTGAATCTGTGCAAACA	4158	32
TAATAGCAACAGAGCACTT	4411	33
CTCTGCTTCATAACGGAAA	4487	34
TCATTGCTTCTGACTAGAT	4904	35
CATTGCTTCTGACTAGATT	4905	36
GCTTCTGACTAGATTATTA	4909	37
GGCCAGAAATGGAGAATAA	3329	38
GCAGACACCTACAACATCA	2323	39
GTGGGAGGGTTGGTGATTA	2887	40

Conforme se disse nos exemplos anteriores, um especialista na matéria sabe como utilizar a informação da sequência relevante indicada no quadro 1 para projectar e conceber diversos ARN interferentes com um comprimento mais curto ou mais comprido do que o das sequências apresentadas no quadro e tomando como referência a posição sequencial na SEQ ID NO:1 e acrescentando ou suprimindo nucleótidos complementares ou quase complementares à SEQ ID NO:1.

A reacção de clivagem do ARN relevante, guiada pelos diversos siARN e por outras formas de ARN interferentes, é altamente específica da sequência. Em geral, os siARN que contenham uma cadeia nucleotídica codificadora com uma

sequência idêntica a uma parcela do mRNA alvo relevante e uma cadeia nucleotídica anti-sentido exactamente complementar com uma parcela do mRNA alvo relevante são variantes de siARN para inibição dos diversos mRNA aqui citados. No entanto, para a prática da presente invenção não é necessária uma complementaridade sequencial de 100% entre a cadeia de siARN anti-sentido e o mRNA alvo relevante, ou entre a cadeia de siARN anti-sentido e a cadeia de siARN codificadora. Assim, por exemplo, a invenção permite variações sequenciais que eventualmente possam ser previsíveis devido a mutações genéticas, polimorfismo de cadeias ou divergência evolucionária.

De acordo com uma forma de realização da invenção, a cadeia do siARN anti-sentido tem uma complementaridade pelo menos quase perfeita em que há pelo menos 19 nucleótidos contíguos com o mRNA alvo relevante. O termo "quase perfeito", tal como aqui utilizado, significa que a cadeia anti-sentido do siARN é "substancialmente complementar com" e que a cadeia codificadora do siARN é "substancialmente idêntica a" pelo menos uma parcela do mRNA alvo relevante. O termo "identidade", tal como utilizado e conhecido por um especialista na matéria, significa o grau de conotação entre sequências de nucleótidos, conforme determinado fazendo coincidir a ordem e a identidade de nucleótidos entre as sequências. De acordo com uma forma de realização, para uma cadeia anti-sentido de um siARN que tenha uma complementaridade igual a 80% ou entre 80% e 100%, por exemplo, uma complementaridade de 85%, 90% ou 95%, com a sequência do mRNA alvo relevante, considera-se que há uma complementaridade quase perfeita, podendo ser utilizada na presente invenção Uma complementaridade contígua "perfeita"

corresponde ao emparelhamento convencional de bases de Watson-Crick para os pares de bases adjacentes. Uma complementaridade contígua "pelo menos quase perfeita" abrange a definição de complementaridade "perfeita", tal como aqui se utiliza. Existem métodos informáticos para determinar a identidade ou a complementaridade, os quais servem para identificar o grau máximo de correspondência entre sequências de nucleótidos, por exemplo, a aplicação informática BLASTN (Altschul, S.F., *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410).

O termo "identidade percentual" indica que a percentagem de nucleótidos contíguos numa primeira molécula de ácido nucleico é a mesma existente num conjunto de nucleótidos contíguos com o mesmo comprimento numa segunda molécula de ácido nucleico. O termo "complementaridade percentual" indica a percentagem de nucleótidos contíguos, numa primeira molécula de ácido nucleico, que podem ser emparelhados, no sentido do emparelhamento de pares de bases de Watson-Crick, com um conjunto de nucleótidos contíguos pertencentes a uma segunda molécula de ácido nucleico.

A relação entre um mRNA alvo relevante (cadeia codificadora) e uma cadeia de um siARN (a cadeia codificadora) é a de identidade. A cadeia codificadora de um siARN recebe também a designação de cadeia passageira, se existir. A relação entre um mRNA alvo relevante (cadeia codificadora) e a outra cadeia de um siARN (a cadeia anti-sentido) é a de complementaridade. A cadeia anti-sentido de um siARN recebe também a designação de cadeia guia.

A penúltima base numa sequência de ácidos nucleicos que esteja escrita no sentido de 5' para 3' é a subsequente

à última base, isto é, a base a seguir à base de 3'. As penúltimas 13 bases de uma sequência de ácidos nucleicos escrita no sentido de 5' para 3' são as últimas 13 bases de uma sequência, subsequentes à base de 3', sem incluir a base de 3'. De igual modo, as penúltimas 14, 15, 16, 17 ou 18 bases de uma sequência de ácidos nucleicos, escrita no sentido de 5' para 3', são respectivamente as últimas 14, 15, 16, 17 ou 18 bases de uma sequência, subsequentes à base de 3', sem incluir a base de 3'.

A frase "uma região que tenha pelo menos 13 nucleótidos contíguos em que haja pelo menos 90% de complementaridade sequencial, ou pelo menos 90% de identidade sequencial, com os penúltimos 13 nucleótidos da extremidade 3' de um mRNA correspondente a qualquer uma de (um identificador de sequências)" permite a substituição de um nucleótido. Não estão incluídas em tal frase as duas substituições de nucleótidos (isto é,  $11/13 = 85\%$  de identidade/complementaridade).

De acordo com uma forma de realização da invenção, a região de nucleótidos contíguos é uma região que tem pelo menos 14 nucleótidos contíguos que possuem uma complementaridade sequencial pelo menos igual a 85%, ou uma identidade sequencial pelo menos igual a 85%, com os penúltimos 14 nucleótidos da extremidade 3' de um mRNA correspondente à sequência identificada por cada identificador de sequências. Uma frase deste tipo abrange duas substituições de nucleótidos (isto é,  $12/14 = 86\%$  de identidade/complementaridade).

De acordo com uma outra forma de realização da invenção, a região de nucleótidos contíguos é uma região que possui pelo menos 15, 16, 17 ou 18 nucleótidos

contíguos que têm uma complementaridade sequencial pelo menos igual a 80%, ou uma identidade sequencial pelo menos igual a 80%, com os penúltimos 14 nucleótidos da extremidade 3' de um mRNA correspondente à sequência do identificador de sequências. Uma frase deste tipo pressupõe três substituições de nucleótidos.

A sequência destinatária relevante nos diversos mRNA, correspondente à SEQ ID NO:1, pode estar nas regiões não traduzidas de 5' ou 3' do mRNA, bem como na região codificadora do mRNA.

Uma ou ambas as cadeias do ARN interferente de cadeias duplas pode ter uma excrescência em 3' constituída por 1 a 6 nucleótidos, os quais podem ser ribonucleótidos ou desoxirribonucleótidos ou uma sua mistura. Os nucleótidos da excrescência não são de bases emparelhadas. De acordo com uma forma de realização da invenção, o ARN interferente possui uma excrescência de TT ou UU em 3'. De acordo com uma outra forma de realização da invenção, o ARN interferente possui pelo menos uma extremidade rectificada. Os terminais possuem, normalmente, um grupo fosfato em 5' ou um grupo hidroxilo em 3'. Em outras formas de realização, a cadeia anti-sentido possui um grupo fosfato em 5' e a cadeia codificadora possui um grupo hidroxilo em 5'. Ainda noutras formas de realização, os terminais são objecto de mais modificações por adição covalente de outras moléculas ou grupos funcionais.

As cadeias codificadora e anti-sentido do siARN de cadeia dupla podem apresentar uma formação dúplex de duas cadeias singulares, conforme descrito *supra*, ou podem constituir uma única molécula em que as regiões de complementaridade são de bases emparelhadas e estão ligadas

de forma covalente por uma hélice dupla fechada, de modo a formarem assim uma cadeia singular. Admite-se que a hélice dupla fechada seja clivada intracelularmente por uma proteína chamada dicer, para formar um ARN interferente de duas moléculas individuais de ARN de bases emparelhadas.

Os diversos ARN interferentes podem ser diferentes de um ARN que ocorra naturalmente, mediante adição, deleção, substituição ou modificação de um ou vários nucleótidos. O material não nucleotídico pode estar ligado ao ARN interferente na extremidade 5', na extremidade 3' ou internamente. Tais modificações são projectadas e concebidas normalmente para fazer com que os ARN interferentes fiquem mais resistentes às nucleases, para melhorar a incorporação celular, para reforçar o endereçamento celular, para ajudar a pesquisar o ARN interferente, para melhorar ainda mais a estabilidade ou para reduzir o potencial de activação das vias do interferão. Por exemplo, os ARN interferentes podem compreender um nucleótido purina nas extremidades das excrescências. A conjugação de colesterol à extremidade 3' da cadeia codificadora de uma molécula de siARN, por meio de um ligador pirrolidina, por exemplo, proporciona também estabilidade a um siARN.

Outras modificações são a inclusão de uma molécula de biotina no terminal 3', um péptido conhecido por ter propriedades de penetração celular, uma nanopartícula, um peptidomimético, um corante fluorescente ou um dendrímero, por exemplo.

Os nucleótidos podem ser modificados nos seus radicais de base, nos seus radicais açúcar ou nos seus radicais fosfato da molécula e podem actuar em formas de realização da presente invenção. Tais modificações compreendem

substituições com grupos alquilo, alcoxi, amino, desaza, halo, hidroxilo e tiol ou com uma sua combinação, por exemplo. Os nucleótidos podem ser substituídos por análogos com maior estabilidade, por exemplo, a substituição de um ribonucleótido por um desoxirribonucleótido, ou podem ter modificações de radicais açúcar, tais como grupos 2'-OH substituídos por grupos 2'-amino, grupos 2'-O-metilo, grupos 2'-metoxietil ou pontes 2'-O, 4'-C -metileno, por exemplo. Como exemplos de análogos de nucleótidos purínicos ou pirimidínicos refere-se os seleccionados entre xantina, hipoxantina, azapurina, metiltioadenina, 7-desaza-adenosina e os nucleótidos modificados em O e N. O grupo fosfato do nucleótido pode ser modificado substituindo um ou vários dos átomos de oxigénio do grupo fosfato por átomos de azoto ou átomos de enxofre (fosforotioatos). As modificações são úteis, por exemplo, para aumentar a actividade, para melhorar a estabilidade ou a permeabilidade ou para orientar a localização ou o endereçamento.

Pode haver uma ou várias regiões da cadeia de ARN interferente anti-sentido que não sejam complementares de uma parcela da SEQ ID NO:1. As regiões não complementares podem estar numa das extremidades 3', 5' ou ambas de uma região complementar ou entre duas regiões complementares.

Os diversos ARN interferentes podem ser gerados exogenamente por síntese química, por transcrição *in vitro* ou por clivagem de sequências mais compridas de ARN de cadeia dupla, com uma nuclease dicer ou com uma outra nuclease adequada com actividade semelhante. Os ARN interferentes, sintetizados quimicamente, produzidos a partir de fosforamiditos de ribonucleósidos protegidos, utilizando um sintetizador convencional de ADN/ARN, podem

ser adquiridos nos circuitos comerciais em fornecedores tais como Ambion Inc. (Austin, TX), Invitrogen (Carlsbad, CA) ou Dharmacon (Lafayette, CO). Os ARN interferentes são purificados, por exemplo, por extracção com um solvente ou com uma resina ou por precipitação, electroforese, cromatografia ou por meio de uma combinação destes processos. Em alternativa, o ARN interferente pode ser utilizado com pouca ou nenhuma purificação, para evitar perdas devidas ao processamento da amostra.

Os ARN interferentes também podem ser expressos endogenamente a partir de vectores de expressão plasmídica ou viral ou a partir de cassetes de expressão mínima, por exemplo, os fragmentos gerados por PCR que compreendam um ou vários promotores e uma ou várias matrizes convenientes para o ARN interferente. Como exemplos de vectores de expressão de base plasmídica, disponíveis nos circuitos comerciais para shARN, refere-se os membros da série pSilencer (Ambion, Austin, TX) e pCpG-siARN (InvivoGen, San Diego, CA). Os vectores virais para expressão de ARN interferente podem ser obtidos a partir de diversos vírus, incluindo os adenovírus, os vírus associados aos adenovírus, lentivirus (v.g., HIV, FIV e EIAV) e vírus do herpes. Como exemplos de vectores virais, existentes nos circuitos comerciais para a expressão de shARN, refere-se pSilencer (Ambion, Austin, TX) e pLenti6BLOCK-iT™-DEST (Invitrogen, Carlsbad, CA). A selecção de vectores virais, os processos para a expressão do ARN interferente a partir dos vectores e os processos para administração dos vectores virais são assuntos da competência de especialistas na matéria. Como exemplos de estojos para a produção de cassetes de expressão de shARN, geradas por PCR, refere-se

Silencer Express (Ambion, Austin, TX) e siXpress (Mirus, Madison, WI). Um primeiro ARN interferente pode ser administrado através de expressão *in vivo* a partir de um primeiro vector de expressão capaz de exprimir o primeiro ARN interferente e o segundo ARN interferente pode ser administrado através de expressão *in vivo* a partir de um segundo vector de expressão capaz de exprimir o segundo ARN interferente, ou ambos os ARN interferentes podem ser administrados através de expressão *in vivo* a partir de um único vector de expressão capaz de exprimir ambos os ARN interferentes.

Os ARN interferentes podem ser expressos a partir de diversos promotores eucarióticos conhecidos pelos especialistas na matéria, incluindo os promotores pol III, tais como os promotores U6 ou H1, ou os promotores pol II, tais como o promotor de citomegalovírus. Os especialistas na matéria sabem que estes promotores também podem ser adaptados para permitirem a expressão induzível do ARN interferente.

*Hibridação em condições fisiológicas:* em determinadas formas de realização da presente invenção, uma cadeia anti-sentido de ARN interferente hibrida com um mRNA *in vivo*, enquanto parte do complexo RISC.

O termo "hibridação" designa um processo em que ácidos nucleicos de cadeia singular, com sequências de bases complementares ou quase complementares, interactuam para formarem complexos ligados por pontes hidrogénio, designados híbridos. As reacções de hibridação são sensíveis e selectivas. *In vitro*, faz-se a regulação da especificidade da hibridação (isto é, restringência das condições), por exemplo, pelas concentrações de sais ou de formamida nas

soluções de pré-hibridação e de hibridação, e também pela temperatura de hibridação; tais procedimentos são perfeitamente conhecidos na especialidade. Em particular, aumenta-se a restringência das condições reduzindo a concentração salina, aumentando a concentração de formamida ou aumentando a temperatura de hibridação.

Por exemplo, poderemos estar perante condições de restringência elevada para uma concentração de formamida de cerca de 50% e temperatura entre 37°C e 42°C. Poderemos estar em condições de menor restringência para uma concentração de formamida entre cerca de 35% e 25% e temperatura entre 30°C e 35°C. Como exemplos de condições de restringência para a hibridação refere-se as que constam da obra de Sambrook, J., 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. Outros exemplos de condições restritivas de hibridação são as que resultam da utilização de NaCl 400 mM, PIPES 40 mM a pH 6,4, EDTA 1 mM, 50°C ou 70°C durante 12-16 horas, seguindo-se uma lavagem, ou a hibridação a 70°C em 1XSSC ou a 50°C em 1XSSC, formamida a 50%, seguindo-se uma lavagem a 70°C em 0,3XSSC, ou a hibridação a 70°C em 4XSSC ou a 50°C em 4XSSC, formamida a 50%, seguindo-se uma lavagem a 67°C em 1XSSC. A temperatura para a hibridação é cerca de 5-10°C inferior à temperatura de fusão ( $T_f$ ) do híbrido, em que o valor de  $T_f$  é determinado para híbridos que possuem entre 19 e 49 pares de bases de comprimento, utilizando a seguinte expressão de cálculo:  $T_f^{\circ}\text{C} = 81,5 + 16,6(\log_{10}[\text{Na}^+]) + 0,41 (\% \text{ G+C}) - (600/\text{N})$  em que o símbolo N indica o número de bases existentes no híbrido e  $[\text{Na}^+]$  indica a concentração dos iões sódio no tampão de hibridação.

O ensaio de hibridação *in vitro* descrito *supra* constitui um processo para prever se há especificidade de ligação entre um siARN elegível e um alvo alvo. No entanto, no contexto do complexo RISC, também pode ocorrer a clivagem específica de um alvo alvo com uma cadeia anti-sentido que não demonstre uma restringência elevada para hibridação *in vitro*.

*ARN interferente de cadeia singular:* conforme se disse antes, os ARN interferentes funcionam, em última análise, como cadeias singulares. Conclui-se que os ARN interferentes de cadeia singular (ss) efectuam a obliteração do mARN, embora menos eficientemente do que o siARN de cadeia dupla. Assim sendo, há formas de realização da presente invenção que prevêm também a administração de um ARN interferente de cadeia singular (ss) que hibride em condições fisiológicas com uma parcela da SEQ ID NO:1 e que possua uma região de complementaridade pelo menos quase perfeita que tenha pelo menos 19 nucleótidos contíguos com a parcela hibridante da SEQ ID NO:1. O ARN interferente ss tem um comprimento entre 19 e 49 nucleótidos, tal como o siARN ds citado *supra*. O ARN interferente ss possui um fosfato em 5' ou é fosforilado *in situ* ou *in vivo* na posição 5'. O termo "fosforilado em 5'" serve para descrever, por exemplo, polinucleótidos ou oligonucleótidos que têm um grupo fosfato acoplado, através de uma ponte éster, ao grupo hidroxilo em C5 do açúcar (v.g., ribose, desoxirribose ou um seu análogo) na extremidade 5' do polinucleótido ou do oligonucleótido.

Os ARN interferentes ss são sintetizados quimicamente ou por transcrição *in vitro* ou expressos endogenamente a partir de vectores ou cassetes de expressão, tal como para os ARN interferentes ds. É possível acrescentar grupos fosfato em 5'

por meio de uma cinase, ou então um grupo fosfato em 5' pode ser o resultado de uma clivagem de um ARN com uma nuclease. A administração faz-se de forma igual à dos ARN interferentes ds. De acordo com uma forma de realização, os ARN interferentes ss que possuem extremidades protegidas e modificações resistentes às nucleases são administrados para obliteração. Os ARN interferentes ss podem ser desidratados e secos para armazenagem ou dissolvidos numa solução aquosa. A solução pode conter tampões ou sais para inibir a recombinação ou para efeitos de estabilização.

*ARN interferente de hélice unciforme:* o ARN interferente de hélice dupla fechada, ou unciforme, é uma molécula simples (v.g., uma cadeia oligonucleotídica simples) que possui ambas as cadeias codificadora e anti-sentido de um ARN interferente numa estrutura de hélice dupla fechada ou unciforme (v.g., um shARN). Por exemplo, os shARN podem ser expressos a partir de vectores de ADN em que os oligonucleótidos de ADN que codificam uma cadeia de ARN interferente, codificadora, estão ligados aos oligonucleótidos de ADN que codificam a cadeia de ARN interferente anti-sentido de complementaridade inversa, por meio de um espaçador curto. Se necessário, para o vector de expressão seleccionado, é possível acrescentar diversos T ao terminal 3' e nucleótidos para formação de locais de restrição. O transcrito de ARN resultante dobra-se sobre si próprio para formar uma estrutura unciforme.

*Modo de administração:* o ARN interferente pode ser administrado, por exemplo, em aerossol ou por administração bocal, dérmica, intradérmica, inalação, intramuscular, intranasal, intraocular, intrapulmonar, intravenosa, intraperitoneal, nasal, ocular, oral, ótica, parentérica, emplastro, subcutânea, sublingual, tópica ou transdermal.

O ARN interferente pode ser administrado directamente ao olho por injeção no tecido ocular, por exemplo, por meio de uma injeção periocular, conjuntival, subtendinal, intracameral, intravitreal, intraocular, subretinal, subconjuntival, retrobulbar ou intracanalicular; por aplicação directa ao olho, utilizando um cateter ou outro dispositivo de aplicação, tal como um granulo retinal, inserção intraocular, supositório ou um implante constituído por um material poroso, não poroso ou gelatinoso; por meio de unguentos ou gotas oculares tópicas; ou por meio de um dispositivo de libertação lenta colocado na cavidade ocular ou implantado em posição adjacente à esclerótica (transclerótico) ou dentro do olho. A injeção transcameral pode ser administrada através da córnea, dentro da câmara anterior, para permitir que o agente alcance a malha trabecular. A injeção intracanalicular pode ser administrada dentro dos canais colectores venosos de drenagem do canal de Schlemm ou dentro do canal de Schlemm.

*Paciente:* um paciente que necessite de tratamento contra a angiogénese ocular ou que esteja em risco de vir a desenvolver angiogénese ocular é um ser humano ou qualquer outro mamífero com angiogénese ocular ou que esteja em risco de vir a ter angiogénese ocular associada à expressão indesejada ou inadequada ou à actividade de IGF-1R, tal como aqui se disse. As estruturas oculares associadas a tais patologias podem ser, por exemplo: olho, retina, coróide, cristalino, córnea, malha trabecular, íris, nervo óptico, cabeça do nervo óptico, esclerótica, segmentos anterior ou posterior ou corpo ciliar. O objecto em estudo também pode ser uma célula ocular, uma cultura de células, um órgão ou um tecido ou órgão *ex vivo*.

*Formulações de dosagem:* as formulações farmacêuticas contêm os ARN interferentes, ou os seus sais, da presente invenção até um valor de 99% em peso, misturados com um veículo fisiologicamente aceitável, tal como a água, um tampão, um soluto salino, glicina, ácido hialurónico, manitol e outros.

Os ARN interferentes da presente invenção são administrados sob a forma de soluções, suspensões ou emulsões. Os exemplos seguintes constituem formulações possíveis, previstas na presente invenção.

	% em peso
ARN interferente	até 99; 0,1-99; 0,1-50; 0,5-10,0
Hidroxipropilmetilcelulose	0,5
Cloreto de sódio	0,8
Cloreto de benzalcónio	0,01
EDTA	0,01
NaOH/HCl	qs pH 7,4
Água purificada (isenta de RNase)	qs 100 mL

	% em peso
ARN interferente	até 99; 0,1-99; 0,1-50; 0,5-10,0
soluto salino tamponado com fosfato	0,1
Cloreto de benzalcónio	0,01
Polissorbato 80	0,5
Água purificada (isenta de RNase)	qs até 100%

	% em peso
ARN interferente	até 99; 0,1-99; 0,1-50; 0,5-10,0
Fosfato de sódio monobásico	0,05

Fosfato de sódio dibásico (anidro)	0,15
Cloreto de sódio	0,75
EDTA dissódico	0,05
'Cremophor EL'	0,1
Cloreto de benzalcónio	0,01
HCl e/ou NaOH	pH 7,3-7,4
Água purificada (isenta de RNase)	qs até 100%

	% em peso
ARN interferente	até 99; 0,1-99; 0,1-50; 0,5-10,0
Soluto salino tamponado com fosfato	1,0
Hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina	4,0
Água purificada (isenta de RNase)	qs até 100%

De um modo geral, uma quantidade eficaz de um dos ARN interferentes de formas de realização da invenção dá origem a uma concentração extracelular à superfície da célula destinatária compreendida entre 100 pM e 1 PM ou entre 1 nM e 100 nM ou entre 5 nM e cerca de 50 nM ou até cerca de 25 nM. A dose necessária para se conseguir esta concentração local irá variar em função de diversos factores, incluindo o processo de administração, o local de administração, o número de camadas celulares entre o local de administração e a célula ou tecido alvo, do facto de a administração ser local ou sistémica, etc.. A concentração no local de administração pode ser consideravelmente maior do que à superfície das células ou tecidos destinatários. As composições tópicas são administradas à superfície do órgão alvo, entre 1 e 4 vezes por dia, ou segundo um programa de administração prolongado, por exemplo, diária, semanal, quinzenal, mensalmente ou durante um período superior, consoante o critério discricionário da rotina determinada

pelo médico assistente. O pH da formulação tem um valor compreendido entre cerca de 4-9 ou entre 4,5 e 7,4.

Antevê-se que o tratamento terapêutico de pacientes com os ARN interferentes, dirigidos contra o mRNA do IGF1R, seja benéfico comparativamente com os tratamentos feitos com moléculas pequenas, devido ao facto de aumentar a duração de acção, determinando assim a necessidade de dosagens menos frequentes e uma maior anuência do paciente.

Uma quantidade eficaz de uma formulação pode depender de factores tais como idade, raça e sexo do paciente, da gravidade da angiogénese ocular, da velocidade de conversão transcrito/proteína do gene alvo, da potência do ARN interferente e da estabilidade do ARN interferente, por exemplo. De acordo com uma forma de realização, o ARN interferente é administrado por via tópica a um órgão alvo e vai atingir um tecido que contenha o mRNA do IGF1R, tal como a retina ou a cabeça do nervo óptico, segundo uma dose terapêutica, melhorando assim o processo patológico associado à angiogénese ocular.

*Veículos aceitáveis:* um veículo aceitável é um veículo que provoca, no máximo, uma irritação ocular entre fraca e nenhuma, permite uma conservação conveniente, se necessária, e administra um ou vários ARN interferentes da presente invenção, segundo uma dosagem homogénea. Como exemplos de veículos aceitáveis para a administração de um ARN interferente, de formas de realização da presente invenção, refere-se os reagentes de transfecção à base de lípidos catiónicos TransIT®-TKO (Mirus Corporation, Madison, WI), LIPOFECTIN®, Lipofectamine, OLIGOFECTAMINE™ (Invitrogen, Carlsbad, CA) ou DHARMAFECT™ (Dharmacon, Lafayette, CO); policatiões, tais como polietilenoimina; péptidos catiónicos, tais como Tat,

poliarginina ou 'Penetratin' (Antp peptide); ou lipossomas. Os lipossomas são obtidos a partir de lípidos convencionais de formação de vesículas e de um esteroi, tal como o colesterol, e podem conter uma molécula de encaminhamento, tal como o anticorpo monoclonal que possua afinidade de ligação com os antigénios da superfície das células endoteliais, por exemplo. Por outro lado, os lipossomas podem ser lipossomas PEGilados

Os ARN interferentes podem ser administrados em solução, em suspensão ou em dispositivos biodegradáveis ou não biodegradáveis. Os ARN interferentes podem ser administrados por si sós ou enquanto componentes de conjugados covalentes definidos. Os ARN interferentes também podem formar complexos com lípidos catiónicos, péptidos catiónicos ou polímeros catiónicos; podem formar complexos com proteínas, proteínas de fusão ou domínios proteínicos com propriedades de ligação aos ácidos nucleicos (v.g., protamina); ou podem ser encapsulados em nanopartículas ou em lipossomas. A administração específica em tecidos ou células pode ser feita mediante a inclusão de um radical endereçador conveniente, tal como um anticorpo ou um fragmento de anticorpo.

Para a administração oftálmica, um ARN interferente pode ser combinado com agentes conservantes aceitáveis sob o ponto de vista oftalmológico, com co-solventes, agentes tensioactivos, intensificadores da viscosidade, intensificadores da penetração, agentes tampão, cloreto de sódio ou água, para formarem uma suspensão ou solução oftálmica aquosa e estéril. As formulações em solução podem ser preparadas dissolvendo o ARN interferente num tampão aquoso isotónico, fisiologicamente aceitável. Além disso, a solução pode conter um agente tensioactivo aceitável, para ajudar a dissolver o inibidor. É possível acrescentar às

composições da presente invenção agentes reguladores da viscosidade, tais como hidroximetil-celulose, hidroxietil-celulose, metil-celulose, polivinilpirrolidona e outros semelhantes, para melhorar a retenção do composto.

Com o intuito de se preparar uma formulação oftálmica estéril sob a forma de um unguento, combina-se o ARN interferente com um agente conservante num veículo conveniente, tal como um óleo mineral, lanolina líquida ou petrolatum transparente. As formulações estéreis de gel oftálmico podem ser obtidas preparando uma suspensão do ARN interferente numa base hidrofílica preparada a partir de uma combinação, por exemplo, de CARBOPOL®-940 (BF Goodrich, Charlotte, NC) ou semelhante, em conformidade com processos conhecidos na especialidade. É possível utilizar VISCOAT® (Alcon Laboratories, Inc., Fort Worth, TX) para injeção intraocular, por exemplo. Outras composições da presente invenção podem conter agentes para aumentar a penetração, tais como cremefor e TWEEN® 80 (monolaureato de polioxietileno-sorbitano, Sigma Aldrich, St. Louis, MO), no caso de o ARN interferente ter fraca capacidade de penetração no olho.

*Estojo:* as formas de realização da presente invenção prevêm um estojo que contém os reagentes para atenuar a expressão de um ARN, tal como aqui se disse, numa célula. O estojo pode conter o vector de expressão de siARN ou de shARN. No caso de os vectores de expressão dos siARN e dos shARN não virais, o estojo também pode conter um reagente de transfecção ou outro veículo de administração conveniente. No caso dos vectores de expressão de shARN viral, o estojo pode conter o vector viral e/ou os componentes necessários para a produção do vector viral

(v.g., uma linha celular de empacotamento e também um vector que compreenda vector viral molde e vectores auxiliares suplementares para o empacotamento). O estojo também pode conter vectores de expressão de siARN ou de shARN de controlo negativo (v.g., um siARN de controlo, sem alvo, ou um siARN que seja dirigido para um mRNA não relacionado). O estojo também pode conter reagentes para avaliar a inactivação do gene alvo pretendido (v.g., iniciadores e sondas para uma PCR quantitativa para detecção do mRNA alvo e/ou anticorpos contra a proteína correspondente para as análises por transferência de Western). Em alternativa, o estojo pode conter uma sequência de siARN ou uma sequência de shARN e as instruções e os materiais necessários para gerar o siARN, mediante transcrição *in vitro*, ou para a construção de um vector de expressão de shARN.

A invenção proporciona também uma combinação farmacêutica numa forma contida num estojo que contém, numa combinação acondicionada, um sistema transportador adaptado para receber um reservatório perfeitamente ajustado com ele e um primeiro receptáculo que contém uma composição de ARN interferente e um veículo aceitável. Tais estojos podem conter também, se desejado, um ou vários veículos aceitáveis, recipientes adicionais, etc. e são evidentes para os especialistas na matéria. Também é possível incluir num estojo instruções impressas, sob a forma de bulas ou rótulos, indicando as quantidades dos componentes que irão ser administrados, indicações gerais para administração e/ou indicações para misturar os componentes.

A aptidão do ARN interferente para inactivar os níveis de expressão endógena do gene destinatário, por exemplo,

numa linhagem de células oculares humanas, avalia-se *in vitro* conforme a seguir se descreve. As células humanas transformadas são aplicadas em placas 24 horas antes da transfecção em meio de crescimento convencional (*v.g.*, DMEM enriquecido com 10% de soro fetal de bovino). Efectua-se a transfecção utilizando Dharmafect 1 (Dharmacon, Lafayette, CO), em conformidade com as instruções do fabricante, para concentrações do ARN interferente variando entre 0,1 nM - 100 nM. Como agentes de controlo utiliza-se siARN de controlo, sem destinatário, e 'lamin A/C siARN' (Dharmacon). Faz-se a avaliação dos níveis de ARN destinatário por qPCR ao fim de 24 horas pós-transfecção, utilizando, por exemplo, iniciadores directos e inversos TAQMAN<sup>®</sup>, e um conjunto de sondas que abrangem o local destinatário (Applied Biosystems, Foster City, CA). É possível avaliar os níveis de proteínas destinatárias decorridas aproximadamente 72 horas após a transfecção (o tempo real depende da velocidade de transformação das proteínas), pelo processo de análise de transferência de Western, por exemplo. As técnicas convencionais para isolar o ARN e/ou as proteínas, a partir de células criadas em cultura, são perfeitamente conhecidas pelos especialistas na matéria. Para se reduzir a probabilidade de ocorrência de efeitos não específicos, desenquadrados dos objectivos, utiliza-se a concentração mais pequena possível de ARN interferente que produza o nível desejado de inactivação na expressão do gene destinatário.

No exemplo 1 subsequente está também exemplificada a aptidão dos ARN interferentes, da presente invenção, para inactivarem os níveis de expressão da proteína IGF-1R.

Assim sendo, evidencia-se aqui a descrição das questões a seguir indicada.

Um processo para atenuar a expressão de mRNA de IGF1R num sistema de expressão, em que o referido processo compreende os passos seguintes: administrar ao referido sistema de expressão uma composição que contenha uma quantidade eficaz de ARN interferente com um comprimento entre 19 e 49 nucleótidos, e um veículo farmacologicamente aceitável, em que o referido ARN interferente compreende: uma cadeia nucleotídica codificadora, uma cadeia nucleotídica anti-sentido e uma região de complementaridade pelo menos quase perfeita que possui pelo menos 19 nucleótidos contíguos; em que a referida cadeia nucleotídica anti-sentido hibrida, em condições fisiológicas, com uma parcela do mRNA correspondente à SEQ ID NO:1 e possui uma região de complementaridade quase perfeita que possui pelo menos 19 nucleótidos contíguos com a referida parcela hibridante do mRNA correspondente à SEQ ID NO:1, sendo conseqüentemente atenuada a referida expressão do mRNA do IGF1R.

A utilização de um medicamento para tratar a angiogênese ocular num paciente que disso necessite, compreendendo o referido processo os passos seguintes: administrar a um olho do referido paciente uma composição que contenha uma quantidade eficaz de ARN interferente, com um comprimento compreendido entre 19 e 49 nucleótidos, e um veículo farmacologicamente aceitável, em que o referido ARN interferente compreende: uma cadeia nucleotídica codificadora, uma cadeia nucleotídica anti-sentido e uma região de complementaridade quase perfeita que possui pelo menos 19 nucleótidos contíguos; em que a referida cadeia nucleotídica

anti-sentido hibrida, em condições fisiológicas, com uma parcela do mARN correspondente à SEQ ID NO:1 e possui uma região de complementaridade quase perfeita que tem pelo menos 19 nucleótidos contíguos com a referida parcela hibridante do mARN correspondente à SEQ ID NO:1, sendo assim tratada a referida angiogénese ocular.

Um processo para atenuar a expressão do mARN do IGF1R do sistema de expressão, em que o referido processo compreende os passos seguintes: administrar ao referido sistema de expressão uma composição que compreende uma quantidade eficaz de um ARN interferente de cadeia singular, que tem um comprimento entre 19 e 49 nucleótidos, e um veículo farmacologicamente aceitável, em que o referido ARN interferente de cadeia singular hibrida, em condições fisiológicas, com uma parcela do mARN correspondente à SEQ ID NO:1 que compreende os nucleótidos 401, 635, 1062, 1548, 1604, 1643, 1766, 1922, 2012, 2069, 2210, 2416, 2423, 2654, 2909, 3339, 3416, 3464, 3476, 3505, 3512, 3781, 3782, 3881, 4064, 4158, 4411, 4487, 4904, 4905, 4909, 3329, 2323 ou 2887, e em que o referido ARN interferente possui uma região de complementaridade pelo menos quase perfeita que tem pelo menos 19 nucleótidos contíguos com a referida parcela hibridante de mARN correspondente à SEQ ID NO:1, sendo assim atenuada a referida expressão do mARN de IGF1R.

Um processo para atenuar a expressão do mARN de IGF1R num sistema de expressão, em que o referido processo compreende os passos seguintes: administrar ao referido sistema de expressão uma composição que compreende uma quantidade eficaz de ARN interferente, que possui um comprimento entre 19 e 49 nucleótidos, e um veículo farmacologicamente aceitável, em que o referido ARN

interferente compreende: uma região que possui pelo menos 13 nucleótidos contíguos com uma complementaridade sequencial pelo menos igual a 80%, ou com uma identidade sequencial pelo menos igual a 80%, com os referidos penúltimos 13, 14, 15, 16, 17 ou 18 nucleótidos da referida extremidade 3' de um mRNA correspondente a uma das sequências selecionadas entre SEQ ID NO:2 e SEQ ID NO:8 - SEQ ID NO:40, sendo assim atenuada a referida expressão do mRNA do IGF1R.

A utilização, para a preparação de um medicamento para tratar a angiogênese ocular um paciente, de uma composição que compreende: uma quantidade eficaz de um ARN interferente, que possui um comprimento entre 19 e 49 nucleótidos, e um veículo farmacologicamente aceitável, em que o referido ARN interferente compreende: uma região que possui pelo menos 13 nucleótidos contíguos que possuem uma complementaridade sequencial pelo menos igual a 90%, ou uma identidade sequencial pelo menos igual a 90%, com os referidos penúltimos 13 nucleótidos da referida extremidade 3' de um mRNA correspondente a uma qualquer das sequências selecionadas entre SEQ ID NO:2 e SEQ ID NO:8 - SEQ ID NO:40, sendo assim tratada a referida angiogênese ocular.

A utilização, para a preparação de um medicamento para o tratamento da angiogênese ocular num paciente, de uma composição que compreende: uma molécula de siARN de cadeia dupla que regula negativamente a expressão de um gene de IGF1R através da interferência com ARN, em que: cada cadeia da referida molécula de siARN possui, independentemente, entre cerca de 19 e cerca de 27 nucleótidos de comprimento; e uma cadeia da referida molécula de siARN possui uma sequência nucleotídica que tem uma complementaridade

substancial com um mRNA correspondente ao referido gene de IGF1R, respectivamente, pelo que a referida molécula de siARN comanda a clivagem do referido mRNA através da interferência com ARN.

Uma composição que compreende um ARN interferente, que tem um comprimento de 19 a 49 nucleótidos, e compreende uma sequência nucleotídica correspondente a uma qualquer das sequências selecionadas entre SEQ ID NO:2 e SEQ ID NO:8 - SEQ ID NO:40, ou um seu complemento, e um veículo farmacologicamente aceitável.

Uma composição que compreende uma molécula de siARN de cadeia dupla que regula negativamente a expressão de um gene de IGF1R através da interferência com ARN, em que: cada cadeia da referida molécula de siARN possui, independentemente, entre cerca de 19 e cerca de 27 nucleótidos de comprimento; e uma cadeia da referida molécula de siARN compreende uma sequência nucleotídica que possui uma complementaridade substancial com um mRNA correspondente ao referido gene de IGF1R, pelo que a referida molécula de siARN comanda a clivagem do referido mRNA através da interferência com ARN.

Finalmente, um processo para atenuar a expressão de mRNA de IGF1R num paciente em que tenha lugar a expressão de mRNA de IGF1R, compreendendo o referido processo os passos seguintes: administrar ao referido paciente uma composição que contenha uma quantidade eficaz de ARN interferente com um comprimento entre 19 e 49 nucleótidos e um veículo farmacologicamente aceitável, compreendendo o referido ARN interferente: uma cadeia nucleotídica codificadora, uma cadeia nucleotídica anti-sentido e uma região de complementaridade quase perfeita que possui pelo

menos 19 nucleótidos contíguos; em que a referida cadeia nucleotídica anti-sentido hibrida em condições fisiológicas com uma parcela do mRNA correspondente à SEQ ID NO:1 e possui uma região de complementaridade quase perfeita que tem pelo menos 19 nucleótidos contíguos com a referida parcela hibridante do mRNA correspondente à SEQ ID NO:1, sendo assim atenuada a referida expressão do mRNA de IGF1R.

### **Exemplo 1**

#### **ARN interferente para obliterar especificamente o IGF1R**

O presente estudo examina a aptidão do ARN interferente que vai interferir com IGF1R para inactivar os níveis de expressão endógena da proteína IGF-1R em células HeLa criadas em cultura.

Efectuou-se a transfecção de células HeLa, utilizando concentrações convencionais *in vitro* (0,1 - 10 nM) de diversos siARN de IGF1R, 'siCONTROL RISC-free siARN #1' ou 'siCONTROL Non-targeting siARN #2' (NTC2) e reagente de transfecção DHARMAFECT® #1 (Dharmacon, Lafayette, CO). Todos os siARN foram dissolvidos em tampão de siARN 1X, uma solução aquosa de KCl 20 mM, HEPES 6 mM (pH 7,5) e MgCl<sub>2</sub> 0,2 mM. As amostras de controlo continham um agente tampão de controlo em que o volume de siARN foi substituído por um volume igual de tampão de siARN 1X (-siARN). Foram efectuadas análises de transferência de Western, utilizando um anticorpo anti -IGF-1R $\beta$ , para se avaliar a expressão da proteína IGF-1R. Este anticorpo reconhece tanto o precursor de IGF-1R de 200 kDa como as proteínas maduras de IGF-1R $\beta$  de 97 kDa. Os siARN de IGF1R são diversos ARN interferentes de

cadeia dupla que têm especificidade para os alvos destinatários seguintes: siIGF1R #6 dirigido à SEQ ID NO:38; siIGF1R #8 dirigido à SEQ ID NO:39; siIGF1R #17 dirigido à SEQ ID NO:13; siIGF1R #18 dirigido à SEQ ID NO:40. Conforme ilustrado pelos dados da figura, os siARN de siIGF1R #8 e siIGF1R #17 reduziram a expressão da proteína IGF-1R significativamente para as concentrações de 10 nM e 1 nM, comparativamente com os siARN de controlo, indicando isso que estes siARN de IGF1R são mais eficazes do que os de siIGF1R #6 e siIGF1R #18. Nenhum dos siARN reduziu significativamente a expressão da proteína IGF-1R para a concentração de 0,1 nM.

Tal como aqui utilizados, e salvo quando especificado de outro modo, os termos "um" e "uma" tem por objecto significar "um", "pelo menos um" ou "um ou vários".

## LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> chatterton, Jon E. Bingaman, David P.

<120> Inibição de IGF1R mediada por ARNi para tratamento da angiogénese ocular

<130> 45263-P017US

<150> 60/754,796

<151> 2005-12-29

<160> 45

<170> PatentIn versão 3.3

<210> 1

<211> 4989

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

ttttttttt ttttgagaaa gggaaattca tcccaaataa aaggaatgaa gtctggctcc   60
ggaggagggt ccccgacctc gctgtggggg ctctgtttc tctccgccgc gctctcgctc   120
tggccgacga gtggagaaat ctgcgggcca ggcatcgaca tccgcaacga ctatcagcag   180
ctgaagcgcc tggagaactg cacggtgatc gagggtacc tccacatcct gctcatctcc   240
aaggccgagg actaccgcag ctaccgcttc cccaagctca cggtcattac cgagtacttg   300
ctgctgttcc gagtggctgg cctcgagagc ctcggagacc tcttcccaa cctcacggtc   360
atccgcggtt ggaaactctt ctacaactac gccctgggta tcttcgagat gaccaatctc   420
aaggatattg ggctttacaa cctgaggaac attactcggg gggccatcag gattgagaaa   480
aatgctgacc tctgttacct ctccactgtg gactgggtccc tgatcctgga tgcggtgtcc   540
aataactaca ttgtggggaa taagcccca aaggaatgtg gggacctgtg tccagggacc   600
atggaggaga agccgatgtg tgagaagacc accatcaaca atgagtacaa ctaccgctgc   660
tggaccacaa accgctgcc aaaaatgtgc ccaagcacgt gtgggaagcg ggcgtgcacc   720
gagaacaatg agtgctgcc ccccgagtgc ctgggcagct gcagcgcgcc tgacaacgac   780
acggcctgtg tagcttgccg ccaactactac tatgccggtg tctgtgtgcc tgctgcccg   840

```



atgtactttg ctttcaatcc caaattatgt gtttccgaaa tttaccgcat ggaggaagtg 1440  
acggggacta aagggcgcca aagcaaaggg gacataaaca ccaggaacaa cggggagaga 1500  
gcctcctgtg aaagtgacgt cctgcatttc acctccacca ccacgtcga gaaatcgcattc 1560  
atcataacct ggcaccggta ccggccccct gactacaggg atctcatcag cttcaccggtt 1620  
tactacaagg aagcaccctt taagaatgtc acagagtatg atgggcagga tgacctgcggc 1680  
tccaacagct ggaacatggt ggacgtggac ctcccgccca acaaggacgt ggagcccggc 1740  
atcttactac atgggtgaa gccctggact cagtacgccg tttacgtcaa ggctgtgacc 1800  
ctcaccatgg tggagaacga ccatatccgt ggggccaaga gtgagatctt gtacattcgc 1860  
accaatgctt cagttccttc cattcccttg gacgttcttt cagcatcga ctcctcttct 1920  
cagttaatcg tgaagtggaa ccctccctct ctgcccaacg gcaacctgag ttactacatt 1980  
gtgctgctggc agcggcagcc tcaggacggc tacctttacc ggcacaatta ctgctccaaa 2040  
gacaaaatcc ccatcaggaa gtatgccgac ggcaccatcg acattgagga ggtcacagag 2100  
aaccccaaga ctgagggtg tgggtggggag aaagggcctt gctgctgctg ccccaaaaact 2160  
gaagccgaga agcaggccga gaaggaggag gctgaatacc gcaaagtctt tgagaatttc 2220  
ctgcacaact ccatcttctg gccagacct gaaaggaagc ggagagatgt catgcaagtg 2280  
gccaacacca ccatgtccag ccgaagcagg aacaccacgg ccgagacac ctacaacatc 2340  
accgacccgg aagagctgga gacagagtac ctttctttg agagcagagt ggataacaag 2400  
gagagaactg tcatttctaa cttcggcct ttcacattgt accgcatcga tatccacagc 2460  
tgcaaccacg aggctgagaa gctgggctgc agcgcctcca acttctctt tgcaaggact 2520  
atgcccgag aaggagcaga tgacattcct gggccagtga cctgggagcc aaggcctgaa 2580  
aactccatct ttttaaagtg gccggaacct gagaatcca atggattgat tctaattgat 2640  
gaaataaaat acggatcaca agttgaggat cagcgagaat gtgtgtccag acaggaatac 2700  
aggaagtatg gaggggcca gctaaaccgg ctaaaccgg ggaactacac agcccggatt 2760  
caggccacat ctctctctgg gaatgggtcg tggacagatc ctgtgttctt ctatgtccag 2820  
gccaacacag gatatgaaaa ctcatccat ctgatcatcg ctctgccgt cgctgtcctg 2880  
ttgatcgtgg gagggttggt gattatgctg tacgtcttcc atagaaagag aaataacagc 2940  
aggctgggga atggagtgt gtatgcctct gtgaaccgg agtacttcag cgctgctgat 3000  
gtgtacgttc ctgatgagtg ggaggtggct cgggagaaga tcaccatgag ccgggaactt 3060  
gggcaggggt cgtttgggat ggtctatgaa ggagttgcca aggggtggt gaaagatgaa 3120  
cctgaaacca gagtggccat taaaacagtg aacgagccg caagcatgcg tgagaggatt 3180  
gagtttctca acgaagcttc tgtgatgaag gaggttcaatt gtcaccatgt ggtgctgattg 3240  
ctgggtgtgg tgtcccaagg ccagccaaca ctggtcatca tggaaactgat gacacggggc 3300  
gatctcaaaa gttatctccg gtctctgagg ccagaaatgg agaataatcc agtcctagca 3360  
cctccaagcc tgagcaagat gattcagatg gccggagaga ttgcagacgg catggcatac 3420

ctcaacgcca ataagttcgt ccacagagac cttgctgccc ggaattgcat ggtagccgaa 3480  
gatttcacag tcaaaatcgg agattttggt atgacgcgag atatctatga gacagactat 3540  
taccggaaag gaggcaaagg gctgctgccc gtgcgctgga tgtctcctga gtcctcaag 3600  
gatggagtct tcaccactta ctcgagcgtc tggtccttcg gggtcgtcct ctgggagatc 3660  
gccacactgg ccgagcagcc ctaccagggc ttgtccaacg agcaagtcct tcgcttcgtc 3720  
atggagggcg gccttctgga caagccagac aactgtcctg acatgctggt tgaactgatg 3780  
cgcatgtgct ggcagtataa cccaagatg aggccttcct tcctggagat catcagcagc 3840  
atcaaagagg agatggagcc tggcttccgg gaggtctcct tctactacag cgaggagaac 3900  
aagctgcccg agccggagga gctggacctg gagccagaga acatggagag cgtccccctg 3960  
gaccctcgg cctcctcgtc ctccctgcc ctgcccgaca gacctcagg acacaaggcc 4020  
gagaacggcc ccggccctgg ggtgctggtc ctccgcgcca gcttcgacga gagacagcct 4080  
tacgcccaca tgaacggggg ccgcaagaac gagcgggctt tgccgctgcc ccagtcttcg 4140  
acctgctgat ccttggatcc tgaatctgtg caaacagtaa cgtgtgcgca cgcgcagcgg 4200  
ggtggggggg gagagagagt ttaacaatc cattcacaag cctcctgtac ctcagtggat 4260  
cttcagttct gcccttgctg cccgcgggag acagcttctc tgcaagtaaa cacatttggg 4320  
atgttccttt tttcaatatg caagcagctt tttattccct gcccaaacc ttaactgaca 4380  
tgggccttta agaaccttaa tgacaacact taatagcaac agagcacttg agaaccagtc 4440  
tcctcactct gtccctgtcc ttccctgttc tccctttctc tctcctctct gcttcataac 4500  
ggaaaaataa ttgccacaag tccagctggg aagccctttt tatcagtttg aggaagtggc 4560  
tgtccctgtg gccccatcca accactgtac acaccgcct gacaccgtgg gtcattacaa 4620  
aaaaacacgt ggagatggaa atttttacct ttatctttca cttttctagg gacatgaaat 4680  
ttacaaaggg ccatcgttca tccaaggctg ttaccatttt aacgctgcct aattttgcca 4740  
aatcctgaa ctttctcct catcgcccg gcgctgattc ctctgttccg gaggcattggg 4800  
tgagcatggc agctggttgc tccatttgag agacacgctg gcgacacact ccgtccatcc 4860  
gactgccct gctgtgctgc tcaaggccac aggcacacag gtctcattgc ttctgactag 4920  
attattattt gggggaactg gacacaatag gtctttctct cagtgaagggt ggggagaagc 4980  
tgaaccggc 4989

<210> 2

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Sequência alvo

<400> 2

tcttcgagat gaccaatct 19

<210> 3

<211> 21

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cadeia codificadora com 3'NN

<220>

<221> misc\_ARN

<222> (1)..(19)

<223> Ribonucleótidos

<220>

<221> misc\_feature

<222> (20)..(21)

<223> qualquer, A, T/U, C, G

<400> 3

ucuucgagau gaccaaucun n 21

<210> 4

<211> 21

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cadeia anti-sentido com 3'NN

<220>

<221> misc\_ARN

<222> (1)..(19)

<223> Ribonucleótidos

<220>

<221> misc\_feature

<222> (20)..(21)

<223> qualquer, A, T/U, C, G

<400> 4

agauugguca ucucgaagan n 21

<210> 5

<211> 21

<212> ARN

<213> Artificial

<220>

<223> Cadeia codificadora

<400> 5

ucuucgagau gaccaaucuu u 21

<210> 6

<211> 21

<212> ARN

<213> Artificial

<220>

<223> Cadeia anti-sentido

<400> 6

agauugguca ucucgaagau u 21

<210> 7

<211> 48

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Hélice dupla em gancho (*hairpin*) com ansa (*loop*)

<220>

<221> misc\_ARN

<222> (1)..(19)

<223> Ribonucleótidos

<220>

<221> misc\_feature

<222> (20)..(27)

<223> qualquer, A, T/U, C, G

<220>

<221> misc\_feature

<222> (28)..(48)

<223> Ribonucleótidos

<400> 7

ucuucgagau gaccaaucun nnnnnnaga uuggucaucu cgaagauu 48

<210> 8

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Sequência alvo

<400> 8

tcaacaatga gtacaacta 19

<210> 9

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Sequência alvo

<400> 9

gaccattgat tctggtact 19

<210> 10

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Sequência alvo

<400> 10

gaagaatcgc atcatcata 19

<210> 11

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Sequência alvo

<400> 11

tcatcagctt caccgttta 19

<210> 12

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Sequência alvo

<400> 12

agaatgtcac agagtatga 19

<210> 13

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Sequência alvo

<400> 13

ggactcagta cgccgttta 19

<210> 14

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Sequência alvo

<400> 14

agttaatcgt gaagtggaa 19

<210> 15

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Sequência alvo

<400> 15

acctttaccg gcacaatta 19

<210> 16

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Sequência alvo

<400> 16

acggcaccat cgacattga 19

<210> 17

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Sequência alvo

<400> 17

ttgagaattt cctgcacaa 19

<210> 18

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Sequência alvo

<400> 18

tctaaccttc ggcctttca 19

<210> 19

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Sequência alvo

<400> 19

ttcggccttt cacattgta 19

<210> 20

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Sequência alvo

<400> 20

gatcacaagt tgaggatca 19

<210> 21

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Sequência alvo

<400> 21

tgtacgtctt ccatagaaa 19

<210> 22

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Sequência alvo

<400> 22

ggagaataat ccagtccta 19

<210> 23

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Sequência alvo

<400> 23

catacctcaa cgccaataa 19

<210> 24

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Sequência alvo

<400> 24

attgcatggg agccgaaga 19

<210> 25

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Sequência alvo

<400> 25

ccgaagattt cacagtcaa 19

<210> 26

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Sequência alvo

<400> 26

tttggatatga cgcgagata 19

<210> 27

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Sequência alvo

<400> 27  
tgacgcgaga tatctatga 19

<210> 28  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
<223> Sequência alvo

<400> 28  
cgcatgtgct ggcagtata 19

<210> 29  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
<223> Sequência alvo

<400> 29  
gcatgtgctg gcagtataa 19

<210> 30  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Artificial

<220>

<223> Sequência alvo

<400> 30

tctactacag cgaggagaa 19

<210> 31

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Sequência alvo

<400> 31

tcgacgagag acagcctta 19

<210> 32

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Sequência alvo

<400> 32

tcctgaatct gtgcaaaca 19

<210> 33

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Sequência alvo

<400> 33

taatagcaac agagcactt 19

<210> 34

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Sequência alvo

<400> 34

ctctgcttca taacggaaa 19

<210> 35

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Sequência alvo

<400> 35

tcattgcttc tgactagat 19

<210> 36

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Sequência alvo

<400> 36

cattgcttct gactagatt 19

<210> 37

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Sequência alvo

<400> 37

gcttctgact agattatta 19

<210> 38

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Sequência alvo

<400> 38

ggccagaaat ggagaataa 19

<210> 39

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Sequência alvo

<400> 39

gcagacacct acaacatca 19

<210> 40

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Sequência alvo

<400> 40

gtgggagggt tggatgatta 19

<210> 41

<211> 19

<212> ARN

<213> Artificial

<220>

<223> Cadeia codificadora

<400> 41

ucuucgagau gaccaaucu 19

<210> 42

<211> 19

<212> ARN

<213> Artificial

<220>

<223> Cadeia anti-sentido

<400> 42

agauugguca ucucgaaga 19

<210> 43

<211> 25

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cadeia codificadora

<400> 43

tcttcgagat gaccaatctc aagga 25

<210> 44

<211> 25

<212> ARN

<213> Artificial

<220>

<223> Cadeia codificadora

<400> 44

ucuucgagau gaccaaucuc aagga 25

<210> 45

<211> 27

<212> ARN

<213> Artificial

<220>

<223> Cadeia anti-sentido

<400> 45

uccuugagau uggucaucuc gaagau 27

**REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO**

A presente listagem de referências citadas pela requerente é apresentada meramente por razões de conveniência para o leitor. Não faz parte da patente de invenção europeia. Embora se tenha tomado todo o cuidado durante a compilação das referências, não é possível excluir a existência de erros ou omissões, pelos quais o IEP não assume nenhuma responsabilidade.

**Patentes de invenção citadas na descrição**

- WO 03100059 A [0003]
- US 20040086860 A [0003]
- US 20050282761 A [0003]
- US 60754796 B [0115]

**Literatura citada na descrição, para além das patentes de invenção**

- **BOHULA et al.** *J.BioLChem.*, 2003, vol. 278, 15991-15997 [0003]
- **SOHAIL et al.** *Nucleic Acid Research*, 2003, e38 [0003]
- **SMITH et al.** *Nature Medicine*, December 1999, 1390-1394 [0003]
- **KIM et al.** *American Journal of Pathology*, December 2004, 2177-2185 [0003]
- **UNSÖLD et al.** *Molecular Vision*, 2004, 468-474 [0003]
- Webster's Dictionary [0030]
- **TUSCHL, T. et al.** *The siRNA User Guide*. 06 May 2004 [0053]

- **BRUMMELKAMP, T.R. et al.** *Science*, 2002, vol. 296, 550 [0056]
- **CASTANOTTO, D. et al.** *RNA*, 2002, vol. 8, 1454 [0056]
- **KIM, D.-H. et al.** *Nature Biotechnology*, February 2005, vol. 23 (2), 222-226 [0057]
- **ALTSCHUL, S.F. et al.** *J. Mol. Biol.*, 1990, vol. 215, 403-410 [0061]
- **SAMBROOK, J.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 [0080]

## **REIVINDICAÇÕES**

1. Composição que se destina a ser utilizada para tratar a angiogénese ocular, a qual compreende: uma quantidade eficaz de ARN interferente, com um comprimento entre 19 e 49 nucleótidos, e um veículo farmacologicamente aceitável, em que o referido ARN interferente compreende:

uma região que tem pelo menos 13 nucleótidos contíguos que possuem uma complementaridade sequencial de pelo menos 90%, ou uma identidade sequencial de pelo menos 90%, com os penúltimos 13 nucleótidos da extremidade 3' de um mRNA correspondente à sequência de ADN de qualquer uma entre SEQ ID NO:2 e SEQ ID NO:8 - SEQ ID NO:40, sendo assim tratada a referida angiogénese ocular.

2. Composição de acordo com a reivindicação 1, que se destina a ser utilizada para tratar a angiogénese ocular, a qual compreende:

uma molécula siARN de cadeia dupla que regula negativamente a expressão de um gene de IGF1R por interferência com ARN, em que:

cada cadeia da referida molécula de siARN possui independentemente entre cerca de 19 e cerca de 27 nucleótidos de comprimento; e em que uma cadeia da referida molécula de siARN compreende uma sequência nucleotídica que possui uma complementaridade substancial com uma sequência nucleotídica correspondente à sequência de ADN de qualquer uma entre SEQ ID NO:2 e SEQ ID NO:8 - SEQ ID NO:40, pelo que a referida molécula de siARN orienta a clivagem do referido mRNA por interferência com ARN.

**3.** Composição de acordo com a reivindicação 1, que se destina a ser utilizada para tratar a angiogénese ocular, a qual compreende um ARN interferente, que possui um comprimento entre 19 e 49 nucleótidos, e compreende uma sequência nucleotídica correspondente à sequência de ADN de qualquer uma entre SEQ ID NO:2 e SEQ ID NO:8 - SEQ ID NO:40, ou um seu complemento, e um veículo farmacologicamente aceitável.

**4.** Composição que se destina a ser utilizada para tratar a angiogénese ocular, de acordo com a reivindicação 3, a qual compreende também um segundo ARN interferente, com um comprimento entre 19 e 49 nucleótidos, e compreende uma região que possui pelo menos 13, 14, 15, 16, 17 ou 18 nucleótidos contíguos que possuem uma complementaridade sequencial de pelo menos 80%, ou uma identidade sequencial de pelo menos 80%, com os penúltimos 13 nucleótidos da extremidade 3' de um segundo mARN correspondente à sequência de ADN de qualquer uma entre SEQ ID NO:2 e SEQ ID NO:8 - SEQ ID NO:40.

**5.** Composição de acordo com a reivindicação 1, que se destina a ser utilizada para tratar a angiogénese ocular, contendo ARN interferente, com um comprimento entre 19 e 49 nucleótidos, que compreende:

uma cadeia nucleotídica codificadora, uma cadeia nucleotídica anti-sentido e uma região de complementaridade quase perfeita que tem pelo menos 19 nucleótidos contíguos;;

em que a referida cadeia nucleotídica anti-sentido possui uma complementaridade de pelo menos 80% com uma porção de mARN correspondente a uma sequência alvo de IGF1R que

compreende os nucleótidos 401, 635, 1062, 1548, 1604, 1643, 1766, 1922, 2012, 2069, 2210, 2416, 2423, 2654, 2909, 3339, 3416, 3464, 3476, 3505, 3512, 3781, 3782, 3881, 4064, 4158, 4411, 4487, 4904, 4905, 4909, 3329, 2323 ou 2887 da SEQ ID NO:1 e possui uma região de complementaridade pelo menos quase perfeita que tem pelo menos 19 nucleótidos contíguos com a referida parcela hibridante do mARN correspondente à SEQ ID NO:1,

para atenuar a expressão do mARN de IGF1R no olho de um paciente que padeça de uma patologia associada à angiogénese ocular.

**6.** Composição de acordo com a reivindicação 5, que pode ser utilizada para tratar a angiogénese ocular, a qual compreende também a utilização de um segundo ARN interferente, com um comprimento entre 19 e 49 nucleótidos, e que possui uma região que tem pelo menos 13, 14, 15, 16, 17 ou 18 nucleótidos contíguos com uma complementaridade sequencial de pelo menos 80%, ou com uma identidade sequencial de pelo menos 80%, com os penúltimos 13 nucleótidos da extremidade 3' de um segundo mARN correspondente à sequência de ADN de qualquer uma entre SEQ ID NO:2 e SEQ ID NO:8 - SEQ ID NO:40.

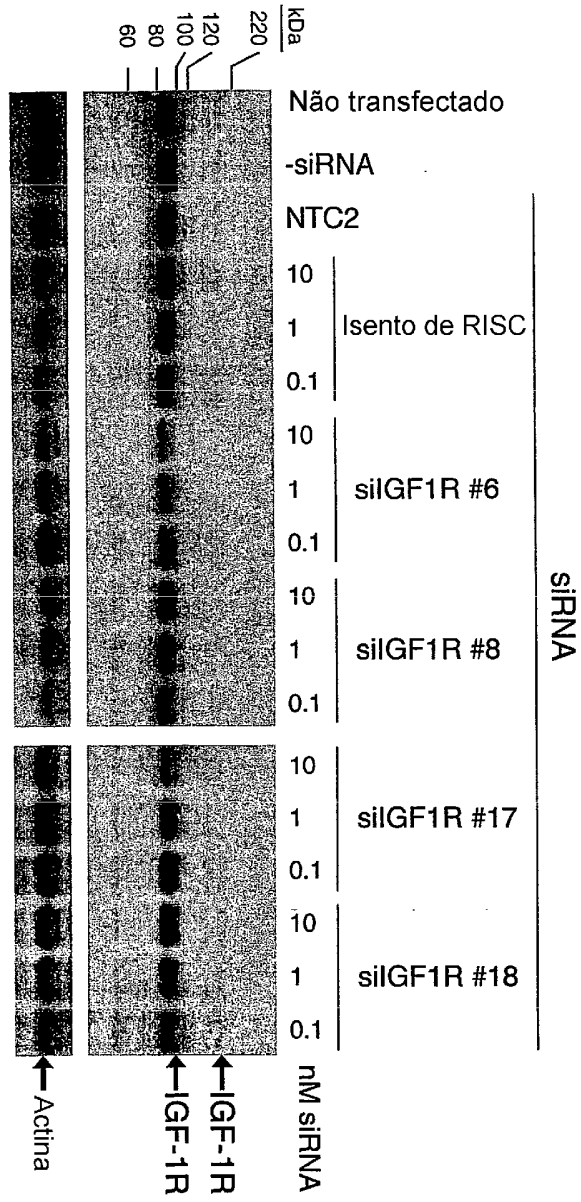


Figura 1