



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

(21) **PI0621264-6 A2**

(22) Data de Depósito: 19/12/2006
(43) Data da Publicação: 06/12/2011
(RPI 2135)



(51) *Int.Cl.:*
C12N 15/11
A61K 31/7084

(54) **Título:** INIBIÇÃO MEDIADA POR RNAi DE RHO QUINASE PARA O TRATAMENTO DE DISTÚRBIOS OCULARES

(30) **Prioridade Unionista:** 27/12/2005 US 60/754,094

(73) **Titular(es):** Alcon Research Ltd

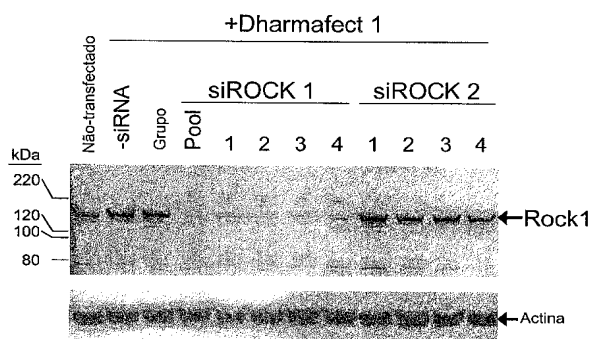
(72) **Inventor(es):** Abbot F. Clark, Jon E. Chatterton

(74) **Procurador(es):** Dannemann, Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) **Pedido Internacional:** PCT US2006062318 de 19/12/2006

(87) **Publicação Internacional:** WO 2007/076367 de 05/07/2007

(57) **Resumo:** INIBIÇÃO MEDIADA POR RNAi DE RHO QUINASE PARA O TRATAMENTO DE DISTÚRBIOS OCULARES. A presente invenção refere-se a interferência de RNA que é proporcionada para inibição de expressão de Rho quinase para o tratamento de pacientes com distúrbios oculares, particularmente para o tratamento de pressão intra-ocular, hipertensão ocular e glaucoma. Alvos de mRNA de Rho quinase incluem mRNA para ROCK1 e ROCK2.





Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"INIBIÇÃO MEDIADA POR RNAi DE RHO QUINASE PARA O TRATAMENTO DE DISTÚRBIOS OCULARES"**.

Campo da Invenção

5 A presente invenção refere-se ao campo de composições de RNA de interferência para inibir a expressão de alvos de mRNA de Rho quinase em distúrbios oculares, particularmente para reduzir a pressão intra-ocular no tratamento de hipertensão ocular e glaucoma.

Antecedentes da Invenção

10 Glaucoma é um grupo heterogêneo de neuropatias ópticas que compartilham certas características clínicas. A perda de visão em glaucoma se deve à morte seletiva das células do gânglio retiniano na retina neutra que é clinicamente diagnosticada por alterações características no campo visual, defeitos na camada de fibras ópticas, e escavação em forma de cálice da cabeça do nervo óptico (CNO). Um dos principais fatores de risco para
15 o desenvolvimento de glaucoma é a presença de hipertensão ocular (HTO), isto é pressão intra-ocular (PIO) elevada. Uma PIO adequada é necessária para manter a conformação do olho e proporcionar um gradiente de pressão que permita o fluxo do humor aquoso para a córnea avascular e para a lente.
20 Níveis de PIO podem também estar envolvidos na patogênese de glaucoma de tensão normal (GTN), conforme evidenciada por pacientes que se beneficiam de medicações que reduzem a PIO. Uma vez que tenham sido feitos ajustes para a espessura corneana central para leituras de PIO em pacientes com GTN, pode também ser constatado que muitos desses pacientes
25 têm hipertensão ocular.

 A PIO elevada associada a glaucoma devido à resistência elevada ao transbordamento do fluxo aquoso na rede trabecular (RT), um pequeno tecido especializado localizado no ângulo corneano da íris da câmara anterior ocular. Mudanças glaucomatosas na RT incluem perda de células
30 da RT e a deposição e acumulação de fragmentos extracelulares que incluem material similar a placas. Além disso, existem também alterações que ocorrem na CNO glaucomatosa. Em olhos glaucomatosos, existem alterações

morfológicas e de mobilidade nas células gliais da CNO. Em resposta à PIO elevada e/ou aos ataques isquêmicos transitórios, existe uma alteração na composição de matriz extracelular da CNO e alterações nas morfologias das células gliais e no axônio das células da glândula retiniana.

Glaucomas primários resultam de distúrbios no fluido intra-ocular que tem uma base anatômica ou fisiológica. Glaucomas secundários ocorrem em consequência de lesão ou trauma no olho ou de uma doença preexistente. Glaucoma de ângulo aberto primário (POAG), também conhecido como glaucoma crônico ou simples, representa a maioria de todos os glaucomas primários. POAG é caracterizado pela degeneração da rede trabecular, resultando em resistência anormalmente alta à drenagem de fluido do olho. Uma consequência de tal resistência é um aumento de PIO que é requerida para direcionar o fluido normalmente produzido pelo olho através da resistência aumentada.

Proteínas quinases contendo espiral espiralada, associadas a Rho, também conhecidas como Rho quinases ou ROCKs, são efetores da família de RHO de pequenas proteínas de ligação de GTP (Rho GTPases). A via de sinalização de Rho GTPase parece desempenhar um papel na regulação do transbordamento de humor aquoso, por exemplo, ao alterar a organização citoesquelética da rede trabecular (RT) e/ou células da musculatura ciliar (CM). Inibidores de moléculas pequenas de Rho quinase causam alterações reversíveis na morfologia celular da RT e da organização citoesquelética, diminuem a contractilidade do tecido da RT isolado, e aumentam a facilidade do transbordamento do humor aquoso em cultura de órgãos ((Waki M. *et al.*, *Curr Eye Res.* 22:470-4 (2001); Honjo M. *et al.*, *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 42:137-44 (2001); Rao PV. *et al.*, *Mol Vis.* 11:288-97 (2005); Rao PV. *et al.*, *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 42:1029-37 (2001)). Efeitos similares são gerados pela expressão de domínios de ligação de Rho negativos, dominantes. Contudo, o tratamento com inibidores de moléculas pequenas de Rho quinase também provoca vasodilatação e hiperemia conjuntival. Além disso, a eficácia de terapias com base em moléculas pequenas tem vida relativamente curta, requerendo dosagem todos os dias e, em alguns casos, a

eficácia diminui com o tempo.

Em vista da importância da hipertensão ocular no glaucoma e os efeitos colaterais dos métodos de tratamento anteriores, seria desejável ter um método aperfeiçoado para tratar hipertensão ocular.

Sumário da Invenção

A presente invenção é direcionada a RNAs de interferência que silenciam a expressão de mRNA de Rho quinase, diminuindo, assim, a pressão intra-ocular em pacientes com hipertensão ocular ou glaucoma ou em risco de desenvolver hipertensão ou glaucoma. Alvos de Rho quinase incluem ROCK1 (também conhecida como ROCKI, ROK β , ou p160ROCK) e ROCK2 (também conhecida como ROCKII ou ROK α). Os RNAs de interferência da invenção são úteis para tratar paciente com hipertensão ocular ou com glaucoma tal como glaucoma de tensão normal e glaucoma de ângulo aberto.

Uma modalidade da presente invenção proporciona um método para atenuar a expressão de um mRNA de Rho quinase em um paciente. O método compreende administrar ao paciente uma composição que compreende uma quantidade eficaz de RNA de interferência que tem um comprimento de 19 a 49 nucleotídeos e um veículo farmacologicamente aceitável. Em uma modalidade, a administração é para o olho do paciente para atenuar a expressão de um alvo de hipertensão ocular em humano.

Em uma modalidade da invenção, o RNA de interferência compreende um filamento de nucleotídeo sentido, um filamento de nucleotídeo anti-sentido e uma região de complementaridade contígua pelo menos quase perfeita de pelo menos 19 nucleotídeos. Ainda, o filamento anti-sentido hibridiza sob condições fisiológicas para uma porção de um mRNA correspondente à SEQ ID NO:1 ou à SEQ ID NO:2, que são seqüências de cDNA que codificam ROCK1 e ROCK2, respectivamente (Nº de Acesso no GenBank: NM_005406, e NM_004850, respectivamente). O filamento anti-sentido tem uma região de complementaridade contígua pelo menos quase perfeita de pelo menos 19 nucleotídeos com a porção de mRNA correspondente à SEQ ID NO:1 ou à SEQ ID NO:2, respectivamente. A administração

de tal composição atenua a expressão de Rho quinase no paciente.

Em uma modalidade da invenção, um RNA de interferência é desenhado para alvejar um mRNA que corresponde à SEQ ID NO:1 compreendendo o nucleotídeo 605, 653, 659, 1248, 1562, 1876, 2266, 2474, 2485, 2740, 2808, 2834, 3007, 3146, 3199, 3245, 3379, 3453, 3511, 3513, 3519, 3781, 3782, 998, 1132, 1200, 1648, 1674, 1708, ou 2077. Em uma modalidade da invenção, um RNA de interferência é desenhado para alvejar um mRNA que corresponde à SEQ ID NO:2 compreendendo o nucleotídeo 1102, 1865, 2000, 2229, 2514, 2584, 2738, 3305, 4111, 4652, 5184, 5187, 5255, 5315, 5439, 5450, 5578, 5579, 5611, 5625, 5795, 6000, 6228, 6264, 584, 1337, 1678, 2773, 2814, 2941, 3357, 3398, 3481, 3633, 3644, 3645, 3767, 3836, 4023, 4097, 5202, ou 5440.

A presente invenção proporciona ainda, para administração de um segundo RNA de interferência a um paciente além de um primeiro RNA de interferência. O método compreende administrar a um paciente um segundo RNA de interferência tendo um comprimento de 19 a 49 nucleotídeos e compreendendo um filamento de nucleotídeo sentido, um filamento de nucleotídeo anti-sentido, e uma região de complementaridade pelo menos quase perfeita de pelo menos 19 nucleotídeos; em que o filamento anti-sentido do segundo RNA de interferência hibridiza sob condições fisiológicas para uma segunda porção de mRNA correspondente à SEQ ID NO:1 ou à SEQ ID NO:2 e o filamento anti-sentido tem uma região de complementaridade pelo menos quase perfeita de pelo menos 19 nucleotídeos com a segunda porção de hibridização de mRNA correspondente à SEQ ID NO:1 ou à SEQ ID NO:2, respectivamente. O segundo RNA de interferência pode alvejar o mesmo mRNA como o primeiro RNA de interferência ou pode alvejar um mRNA diferente. Ainda, um terceiro, quarto, ou quinto, etc. RNA de interferência pode ser administrado de um modo similar.

Uma outra modalidade da invenção é um método para atenuar a expressão de Rho quinase em um paciente, compreendendo administrar ao paciente uma composição que compreende uma quantidade eficaz de RNA de interferência de filamento simples que tem um comprimento de 19 a 49

nucleotídeos e um veículo farmacêuticamente aceitável.

Para atenuar a expressão de ROCK1, o RNA de interferência de filamento simples hibridiza sob condições fisiológicas para uma porção de mRNA que corresponde à SEQ ID NO:1 que compreende o nucleotídeo 605, 653, 659, 1248, 1562, 1876, 2266, 2474, 2485, 2740, 2808, 2834, 3007, 3146, 3199, 3245, 3379, 3453, 3511, 3513, 3519, 3781, 3782, 998, 1132, 1200, 1648, 1674, 1708, ou 2077, e o RNA de interferência tem uma região de complementaridade pelo menos quase perfeita de pelo menos 19 nucleotídeos com a porção de hibridização de mRNA correspondente à SEQ ID NO:1. A expressão de ROCK1 é assim atenuada.

Para atenuar a expressão de ROCK2, o RNA de interferência de filamento simples hibridiza sob condições fisiológicas para uma porção de mRNA que corresponde à SEQ ID NO:2 que compreende o nucleotídeo 1102, 1865, 2000, 2229, 2514, 2584, 2738, 3305, 4111, 4652, 5184, 5187, 5255, 5315, 5439, 5450, 5578, 5579, 5611, 5625, 5795, 6000, 6228, 6264, 584, 1337, 1678, 2773, 2814, 2941, 3357, 3398, 3481, 3633, e o RNA de interferência tem uma região de complementaridade contígua pelo menos quase perfeita de pelos menos 19 nucleotídeos com a porção de hibridização de mRNA correspondente à SEQ ID NO:2. A expressão de ROCK2 é assim atenuada.

Uma outra modalidade da invenção refere-se a um método para tratar hipertensão ocular ou glaucoma. O método compreende administrar ao olho uma composição que compreende uma quantidade eficaz de RNA de interferência tendo um comprimento de 19 a 49 nucleotídeos e um veículo farmacêuticamente aceitável, e o RNA de interferência compreendendo um filamento de nucleotídeo sentido, um filamento de nucleotídeo anti-sentido, e uma região de complementaridade contígua pelo menos quase perfeita de pelo menos 19 nucleotídeos. O filamento anti-sentido hibridiza sob condições fisiológicas para uma porção de mRNA correspondente à SEQ ID NO:1 ou à SEQ ID NO:2 e tem uma região de complementaridade contígua pelo menos quase perfeita de pelo menos 19 nucleotídeos com a porção de hibridização de mRNA correspondente à SEQ ID NO:1 ou à SEQ ID NO:2, res-

pectivamente. A hipertensão ocular ou glaucoma é assim tratado.

Uma outra modalidade da invenção refere-se a um método para tratar hipertensão ocular ou glaucoma em um paciente que necessite deste, em que o método compreende administrar a um olho do paciente uma composição que compreende uma quantidade eficaz de RNA de interferência tendo um comprimento de 19 a 49 nucleotídeos e um veículo farmacologicamente aceitável deste, em que o RNA de interferência compreende uma região de pelo menos 13 nucleotídeos contíguos tendo pelo menos 90% de complementaridade de sequência para, ou pelo menos 90% de identidade de sequência com, o 13 penúltimos nucleotídeos da extremidade 3' de um mRNA correspondente a qualquer uma de SEQ ID NO:3 e SEQ ID NO:9 – SEQ ID NO:79, em que a hipertensão ocular ou glaucoma é assim tratado.

Uma outra modalidade da invenção refere-se a um método para atenuar a expressão de um mRNA de alvo de Rho quinase em um paciente, compreendendo administrar ao paciente uma composição que compreende uma quantidade eficaz de RNA de interferência que tem um comprimento de 19 a 49 nucleotídeos e um veículo farmacologicamente aceitável deste, onde o RNA de interferência compreende uma região de pelo menos 13 nucleotídeos contíguos tendo pelo menos 90% de complementaridade de sequência para, ou pelo menos 90% de identidade com, os 13 penúltimos nucleotídeos da extremidade 3' de um mRNA correspondente a qualquer uma de SEQ ID NO:3 e SEQ ID NO:9 – SEQ ID NO:79, como a seguir.

Quando o mRNA-alvo de Rho quinase é mRNA de ROCK1, o RNA de interferência compreende uma região de pelo menos 13 nucleotídeos contíguos tendo pelo menos 90% de complementaridade de sequência para, ou pelo menos 90% de identidade de sequência com, os 13 penúltimos nucleotídeos da extremidade 3' de um mRNA correspondente à SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:73, SEQ

ID NO:74, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:78, ou SEQ ID NO:79.

Quando o mRNA-alvo de Rho quinase é mRNA de ROCK2, o RNA de interferência compreende uma região de pelo menos 13 nucleotídeos contíguos tendo pelo menos 90% de complementaridade de sequência para, ou pelo menos 90% de identidade de sequência com, os 13 penúltimos nucleotídeos da extremidade 3' de um mRNA correspondente a SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:71, ou SEQ ID NO:72.

Em uma outra modalidade da presente invenção, a região de nucleotídeos contíguos é uma região de pelo menos 14 nucleotídeos contíguos tendo pelo menos 85% de complementaridade de sequência para, ou pelo menos 85% de identidade de sequência com, os 14 penúltimos nucleotídeos da extremidade 3' de um mRNA correspondente à sequência do identificador de sequência. Em ainda uma outra modalidade da invenção, a região de nucleotídeos contíguos é uma região de pelo menos 15, 16, 17 ou 18 nucleotídeos contíguos tendo pelo menos 80% de complementaridade de sequência para, ou pelo menos 80% de identidade de sequência com, os penúltimos 15, 16, 17, ou 18 nucleotídeos, respectivamente, da extremidade 3' de um mRNA correspondente à sequência-alvo identificada pelo identificador de sequência.

Uma outra modalidade da invenção refere-se a um método para tratar hipertensão ocular em um paciente que necessite deste, em que o método compreende administrar ao paciente uma composição que compreende uma molécula de siRNA de filamento duplo que infra-regula a expressão de

um gene de ROCK1 ou de ROCK2 via interferência de RNA, em que cada filamento da molécula de siRNA é, independentemente, cerca de 19 a cerca de 27 nucleotídeos de comprimento; e um filamento da molécula de siRNA compreende uma sequência de nucleotídeos tendo complementaridade substancial para um mRNA correspondente ao gene de ROCK1 ou de ROCK2, respectivamente, de modo que a molécula de siRNA direciona a clivagem do mRNA via interferência de RNA.

Uma composição que compreende RNA de interferência que tem um comprimento de 19 a 49 nucleotídeos e que tem uma sequência de nucleotídeos de qualquer uma de SEQ IND NO:3, e SEQ ID NO:9 – SEQ ID NO:79, ou um complemento destas, e um veículo farmaceuticamente aceitável é uma modalidade da presente invenção. Em uma modalidade, o RNA de interferência pode ser isolado. O termo "isolado" significa que o RNA de interferência está livre de seu meio natural total.

Uma outra modalidade da invenção é uma composição que compreende uma molécula de siRNA de filamento duplo que infra-regula a expressão de um gene de ROCK1 ou ROCK2 via interferência de RNA, em que cada filamento da molécula de siRNA é independentemente de cerca de 19 a cerca de 27 nucleotídeos de comprimento; e um filamento da molécula de siRNA compreende uma sequência de nucleotídeos que tem substancial complementaridade para um mRNA correspondente ao gene de ROCK1 ou de ROCK2, respectivamente, de modo que a molécula de siRNA direciona a clivagem do mRNA via interferência de RNA.

A presente invenção proporciona uma vantagem sobre inibidores de moléculas pequenas de Rho quinase já que o efeito colateral indesejável de terapias correntes de moléculas pequenas, por exemplo, hiperemia, é dissociado do efeito desejável de reduzir a pressão intra-ocular.

O uso de qualquer uma das modalidades conforme descritas aqui na preparação de um medicamento para atenuar a expressão de mRNA de ROCK1 ou de ROCK2 é também uma modalidade da presente invenção.

Breve Descrição dos Desenhos

A figura 1 proporciona um Western blot de ROCK1 de células

GTM-3 transfectadas com siRNAs de ROCK1 #1, #2, #3, e #4; siRNAs de ROCK2 #1, #2, #3, e #4; um grupo de siRNA de ROCK1; um siRNA de controle não-alvejante; e um controle de tampão (-siRNA). Os siRNAs estavam em uma concentração de 100nM. As setas indicam as posições das bandas de proteína ROCK1 de 160 kDa e da actina de 42 kDa.

A figura 2 proporciona um Western blot de ROCK1 de células GTM-3 transfectadas com siRNAs de ROCK1 #1, #2, #3, e #4, e um siRNA de controle não-alvejante, cada em 10nM, 1nM, e 0,1nM, e um controle de tampão (-siRNA). As setas indicam as posições das bandas de proteína ROCK1 de 160 kDa e da proteína actina de 42 kDa.

A figura 3 proporciona um Western blot de ROCK2 de células GTM-3 transfectadas com siRNAs de ROCK2 #1, #2, #3, e #4, um grupo de ROCK1, e um siRNA de controle não alvejante, cada um em 100nM, e um controle de tampão (-siRNA). As setas indicam as posições das bandas de proteína ROCK1 de 160 kDa e da proteína actina de 42 kDa.

A figura 4 proporciona Western blot de ROCK2 de células GTM-3 transfectadas com siRNAs de ROCK2 #1, #2, #3, e #4, e um siRNA de controle não-alvejante, cada um em 10nM, 1nM, e 0,1nM, e um controle de tampão (-siRNA). As setas indicam as posições das bandas de proteína ROCK1 de 160 kDa e da proteína actina de 42 kDa.

Descrição Detalhada da Invenção

Interferência de RNA (RNAi) é um processo pelo qual RNA de filamento (dsRNA) é para silenciar expressão de gene. Embora não se deseje estar ligado a qualquer teoria, RNAi começa com a clivagem de dsRNAs mais longos para pequenos RNAs de interferência (siRNAs) por enzima similar à RNaseIII, dicer. siRNAs são dsRNAs que são usualmente de cerca de 19 a 28 nucleotídeos, ou 20 a 25 nucleotídeos, ou 21 a 22 nucleotídeos de comprimento e freqüentemente contêm pendentes de 2 nucleotídeos em 3', e fosfato em 5' e hidroxila em 3'. Um filamento do siRNA é incorporada a um complexo de ribonucleoproteína conhecido como o complexo silenciador induzido por RNA (RISC). RISC usa esse filamento de siRNA para identificar moléculas de mRNA que são pelo menos parcialmente complementares do

filamento de siRNA incorporada, e então cliva esses MRNAs-alvo ou inibe a sua tradução. Portanto, o filamento de siRNA que é incorporado no RISC é conhecida como filamento guia ou filamento anti-sentido. O outro filamento de siRNA, conhecido como filamento passageiro, é eliminada do siRNA e é pelo menos parcialmente homóloga ao mRNA-alvo. Aqueles versados na técnica reconhecerão que, em princípio, qualquer filamento de um siRNA pode ser incorporado ao RISC e funciona como um filamento guia. Contudo, o desenho de siRNA (por exemplo, estabilidade de dúplex de siRNA reduzida na extremidade 5' do filamento anti-sentido) pode favorecer a incorporação do filamento anti-sentido ao RISC.

Clivagem de mRNAs mediada por RISC tendo uma sequência pelo menos parcialmente complementar ao filamento guia leva a um decréscimo no nível de estado constante daquele mRNA e da proteína correspondente codificada por este mRNA. Alternativamente, RISC pode também reduzir a expressão da proteína correspondente via repressão traducional sem clivagem do mRNA-alvo. Outras moléculas de RNA e moléculas similares a RNA podem também interagir com RISC e silenciar o gene de expressão. Exemplos de outras moléculas de RNA que podem interagir com RISC incluem RNAs curtos de grampo de cabelo (shRNAs), siRNAs de filamento simples, microRNAs (miRNAs), cópias de 27 pares de substrato de dicer. O termo "siRNA", como usado aqui, refere-se a um RNA de interferência de filamento duplo, a menos que indicado de outro modo. Exemplos de moléculas similares a RNA que podem interagir com RISC incluem moléculas de RNA contendo um ou mais nucleotídeos quimicamente modificados, um ou mais desoxirribonucleotídeos, e/ou uma ou mais ligações não-fosfodiéster. Para fins da presente discussão, todos os RNA ou moléculas similares a RNA que podem interagir com RISC e participar das alterações mediadas por RISC na expressão gênica serão referidas como "RNAs de interferência". siRNAs, shRNAs, miRNAs, e cópias de 27 pares de substrato de dicer são, portanto, subconjuntos dos RNAs de interferência."

RNA de interferência das modalidades da invenção parece agir de um modo catalítico para clivagem de mRNA-alvo, isto é, RNA de interfe-

rência é capaz de efetuar a inibição do mRNA-alvo em quantidades subestequiométricas. Em comparação com terapias anti-sentido, é requerido significativamente menos RNA de interferência para proporcionar um efeito terapêutico sob tais condições de clivagem.

A presente invenção refere-se ao uso de RNA de interferência para inibir a expressão de mRNA de Rho quinase (ROCK), diminuindo assim a pressão intra-ocular em pacientes com glaucoma. Existem duas isoformas de Rho quinase (também conhecidas como ROCKI, ROK β ou p160ROCK) e ROCK2 (também conhecidas como ROCKII ou ROK α). De acordo com a presente invenção, RNAs de interferência conforme estabelecidos aqui providos por expressão exógena ou endógena são particularmente eficazes em silenciar mRNA de ROCK.

Inibidores de pequenas moléculas de ROCK causam alterações irreversíveis na morfologia de células da rede trabecular e organização citoesquelética, diminuem a contractilidade de tecido da musculatura ciliar isolado, e aumentam a facilidade de transbordamento de humor aquoso e cultura de órgão. Efeitos similares são gerados por expressão de domínios de ligação de Rho negativos, dominantes. O tratamento com inibidores de moléculas pequenas de ROCK reduz a PIO, contudo, tal tratamento parece que também provoca hiperemia. Os inibidores de moléculas pequenas de ROCK examinados até hoje inibem quinases múltiplas além de ROCK1 e ROCK2. Espera-se que o uso de RNAs de interferência da presente invenção tendo especificidade para mRNA de ROCK1 ou ROCK2 dissocie o efeito de redução da PIO desejável do tratamento do efeito de hiperemia indesejável do tratamento.

Seqüências de ácidos nucléicos são aqui escritas em um direção de 5' para 3', a menos que indicado de outra forma. O termo "ácido nucléico", como usado aqui, refere-se ou ao DNA ou RNA ou a uma forma modificada destes compreendendo as bases purina ou pirimidina em DNA (adenina "A", citosina "C", guanina "G", timina "T") ou em RNA (adenina "A", citosina "C", guanina "G", uracil "U"). RNAs de interferência proporcionados aqui podem compreender bases "T", particularmente nas extremidades 3', embo-

ra as bases "T" na ocorram naturalmente em RNA. "Ácido nucléico" inclui os termos "oligonucleotídeo" e "polinucleotídeo" e pode ser referir a uma molécula de filamento simples ou uma molécula de filamento duplo. Uma molécula de filamento duplo é formado pelo pareamento de bases de Watson-Crick entre as bases A e T, as bases C e G, e entre as bases A e U. Os filamentos de uma molécula de filamento duplo podem ter complementaridade parcial, substancial ou inteira uma com relação à outra, e formarão um híbrido dúplex, cuja resistência de ligação é dependente da natureza e grau de complementaridade da seqüência de bases.

Uma seqüência de mRNA é prontamente deduzida da seqüência da seqüência de DNA correspondente. Por exemplo, a SEQ ID NO:1 proporciona a seqüência de filamento sentido de DNA correspondente ao mRNA para ROCK1. A seqüência de mRNA é idêntica à seqüência de filamento sentido de DNA com as bases "T" substituídas com bases "U". Portanto, a seqüência de mRNA de ROCK1 é conhecida da SEQ ID NO:1 e a seqüência de mRNA de ROCK2 é conhecida da SEQ ID NO:2.

mRNA de Rho quinase (ROCK1 e ROCK2): proteína quinases contendo espiral espiralada, associadas a Rho, também conhecidas como Rho quinases ou ROCKs, são efetores da família de Rho de pequenas proteínas de ligação de GTP (Rho GTPases). A via de sinalização de Rho GTPase parece desempenhar um papel na regulação do transbordamento de humor aquoso, por exemplo, ao alterar a organização citoesquelética da rede trabecular (RT) e/ou células da musculatura ciliar (CM).

ROCKs são serina/treonina proteína quinases que são ativadas por Rho ligado a GTP. A ativação de ROCK leva à fosforilação de vários substratos envolvidos na montagem do filamento de actina e contractilidade da célula incluindo, por exemplo, a cadeia leve de miosina, cadeia leve de miosina fosfatase, LIM quinase, adducina, ERM. Assim, ROCKs regulam uma grande variedade de processos celulares que incluem a formação de tração-fibra, contração, adesão, migração, fagocitose, apoptose, e citocinese. As duas isoformas de ROCK são ROCK1 (também conhecida como ROCKI, ROK β , ou p160ROCK) e ROCK2 (também conhecida como ROCKII

ou ROK α). As duas isoformas são altamente similares, particularmente em seus domínios de quinase (92% de identidade no nível de aminoácidos), contudo, elas exibem diferenças na distribuição de tecido e localização intracelular sugerindo que elas podem ter funções não redundantes, distintas. Ambas as ROCK1 e ROCK2 são expressas no segmento anterior do olho humano.

A base de dados GenBank do National Center for Biotechnology Information em ncbi.nlm.nih.gov proporciona a seqüência de DNA para ROCK1 com o N° de Acesso NM_005406, proporcionado na "Listagem de Seqüências" como SEQ ID NO:1. SEQ ID NO:1 proporciona a seqüência de filamento sentido de DNA que corresponde ao mRNA que codifica ROCK1 (com exceção das bases "T" para as bases "U"). A seqüência de codificação para ROCK1 é a partir de nucleotídeos 1-4065.

Equivalentes da seqüência de mRNA de ROCK1 citada acima são formas *splice* alternativas, formas alélicas, isozimas, ou um cognato destas. Um cognato é um mRNA de ROCK1 proveniente de uma outra espécie de mamífero que é homóloga à SEQ ID NO:1 (um ortólogo).

A base de dados GenBank proporciona a seqüência de DNA para ROCK2 como N° de Acesso NM_004850, proporcionada na "Listagem de Seqüências" como SEQ ID NO:2. A SEQ ID NO:2 proporciona a seqüência de filamento sentido de DNA que correspondente ao mRNA que codifica ROCK2 (com exceção das bases "T" para as bases "U"). A seqüência de codificação para ROCK2 é dos nucleotídeos 450-4616.

Os equivalentes da seqüência de mRNA de ROCK2 citado acima são formas *splice* alternativas, formas alélicas, isozimas, ou um cognato destas. Um cognato é um mRNA de ROCK2 de uma outra espécie de mamífero que é homólogo à SEQ ID NO:2 (um ortólogo)

Atenuar a expressão de um mRNA: A frase, "atenuar a expressão de um mRNA", como usada aqui, significa administrar uma quantidade de RNA de interferência (por exemplo, um siRNA) para reduzir a tradução de MRNA-alvo em proteína, tanto através da clivagem de mRNA como através da inibição direta de tradução. A redução da expressão do MRNA-alvo ou da

proteína correspondente é comumente referida como "knock-down" e é reportada com relação aos níveis presentes seguintes à administração ou à expressão de um RNA de controle não alvejante (por exemplo, um siRNA de controle não alvejante). "Knock-down" de expressão de uma quantidade que inclui entre 50% e 100% é contemplado pelas modalidades aqui. Contudo, não é necessário que tais níveis de "knock-down" sejam obtidos para fins da invenção. Em uma modalidade, um RNA de interferência simples que alveja um dos alvos de Rho quinase é administrado para reduzir a PIO. Em outras modalidades, dois ou mais RNAs de interferência que alvejam o mesmo alvo de Rho quinase (por exemplo, ROCK1) são administrados para diminuir a PIO. Em outras modalidades, dois ou mais RNAs de interferência que alvejam os alvos Rho quinase (por exemplo, ROCK1 e ROCK2) são administrados para reduzir a PIO.

"Knock-down" é comumente avaliado pela medição dos níveis de mRNA usando a reação a ampliação da reação em cadeia de polimerase quantitativa (qPCR) ou por medição dos níveis de proteína por Western blot ou por ensaio de imunoabsorvente ligado a enzima (ELISA). A análise do nível de proteína proporciona uma avaliação tanto da clivagem de mRNA bem como da inibição de tradução. Outras técnicas para medir "knock-down" incluem hibridização de solução de RNA, proteção de nuclease, hibridização northern, monitoramento de expressão gênica com um microarranjo, ligação de anticorpo, radioimunoensaio, e análise de células ativadas por fluorescência.

Inibição de ROCK1 ou ROCK2 pode ser também determinada *in vitro* por avaliação de níveis de mRNA-alvo ou níveis de proteína alvo em, por exemplo, células TM humanas seguinte à transfecção de RNA de interferência de ROCK1 ou ROCK2 conforme descrição abaixo.

A inibição de alvos citados aqui é também inferida em um ser humano ou mamífero por observação do desenvolvimento de sintoma de glaucoma tal como desenvolvimento de pressão intra-ocular, desenvolvimento da perda de campo visual, ou desenvolvimento de alterações na cabeça do nervo óptico, por exemplo.

RNA de interferência: Em uma modalidade da invenção, RNA de interferência (por exemplo, siRNA) tem um filamento sentido e um filamento anti-sentido, e os filamentos sentido e anti-sentido compreendem uma região de complementaridade contígua pelo menos quase perfeita e pelo menos 19 nucleotídeos. Em uma outra modalidade da invenção, o RNA de interferência (por exemplo, siRNA) tem um filamento sentido e um filamento anti-sentido, e o filamento anti-sentido compreende uma região de complementaridade contígua pelo menos quase perfeita de pelo menos 19 nucleotídeos para uma seqüência-alvo de mRNA de ROCK1 ou ROCK2, e o filamento sentido compreende uma região de identidade contígua pelo menos quase perfeita de pelo menos 19 nucleotídeos com uma seqüências-alvo de mRNA de ROCK1 ou de ROCK2. Em uma outra modalidade da invenção, o RNA de interferência compreende pelo menos 13, 14, 15, 16, 17, ou 18 nucleotídeos contíguos tendo percentagens de complementaridade de seqüência para ou, tendo percentagens de identidade de seqüência com, os 13, 14, 15, 16, 17 ou 18 nucleotídeos, respectivamente, da extremidade 3' da seqüência-alvo correspondente dentro de um mRNA.

O comprimento de cada filamento do RNA de interferência compreende de 19 a 49 nucleotídeos, e pode compreender 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 nucleotídeos.

O filamento anti-sentido de um siRNA é o agente guia ativo do siRNA em que o filamento anti-sentido é incorporado ao RISC, permitindo assim que o RISC identifique os MRNAs-alvo com complementaridade pelo menos parcial para o filamento de siRNA anti-sentido para clivagem ou repressão traducional.

Em modalidades da presente invenção, as seqüências-alvo de RNA de interferência (por exemplo, seqüências-alvo de siRNA) dentro de uma seqüência de MRNA-alvo são selecionadas usando as ferramentas de desenhos disponíveis. RNAs de interferência correspondentes a uma seqüência-alvo de ROCK1 ou ROCK2 são então testadas por transfecção de células que expressam o MRNA-alvo seguido por avaliação de "knock-down"

conforme descrição acima.

Técnicas para selecionar seqüências-alvo para siRNAs são proporcionadas por Tuschl, T. et al., "The siRNA User Guide", revisado em 6 de maio de 2004, disponível no site da Rockefeller University; pelo Technical Bulletin #506, "siRNA Design Guide Lines", Ambion Inc. no site da Ambion; e por outras ferramentas de desenho com base na rede, por exemplo, na Invitrogen, Dharmacon, Integrated DNA Technologies, Genscript, ou sítios da Proligo. Os parâmetros de buscas iniciais incluem os teores de G/C entre 35% e 55% e comprimentos de siRNA entre 19 e 27 nucleotídeos. A seqüência-alvo pode estar localizada na região de codificação ou nas regiões não traduzidas 5' ou 3' do mRNA.

Uma modalidade de uma seqüência-alvo de DNA de 19 nucleotídeos para mRNA de ROCK1 está presente nos nucleotídeos 605 a 623 da SEQ ID NO:1:

5'-ATAACATGCTGCTGGATAA-3' SEQ ID NO:3.

Um siRNA da invenção para alvejar uma seqüência de mRNA correspondente da SEQ ID NO:3 e tendo filamentos de 21 nucleotídeos e um pendente em 3' de 2 nucleotídeos:

5'-AUAACAUGCUGCUGGAUAANN-3' SEQ ID NO:4

3'-NNUAUUGUACGACGACCUAUU-5' SEQ ID NO:5.

Cada resíduo "N" pode ser qualquer nucleotídeo (A, C, G, U, T) ou nucleotídeo modificado. A extremidade 3' pode ter um número de resíduos "N" entre e incluindo 1, 2, 3, 4, 5, e 6. Os resíduos "N" em qualquer dos filamentos podem ser o mesmo resíduo (por exemplo, UU, AA, CC, GG, ou TT) ou eles podem ser diferentes (por exemplo, AC, AG, AU, CA, CG, CU, GA, GC, GU, UA, UC, ou UG). Os pendentes em 3' podem ser iguais ou eles podem ser diferentes. Em uma modalidade, ambos os filamentos têm um pendente UU em 3'.

Um siRNA da invenção para alvejar uma seqüência de mRNA correspondente de SEQ ID NO:3 e tendo filamentos de 21 nucleotídeos e um pendente UU em 3' em cada filamento é:

5'-AUAACAUGCUGCUGGAUAAUU-3' SEQ ID NO:6

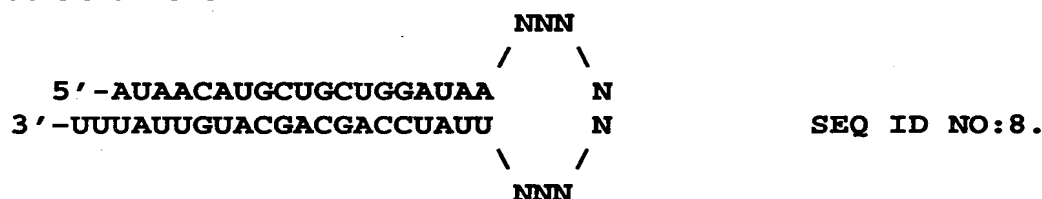
3' -UUUAUUGUACGACGACCUAUU-5' SEQ ID NO:7.

O RNA de interferência pode ter também um pendente 5' de nucleotídeos ou pode ter extremidades cegas. Um siRNA da invenção para alvejar uma seqüência de mRNA correspondente de SEQ ID NO:3 e tendo filamentos de 19 nucleotídeos e extremidades cegas é:

5'- AUAACAUGCUGCUGGAUAA -3' SEQ ID NO:80

3'- UAUUGUACGACGACCUAUU -5' SEQ ID NO:81.

Os filamentos de um RNA de interferência de filamento duplo (por exemplo, um siRNA) pode ser conectado para formar uma estrutura de grampo de cabelo ou em alça-haste (por exemplo, um shRNA). Um shRNA da invenção que alveja uma seqüência de mRNA correspondente da SEQ ID NO:2 e tendo uma região em haste de filamento duplo de 19 bp e um pendente de UU em 3' é:



N é um nucleotídeo A, T, C, G, U, ou uma forma modificada conhecida por aquele versado na técnica. O número de nucleotídeos N na alça é um número entre e incluindo 3 a 23, ou 5 a 15, ou 7 a 13, ou 4 a 9, ou 9 a 11, ou o número de nucleotídeos N é 9. Alguns dos nucleotídeos na alça podem estar envolvidos em interações de pares de base com outros nucleotídeos na alça. Exemplo de seqüências de oligonucleotídes que podem ser usados para formar a alça incluem 5'-UUCAAGAGA-3' (Brummelkamp, T.R. *et al.* (2002) *Science* 296: 550) and 5'-UUUGUGUAG-3' (Castanotto, D. *et al.* (2002) *RNA* 8:1454). Será reconhecido por aquele versado na técnica que o oligonucleotídeo de cadeia simples resultante forma uma estrutura de alça-haste ou de grampo de cabelo que compreende uma região de filamento duplo capaz de interagir com o maquinário de RNAi.

A seqüência-alvo de siRNA identificada acima pode ser estendida na extremidade 3' para facilitar o desenho de cópias de 27 mers de substrato de dicer. A extensão da seqüência-alvo de DNA de 19 nucleotí-

deos (SEQ ID NO:3) identificada na sequência de DNA de ROCK1 (SEQ ID NO:1) por 6 nucleotídeos rende uma sequência-alvo de DNA de 25 nucleotídeos presentes nos nucleotídeos 605 a 629 da SEQ ID NO:1:

5'- ATAACATGCTGCTGGATAAATCTGG -3' SEQ ID NO:82.

Um dúplex de 27 mers de substrato de dicer da invenção para alvejar uma sequência de mRNA de SEQ ID NO:10 é:

5'- AUAACAUGCUGCUGGAUAAAUCUGG -3' SEQ ID NO:83

3'- UUUAUUGUACGACGACCUAUUUAGACC -5' SEQ ID NO:84.

Os dois nucleotídeos na extremidade 3' do filamento sentido (isto é, os nucleotídeos GG da SEQ ID NO:83) podem ser desoxinucleotídeos para processamento aperfeiçoado. O desenho dos duplões de 27 mers do substrato de dicer, tal como proporcionado aqui, é ainda discutido no site da Integrated DNA Technologies (IDT) e por Kim, D.-H. et al., (fevereiro de 2005) *Nature Biotechnology* 23:2; 222-226.

Quando RNAs de interferência são produzidos por síntese química, fosforilação na posição 5' do nucleotídeo na extremidade 5' de um ou ambos os filamentos (quando presentes) pode aumentar a eficácia do siRNA e a especificidade do complexo de RISC ligado, mas não é requerida já que a fosforilação pode ocorrer intracelularmente.

A Tabela 1 lista os exemplos de sequências-alvo de ROCK1 e ROCK2 da SEQ ID NO:1 e SEQ ID NO:2, respectivamente, das quais os siRNAs da presente invenção são desenhados de um modo conforme estabelecido acima. ROCK1 e ROCK2 codificam as duas isoformas de Rho quinase, conforme notado acima.

Tabela 1. Sequências-alvo de ROCK1 e ROCK2 para siRNAs

Sequências-alvo de ROCK1 T	Nº do Nucleotídeo de partida com referência à SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:
ATAACATGCTGCTGGATAA	605	3
GTAATTGTATGAAGATGAA	653	9
GTATGAAGATGAATAAGGA	659	10
TAGCTCCAATGCAGATAAA	1248	11

Tabela 1. -continuação-

Seqüências-alvo de ROCK1 T	Nº do Nucleotídeo de partida com referência à SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:
ATCAGTTGGAAGACTTAAA	1562	12
GACCTTCAAGCTCGAATTA	1876	13
GAACATTTGACTGGAAATA	2266	14
TAGCTCAGCTTACGAAACA	2474	15
ACGAAACAGTATAGAGGAA	2485	16
TTTGAATTGACGCAAGAAA	2740	17
CACTGTTAGTCGGCTTGAA	2808	18
ACAGCATGCTAACC AAAGA	2834	19
GTAAACAAATTGGCAGAAA	3007	20
ACCAGATGGTAGTGAAACA	3146	21
GTAGAAGAATGTGCACATA	3199	22
GCAAAGAGAGTGATATTGA	3245	23
GTACCAAATAGAGGAAATA	3379	24
GTTCTATAATGACGAACAA	3453	25
GATAAACTGTTTCACGTTA	3511	26
TAAACTGTTTCACGTTAGA	3513	27
GTTTCACGTTAGACCTGTA	3519	28
TGTCGAAGATGCCATGTTA	3781	29
GTCGAAGATGCCATGTTA	3782	30
AACGACATCTCTTCTTCAA	998	73
GAAGAAACATTCCCTATTC	1132	74
TAGCAATCGTAGATACTTA	1200	75
GCCAATGACTTACTTAGGA	1648	76
GGACACAGCTGTAAGATTG	1674	77
GAGATGAGCAAGTCAATTA	1708	78
GTAACCAAAGCTCGTTTAA	2077	79

Seqüências-alvo de ROCK2	Nº de Nucleotídeo de partida com referência à SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:
ACAACATGCTCTTGGATAA	1102	31
TGTTAATACTCGCCTAGAA	1865	32
GAAAGCTGATCATGAAGCA	2000	33
CAGCTGGAATCTAACAATA	2229	34
GATATGACATACCAACTAA	2514	35
AGGCACGACTAGCAGATAA	2584	36
ATTAGACTGTGACCTCAAA	2738	37
GATGATGGCTAGACACAAA	3305	38
CTAAAGAAATTCCAAGGAT	4111	39
TCGTATTCTTCCAGTGAAA	4652	40
TTGCAACTATGCACTTGTA	5184	41
CAACTATGCACTTGTATAA	5187	42
GTTGCATGTTTCATGTTTAA	5255	43
TTCCTAATGCTTCATGATA	5315	44
CTAGCTTTGTGGAAGATAA	5439	45
GAAGATAAATCGTGCACTA	5450	46
CCTTGATGTCTGTCTATTA	5578	47
CTTGATGTCTGTCTATTAT	5579	48
TTTACAGACCTCAGTATTA	5611	49
TATTAGTCTGTGACTACAA	5625	50
TAAATATGATCCTCAGACA	5795	51
CAGCAATGGTAAGCGTAAA	6000	52
CTCCGTCTCTACCAATATA	6228	53
TGATGGTGGTGGCCTGTAA	6264	54
CTTGCTGGATGGCTTAAAT	584	55
GGATTCACCTTGTAGGAACA	1337	56
TCATCGGATTTACCTACTA	1678	57

Seqüências-alvo de ROCK2	No de Nucleotídeo de partida com referência à SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:
TAAATGAGCTCCTTAAACA	2773	58
GTTAGAAACCTGACATTAA	2814	59
ATAACCATCTCATGGAAAT	2941	60
TCTCTTGAGGAACTAATA	3357	61
CAATCTTGCAAATGAGAAA	3398	62
TAAGCGCAGCAGCTATTAA	3481	63
GAGAATAGAAAGCTACATA	3633	64
GCTACATATGGAGCTTAAA	3644	65
CTACATATGGAGCTTAAAT	3645	66
GATGACATTGGACAGTAAA	3767	67
TCTGGATAGTTCCAGTATA	3836	68
GAACAATCCAATCCTTACA	4023	69
GTATAGAGCAGATGCTAAA	4097	70
ATAAAGCCATAATGTTGGA	5202	71
TAGCTTTGTGGAAGATAAA	5440	72

Conforme citado nos exemplos acima, aquele versado na técnica é capaz de usar a informação da seqüência-alvo fornecida na Tabela 1 para desenhar RNAs de interferência tendo um comprimento mais curto ou mais longo que as seqüências fornecidas na tabela e por referência à posição da seqüência em SEQ IDN NO:1 ou SEQ ID NO:2 e adição ou deleção de nucleotídeos complementares ou quase complementares à SEQ ID NO:1 ou SEQ ID NO:2, respectivamente.

A reação de clivagem de RNA-alvo guiada por siRNAs e outras formas de RNA de interferência é altamente específica para seqüência. Em geral, siRNA contendo um filamento de nucleotídeo de sentido idêntico na seqüência a uma porção do mRNA-alvo e um filamento de nucleotídeo anti-sentido exatamente complementar a uma porção do mRNA-alvo são modalidades de siRNA para inibição dos mRNAs citados aqui. Contudo, 100% de

complementaridade de seqüência entre o filamento de siRNA anti-sentido e o mRNA-alvo, ou entre o filamento de siRNA anti-sentido e o filamento de siRNA sentido, não é requerido para a prática da invenção. Assim, por exemplo, a invenção permite que variações de seqüências sejam esperadas devido à mutação genética, polimorfismo de cepa, ou divergência evolucionária.

Em uma modalidade da invenção, o filamento anti-sentido do siRNA tem complementaridade contígua pelo menos quase perfeita de pelo menos 19 nucleotídeos com o mRNA-alvo. "Quase perfeita", como usado aqui, significa que o filamento anti-sentido do siRNA é "substancialmente idêntica a" pelo menos uma porção do mRNA-alvo. "Identidade", como conhecida daquele versado na técnica, é o grau de relacionamento entre seqüências de nucleotídeos conforme determinado por correspondência da ordem e identidade dos nucleotídeos entre as seqüências. Em uma modalidade, o filamento anti-sentido de siRNA tendo 80% e entre 80% até 100% de complementaridade, por exemplo, 85%, 90% ou 95% de complementaridade, à seqüência de mRNA-alvo é considerada de complementaridade quase perfeita e pode ser usada na presente invenção. Complementaridade contígua "perfeita" é o pareamento de base de Watson-Crick padrão de pares de base adjacentes. Complementaridade contígua "pelo menos quase perfeita" inclui complementaridade "perfeita" como usada aqui. Métodos computacionais para determinar a identidade ou complementaridade são desenhados para identificar o maior grau de correspondência de seqüências de nucleotídeos, por exemplo, BLASTN (Altschul, S.F., *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410).

O termo "identidade em percentagem" descreve a percentagem de nucleotídeos contíguos em uma primeira molécula de ácido nucléico que é a mesma que em um grupo de nucleotídeos contíguos do mesmo comprimento em uma segunda molécula de ácido nucléico. O termo "complementaridade em percentagem" descreve a percentagem de nucleotídeos contíguos em uma primeira molécula de ácido nucléico que pode ser um par de bases no sentido de Watson-Crick com um grupo de nucleotídeos contíguos em uma segunda molécula de ácido nucléico.

A relação entre um mRNA-alvo (filamento sentido) e um filamento de um siRNA (o filamento sentido) é aquela da identidade. O filamento sentido de um siRNA é também chamada de filamento passageiro, se presente. A reação entre um mRNA-alvo (filamento sentido) e o outro filamento de um siRNA (o filamento anti-sentido) é aquela de complementaridade. O filamento anti-sentido de um siRNA é também chamada de um filamento guia.

A penúltima base em uma seqüência de ácidos nucleicos que é escrita em uma direção de 5' a 3' é a seguinte para a última base, isto é, a seguinte base para a base 3'. As 13 penúltimas bases de uma seqüência de ácidos nucleicos em uma direção de 5' para 3 são pelo menos as 13 últimas bases próximas à base 3' e não incluindo a base 3'. Similarmente, as 14, 15, 16, 17, ou 18 penúltimas bases de uma seqüência de ácidos nucleicos em direção de 5' a 3' são as últimas 14, 15, 16, 17, ou 18 bases de uma seqüência, respectivamente, próximas à base 3' e não incluindo a base 3'.

A frase "uma região de pelo menos 13 nucleotídeos contíguos tendo pelo menos 90% de complementaridade de seqüência para, ou pelo menos 90% de identidade de seqüência com, os 13 penúltimos nucleotídeos da extremidade 3' de um mRNA correspondente a qualquer uma de (um identificador de seqüência)" permite uma substituição de nucleotídeo. Duas substituições de nucleotídeos (isto é, $11/13 = 85\%$ de identidade/complementaridade) não estão incluídas em tal frase.

Em uma modalidade da invenção, a região de nucleotídeos contíguos é uma região de pelo menos 14 nucleotídeos contíguos tendo pelo menos 85% de complementaridade de seqüência para, ou pelo menos 85% de identidade de seqüência com, os 14 penúltimos nucleotídeos da extremidade 3' de um mRNA correspondente à seqüência identificada por cada identificador de seqüência. Duas substituições de nucleotídeo (isto é $12/14 = 86\%$ de identidade/complementaridade) estão incluídas em tal frase.

Em uma outra modalidade da invenção, a região de nucleotídeos contíguos é uma região de pelo menos 15, 16, 17, ou 18 nucleotídeos contíguos tendo pelo menos 80% de complementaridade de seqüência para, ou pelo menos 80% de identidade de seqüência com, os 14 penúltimos da ex-

tremidade 3' de um mRNA correspondente à sequência do identificador de sequência. Três substituições de nucleotídeo são incluídas em tal frase.

A sequência-alvo nos mRNAs correspondentes à SEQ ID NO:1 ou à SEQ ID NO:2 pode estar nas regiões não traduzidas 5' ou 3' do mRNA, bem como na região de codificação do mRNA.

Um ou ambos os filamentos do RNA de interferência de filamento duplo podem ter um pendente em 3' de 1 a 6 nucleotídeos, que podem ser ribonucleotídeos ou desoxirribonucleotídeos ou uma mistura destes. Os nucleotídeos do pendente não são pares de base. Em uma modalidade da invenção, o RNA de interferência compreende um pendente em 3' de TT ou UU. Em uma outra modalidade da invenção, o RNA de interferência compreende pelo menos uma extremidade cega. As terminações têm usualmente um grupo fosfato em 5' ou um grupo hidroxila em 3'. Em outras modalidades, o filamento anti-sentido tem um grupo fosfato em 5', e o filamento sentido tem um grupo hidroxila em 5'. Em ainda outras modalidades, os terminais são ainda modificados por adição covalente de outras moléculas ou grupos funcionais.

Os filamentos sentido e anti-sentido do siRNA de filamento duplo podem estar em uma formação de dúplex de dois filamentos simples conforme descrição acima ou podem estar em uma molécula simples onde as regiões de complementaridade são pares de base e são covalentemente ligadas por uma alça de grampo de cabelo de modo a formarem um filamento simples. Acredita-se que o grampo de cabelo seja clivado intracelularmente por uma proteína denominada dicer para formar um RNA de interferência de duas moléculas de RNA de pares de base.

RNAs de interferência podem diferir de RNA que ocorre na natureza pela adição, deleção, substituição ou modificação de um ou mais nucleotídeos. Matéria não-nucleotídeo pode ser ligado ao RNA de interferência, tanto na extremidade 5' como na extremidade 3', ou internamente. Tais modificações são comumente desenhadas para aumentar a resistência à nuclease dos RNAs de interferência, para aperfeiçoar a absorção celular, para intensificar o alveamento celular, para auxiliar a traçar o RNA de interferên-

cia, para ainda aumentar a estabilidade, ou para reduzir o potencial para ativação da via de interferon. Por exemplo, RNAs de interferência podem compreender o nucleotídeo purina nas extremidades dos pendentos. A conjugação de colesterol à extremidade 3' do filamento sentido de uma molécula de siRNA por meio de um ligante de pirrolidina, por exemplo, proporciona também estabilidade para um siRNA. Outras modificações incluem uma molécula de biotina na terminação 3', um peptídeo conhecido como tendo propriedades penetrantes de célula, uma nanopartícula, um peptidomimético, um corante fluorescente, ou um dendrímero, por exemplo.

Nucleotídeos podem ser modificados sobre sua porção de base, sobre sua porção de açúcar, ou sobre a porção de fosfato da molécula e da função nas modalidades da presente invenção. As modificações incluem, por exemplo, substituições com grupos alquila, alcóxi, amina, desaza, halo, hidroxila, tiol, ou combinações destes. Nucleotídeos podem ser substituídos com análogos com maior estabilidade tais como substituir um ribonucleotídeo com um desoxirribonucleotídeo, ou tendo modificações no açúcar tais com grupos 2' OH substituídos por grupos 2' amino, grupos 2' O-metila, grupos 2' metoxietila, ou uma ponte 2'-O, 4'-C metileno, por exemplo. Exemplos de um análogo de purina ou de pirimidina de nucleotídeos incluem uma xantina, uma hipoxantina, uma azapurina, uma metiltioadenina, 7-desaza-adenosina e nucleotídeos modificados em O ou em N. O grupo fosfato do nucleotídeo pode ser modificado por substituição de um ou mais dos oxigênios do grupo fosfato com nitrogênio ou com enxofre (fosforotioatos). As modificações são úteis, por exemplo, para intensificar a função, para aumentar a estabilidade ou a permeabilidade, ou para direcionar a localização ou alvejamento.

Pode existir uma região ou regiões do filamento de RNA de interferência anti-sentido que é(são) não complementar(es) a uma porção da SEQ ID NO:1 ou da SEQ ID NO:2. As regiões de não-complementaridade podem estar em 3', 5' ou em ambas as extremidades de uma região complementar ou entre duas regiões complementares.

RNAs de interferência podem ser gerados de modo exógeno por

síntese química, por transcrição *in vitro*, ou por clivagem de RNA de filamento duplo mais longo com dicer ou com uma outra nuclease apropriada com atividade similar. RNAs de interferência quimicamente sintetizados, produzidos de fosforamiditas de ribonucleosídeos protegidos usando um sintetizador de DNA/RNA convencional, podem ser obtidos de fornecedores comerciais, tais como Ambion Inc. (Austin, TX), Invitrogen (Carlsbad, CA), ou Dharmacon (Lafayette, CO). RNAs de interferência são purificados por extração com um solvente ou resina, precipitação, eletroforese, cromatografia ou uma combinação destes, por exemplo. Alternativamente, RNA de interferência pode ser usado com pouco, se alguma purificação, para evitar perdas devidas ao processamento de amostra.

RNAs de interferência podem ser também expressos de modo endógeno a partir de vetores de expressão de plasmídeo ou virais ou de cassetes de expressão mínima, por exemplo, fragmentos gerados por PCR compreendendo um ou mais promotores de um modelo ou modelos apropriados para o RNA de interferência. Exemplos de vetores de expressão com base em plasmídeo para shRNA, comercialmente disponíveis, incluem membros da série pSilencer (Ambion, Austin, TX) e pCPG-siRNA (InvivoGen, San Diego, CA). Vetores virais para expressão de RNA de interferência podem ser derivados de uma variedade de vírus, incluindo adenovírus, vírus adeno-associado, lentivírus (por exemplo, HIV, FIV, e EIAV), e herpesvírus. Exemplos de vetores virais para expressão de shRNA, comercialmente disponíveis, incluem adeno pSilencer (Ambion, Austin, TX) e pLenti6/BLOCK-i[®]-DEST (Invitrogen, Carlsbad, CA). Seleção de vetores virais, métodos para expressar o RNA de interferência do vetor e métodos para distribuir o vetor viral estão dentro do conhecimento ordinário da técnica. Exemplos de kits para produção de cassetes de expressão de shRNA gerados por PCR incluem Silencer Express (Ambion, Austin, TX) e siXpress (Mirus, Madison, WI). Um primeiro RNA de interferência pode ser administrado via expressão *in vivo* de um primeiro vetor de expressão capaz de expressar o primeiro RNA de interferência, e um segundo RNA de interferência pode ser administrado via expressão *in vivo* de um segundo vetor de expressão capaz de expressar

o segundo RNA de interferência, ou ambos RNAs de interferência podem ser administrados via expressão *in vivo* de um vetor de expressão simples capaz de expressar ambos os RNAs de interferência.

RNAs de interferência podem ser expressos a partir de uma variedade de promotores eucarióticos conhecidos daqueles versado na técnica, incluindo promotores pol III, tais como os promotores U6 ou H1, ou promotores pol II, tal como o promotor citomegalovírus. Aqueles versados na técnica reconhecerão que esses promotores podem ser também adaptados para permitir a expressão induzível do RNA de interferência.

Hibridização sob Condições Fisiológicas: Em certas modalidades da presente invenção, um filamento anti-sentido de um RNA de interferência hibridiza com um mRNA *in vivo* como parte do complexo RISC.

"Hibridização" refere-se a um processo, no qual ácidos nucleicos de filamento simples com seqüências de bases complementares ou quase complementares interagem para formar complexos ligados a hidrogênio chamados híbridos. As reações de hibridização são sensíveis e seletivas. *In vitro*, a especificidade de hibridização (isto é estringência) é controlada pelas concentrações de sal ou formamida na pré-hibridização e soluções de hibridização, por exemplo, e pela temperatura de hibridização; tais procedimentos são bem-conhecidos da técnica. Em particular, estringência é aumentada pela redução da concentração de sal, aumento da concentração de formamida, ou elevação da temperatura de hibridização.

Por exemplo, condições de alta estringência poderiam ocorrer em cerca de 50% de formamida, a 37°C a 42°C. Condições de estringência reduzida poderiam ocorrer em cerca de 35% a 25% de formamida, a 30°C a 35°C. Exemplos de condições de estringência para hibridização são mostrados por Sambrook, J., 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring, N.Y. Outros exemplos de condições de hibridização estringentes incluem NaCl 400mM, PIPES 40mM pH 6,4, EDTA 1mM, 50°C ou 70°C, por 12 a 16 horas, seguido por lavagem, ou hibridização a 70°C, a 70°C, em 1XSSC ou a 50°C em 1XSSC, formamida a 50% seguido por lavagem a 70°C em 0,3XSSC, ou hibridização a 70°C em

4XSSC ou a 50°C em 4XSSC, formamida a 50% seguido por lavagem a 67°C em 1XSSC. A temperatura para hibridização é de cerca de 5-10°C menor que a temperatura de fusão (T_m) do híbrido, em que T_m é determinada para híbridos entre 19 e 49 pares de base de comprimento usando o cálculo a seguir: $T_m \text{ } ^\circ\text{C} = 81,5 + 16,6 (\log_{10}[\text{Na}^+]) + 0,41 (\% \text{ de G+G}) - (600/N)$, onde N é o número de bases no híbrido, e $[\text{Na}^+]$ é a concentração de íons sódio no tampão de hibridização.

O ensaio de hibridização *in vitro* descrito acima proporciona um método para prever se uma ligação entre um siRNA candidato e um alvo terá especificidade. Contudo, no contexto do complexo RISC, clivagem específica de um alvo pode ocorrer também com um filamento anti-sentido que não demonstra alta estrigência para hibridização *in vitro*.

RNA de interferência de filamento simples: Como citado acima, RNAs de interferência funcionam, por fim, como filamentos simples. Verificou-se que RNA de interferência de filamento simples (ss) efetua silenciamento de mRNA, embora não menos eficazmente que siRNA de filamento duplo. Portanto, as modalidades da presente invenção também proporcionam a administração de um RNA de interferência ss que hibridiza sob condições fisiológicas para uma porção de SEQ ID NO:1 ou de SEQ ID NO:2 e tem uma região de complementaridade contígua pelo menos quase perfeita de pelo menos 19 nucleotídeos com a porção de hibridização de SEQ ID NO:1 ou de SEQ ID NO:2, respectivamente. O RNA de interferência ss tem um comprimento de 19 a 49 nucleotídeos tal como para o siRNA ds citado acima. O RNA de interferência ss tem um 5' fosfato ou é fosforilado *in situ* ou *in vivo* na posição 5'. O termo "5' fosforilado" é usado para descrever, por exemplo, polinucleotídeos ou oligonucleotídeos tendo um grupo fosfato ligado via ligação éster à hidroxila C5 do açúcar (por exemplo, ribose, desoxirribose, ou um análogo destes) na extremidade 5' do polinucleotídeo ou do oligonucleotídeo.

RNAs de interferência ss são sintetizados quimicamente ou por transcrição *in vitro* ou expressos de modo endógeno de vetores ou de casetes de expressão no que diz respeito aos RNAs de interferência ds. Grupos

5' fosfato podem ser adicionados via uma quinase, ou um 5' fosfato pode ser o resultado da clivagem de nuclease de um RNA. Distribuição é quanto aos RNAs de interferência ds. Em uma modalidade, RNAs de interferência ss tendo extremidades protegidas e modificações resistentes à nuclease são administrados para silenciar. RNAs de interferência ss podem ser secados para armazenagem ou dissolvidos em uma solução aquosa. A solução pode conter tampões ou sais para inibir anelamento ou para estabilização.

RNA de interferência de grampo de cabelo: um RNA de interferência de grampo de cabelo é uma molécula simples (por exemplo, uma cadeia de oligonucleotídeo simples) que compreende tanto os filamentos sentido como anti-sentido de uma RNA de interferência em uma estrutura de alça-haste ou de grampo de cabelo (por exemplo, um shRNA). Por exemplo, shRNAs podem ser expressos a partir de vetores de DNA em que os oligonucleotídeos de DNA que codificam um filamento de RNA de interferência sentido são ligados aos oligonucleotídeos de DNA que codificam o filamento de RNA de interferência anti-sendo, complementar, reversa, por um espaçador curto. Se necessário para o vetor de expressão escolhido, os T da terminação 3' e os nucleotídeos que formam sítios de restrição podem ser adicionados. O transcrito de RNA resultante se dobra de volta para si mesmo para formar uma estrutura de alça-haste.

Modo de administração: RNA de interferência pode ser distribuído, por exemplo, por administração via aerossol, bucal, dérmica, intradérmica, inalação, intramuscular, intranasal, intra-ocular, intrapulmonar, intravenosa, intraperitoneal, nasal, ocular, oral, ótica, parenteral, emplastro, subcutânea, sublingual, tópica, ou transdérmica.

RNA de interferência pode ser distribuído diretamente ao olho por injeção de tecido ocular tal como injeções perioculares, conjuntivais, subtenônicas, intracamerais, intravítreas, intra-oculares, sub-retinianas, subconjuntivais, retrobulbares, ou intracanaliculares, por aplicação direta ao olho usando um cateter ou outro dispositivo de colocação tal como um pélete retiniano, inserção intra-ocular, supositório, ou um implante que compreende um material poroso, não poroso, ou gelatinoso; por gotas oculares tópicas ou

ungüentos; ou por dispositivo de liberação lenta na cavidade ocular ou implantado adjacente à esclera (transescleral) ou dentro do olho. Injeção intracameral pode ser através da córnea para a câmara anterior para permitir que o agente atinja a rede trabecular. Injeção intracanalicular pode ser nos canais coletores venosos drenando o canal de Schlemm ou para o canal de Schlemm.

Paciente: Um paciente que necessite de tratamento para hipertensão ocular ou em risco de desenvolver hipertensão ocular é um ser humano ou outro mamífero tendo hipertensão ocular ou em risco de ter hipertensão ocular associada à expressão ou atividade indesejada ou inapropriada de alvos como citados aqui, isto é ROCK1 ou ROCK2. Outras estruturas oculares associadas a tais distúrbios podem incluir, por exemplo, o olho, retina, coróide, lentes, córnea, rede trabecular, íris, nervo óptico, cabeça do nervo óptico, esclera, segmentos anteriores ou posteriores, ou corpo ciliar. Um paciente pode também ser uma célula ocular, cultura de célula, órgão ou um órgão ou tecido *ex vivo*.

Formulações e Dosagem: Formulações farmacêuticas compreendem RNAs de interferência, ou sais destes, da invenção até 99% em peso misturados com um meio de veículo fisiologicamente aceitável tais como água, tampão, solução salina, glicina, ácido hialurônico, manitol e similares.

RNAs de interferência da presente invenção são administrados como soluções, suspensões, ou emulsões. Os seguintes são exemplos de possíveis formulações englobadas por esta invenção.

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

	Quantidade em % em peso
RNA de Interferência	até 99; 0,1-99; 0,1 – 50; 0,5 – 10,0
Solução salina tamponada com fosfato	1,0
Cloreto de benzalcônio	0,01
Polissorbato 80	0,5
Água purificada (isenta de RNase)	q.s. para 100%

	Quantidade em % em peso
RNA de Interferência	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 benzalcônio	0,01
HCl e/ou NaOH	pH 7,3-7,4
Água purificada (isenta de RNase)	q.s. para 100%

	Quantidade em % em peso
RNA de Interferência	até 99; 0,1-99; 0,1 – 50; 0,5 – 10,0
Solução salina tamponada com fosfato	1,0
Hidroxipropil- β -ciclodextrina	4,0
Água purificada (isenta de RNase)	q.s. para 100%

Em geral, uma quantidade eficaz dos RNAs de interferência de modalidades da invenção resulta em uma concentração extracelular na superfície da célula-alvo de 100pM a 1 μ M, ou de 1nM a 100nM, ou de 5nM a cerca de 50nM, ou a cerca de 25nM. A dose requerida para obtenção dessa concentração local variará dependendo de vários fatores incluindo o método de distribuição, o sítio de distribuição, o número de camadas de células entre o sítio de distribuição e a célula ou tecido-alvo, se a distribuição é local ou sistêmica, etc. A concentração no sítio de distribuição pode ser considera-

velmente maior que na superfície da célula ou tecido-alvo. As composições tópicas são distribuídas à superfície do órgão-alvo uma ou quatro vezes ao dia, ou em um programa de distribuição prolongada tal como diária, semanal, bi-semanalmente, mensalmente, ou mais longos, de acordo com o critério rotineiro de um clínico experiente. O pH da formulação é de cerca de pH 4-9, ou pH 4,5 a pH 7,4.

É esperado que o tratamento terapêutico de pacientes com RNAs de interferência direcionado contra mRNA de ROCK1 ou de ROCK2 seja benéfico para tratamentos com moléculas pequenas por aumento da duração de ação, possibilitando assim dosagem menos freqüente e complacência maior pelos pacientes.

Uma quantidade eficaz de uma formulação pode depender de fatores tais como, por exemplo, idade, raça, e sexo do paciente, da gravidade da hipertensão ocular, da taxa de renovação do transcrito do gene-alvo/proteína, da potência do RNA de interferência, e da estabilidade do RNA de interferência. Em uma modalidade, o RNA de interferência é distribuído topicamente para um órgão-alvo e atinge o tecido contendo mRNA de ROCK1 ou de ROCK2, tal como a rede trabecular, a retina ou a cabeça do nervo óptico em uma dose terapêutica, atenuando assim um processo de doença associada à hipertensão ocular.

Veículos aceitáveis: Um veículo aceitável refere-se àqueles veículos que causam no máximo pouca a nenhuma irritação ocular, proporcionam conservação adequada se necessária, e distribuem um ou mais RNAs de interferência da presente invenção em uma dosagem homogênea. Um veículo aceitável para administração de RNA de interferência de modalidades da presente invenção incluem reagentes de transfecção com base em lipídios catiônicos TransIT®-TKO (Mirus Corporation, Madison, WI), LIPOFECTIN®, Lipofectamine, OLIGOFECTAMINE® (Invitrogen, Carlsbad, CA), ou DHARMAFECT® (Dharmacon, Lafayette, CO); policátions tal como polietilenoimina; peptídeos catiônicos tais como Tat, poliarginina, ou Penetratina (peptídeo Antp); ou lipossomos. Lipossomos são formados de lipídios formadores de vesícula padrão e um esterol, tal como colesterol, e podem incluir molécula

de marcação tal como um anticorpo monoclonal tendo afinidade de ligação para antígenos de superfície de células endoteliais, por exemplo. Ainda, os lipossomos podem ser lipossomos peguilados.

Os RNAs de interferência podem ser distribuídos em solução, em suspensão, ou em dispositivos de distribuição bioerodíveis ou não-bioerodíveis. Os RNA de interferência podem ser distribuídos sozinhos ou como componentes de conjugados covalentes, definidos. Os RNAs de interferência podem ser também complexados com lipídios catiônicos, peptídeos catiônicos, ou polímeros catiônicos; complexados com proteínas, proteínas de fusão, ou domínios de proteína com propriedades de ligação de ácido nucléico (por exemplo, protamina); ou encapsulados em nanopartículas ou lipossomos. A distribuição específica de tecido ou célula pode ser obtida pela inclusão de uma fração de marcação tal como um anticorpo ou fragmento de anticorpo.

Para distribuição oftálmica, um RNA de interferência pode ser combinado com conservantes oftalmologicamente aceitáveis, co-solventes, tensoativos, intensificadores de viscosidade, intensificadores de penetração, tampões, cloreto de sódio, ou água para formar uma suspensão ou solução oftálmica, aquosa, estéril. As formulações em solução podem ser preparadas por dissolução do RNA de interferência em um tampão aquoso, isotônico, fisiologicamente aceitável. Ainda, a solução pode incluir um tensoativo aceitável para auxiliar na dissolução do inibidor. Agentes de construção de viscosidade, tais como hidroximetil celulose, hidroxietil celulose, metilcelulose, polivinilpirrolidona, ou similares podem ser adicionados às composições da presente invenção para aperfeiçoar a retenção do composto.

De modo a preparar a formulação oftálmica em ungüento, o RNA de interferência é combinado com um conservante em um veículo apropriado, tal como óleo mineral, lanolina líquida, ou vaselina branca. Formulações oftálmicas estéreis em gel podem ser preparadas por suspensão do RNA de interferência em uma base hidrofílica preparada da combinação de, por exemplo, CARBOPOL[®]-940 (BF Goodrich, Charlotte, NC), ou similares, de acordo com métodos conhecidos da técnica. VISCOAT[®] (Alcon Laboratories,

Inc., Fort Worth, TX), ou similar, de acordo com os métodos conhecidos da técnica. VISCOAT® (Alcon Laboratories, Inc., Fort Worth, TX) pode ser usado, por exemplo, para injeção intra-ocular. Outras composições da presente invenção podem conter agentes intensificadores de penetração, tais como Cremephor e TWEEN® 80 (monolaurato de polioxietileno sorbitano, Sigma Aldrich, St. Louis, MO), no caso do RNA de interferência ser menos penetrante no olho.

Kits: Modalidades da presente invenção podem proporcionar um kit que inclui reagentes para atenuar a expressão de um mRNA, como aqui citado, em uma célula. O kit contém um siRNA ou um vetor de expressão de shRNA. Para siRNAs e vetores de expressão de shRNA não-virais, o kit contém também um reagente de transfecção ou outro veículo de distribuição adequado. Para vetores de expressão de shRNA virais, o kit pode conter o vetor viral e/ou os componentes necessários para produção de vetor viral (por exemplo, uma linhagem de célula de empacotamento (por exemplo, uma linhagem de célula de empacotamento bem como um vetor que compreende o modelo de vetor viral e os vetores auxiliares adicionais para empacotamento). O kit pode conter também siRNAs de controle positivo e negativo ou vetores de expressão de shRNA (por exemplo, um siRNA de controle de não-alvejamento ou um siRNA que alveja um mRNA não relacionado). O kit pode conter também reagentes para avaliar o "knock-down" do gene-alvo pretendido (por exemplo, iniciadores e sondas para PCR quantitativa para detectar o MRNA-alvo e/ou anticorpos contra a proteína correspondente para Western blots). Alternativamente, o kit pode compreender uma sequência de siRNA ou uma sequência de shRNA e as instruções e os materiais necessários para gerar o siRNA por transcrição *in vitro* ou para construir um vetor de expressão de shRNA.

Uma combinação farmacêutica em forma de kit é ainda proporcionada que inclui, em combinação embalada, um meio de veículo adaptado para receber um meio de recipiente em confinamento próximo com ele e um primeiro dispositivo que inclui uma composição de RNA de interferência e um veículo aceitável. Tais kits podem incluir ainda, se desejados, um ou

mais de vários componentes convencionais de kit farmacêutico, tais como, por exemplo, recipientes com um ou mais veículos farmaceuticamente aceitáveis, recipientes adicionais, etc. como ficará prontamente aparente para aqueles versados na técnica. Instruções impressas como bulas ou como rótulos, indicando as quantidades dos componentes a serem administradas, diretrizes para administração, e/ou diretrizes para misturar os componentes, podem também ser incluídas no kit.

A capacidade do RNA de interferência para "knock-down" os níveis de expressão de gene-alvo endógeno em, por exemplo, células da rede trabecular (RT) humana é avaliada *in vitro* como a seguir. Células TM humanas transformadas, por exemplo, linhagens de células designadas GTM-3 ou HTM-3 (vide Pang, I.H. *et al.*, 1994. *Curr. Eye Res.* 13:51-63), são plaqueadas 24 horas antes da transfecção para o meio de crescimento padrão (por exemplo, DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal). A transfecção é realizada usando Dharmafect 1 (Dharmacon, Lafayette, CO) de acordo com as instruções do fabricante em concentrações de RNA de interferência de 0,1nM a 100nM. SiCONTROL® siRNA de não-alvejamento Nº 1 e SiControl® siRNA Ciclofilina B (Dharmacon) são usados como controles negativos e positivos, respectivamente. O níveis de mRNA-alvo e de mRNA ciclofilina B (PPIB, NM_000942) são avaliados por qPCR 24 horas pós-infecção usando, por exemplo, iniciadores de avanço e reversos TAQMAN® e um conjunto de sonda que engloba preferivelmente o sítio alvo (Applied Biosystems, Foster City, CA). O siRNA de controle positivo rende "knock-down" essencialmente completo de mRNA ciclofilina B quando a eficácia de transfecção é 100%. Portanto, "knock-down" de mRNA é corrigido para eficácia de transfecção por referência ao nível de mRNA ciclofilina B em células TM transfectadas com o siRNA ciclofilina B. Os níveis de proteína alvo podem ser avaliados aproximadamente 72 h pós-transfecção (tempo real dependente da taxa de renovação da proteína), por exemplo, por Western blot. Técnicas padrão para isolamento de RNA e/ou de proteína de células cultivadas são bem-conhecidas daqueles versados na técnica. Para reduzir a chance de efeitos fora do alvo, não específicos, a concentração mais

baixa possível de RNA de interferência é usada, a qual produz o nível desejado de "knock-down" em expressão de gene-alvo.

A capacidade dos RNAs de interferência da presente invenção de "knock-down" níveis de expressão de proteína Rho quinase é ainda exemplificada nos Exemplos 1 e 2 como a seguir.

Exemplo 1

RNA de Interferência para Silenciar Especificamente ROCK1 em Células da Rede Trabecular

A presente invenção examina a capacidade de RNA de interferência de ROCK1 de "knock-down" os níveis de expressão endógena de ROCK1 em células de rede trabecular (RT) glaucomatosas, cultivadas.

A transfecção de células GTM-3 (Pang, I.H., *et al.*, 1994 *Curr Eye Res.* 13:51-63) foi obtida usando concentrações *in vitro* padrão (100 nM) de siRNAs de ROCK1 ou de ROCK2, ou um siRNA de controle de não-alvejamento e o reagente de transfecção DHARMAFECT® #1 (Dharmacon, Chicago, IL). Todos os siRNAs foram dissolvidos em 1X de tampão de siRNA, uma solução aquosa de KCl 20mM, HEPES 6mM (pH 7,5), MgCl₂ 0,2mM. A expressão da proteína ROCK1 foi avaliada por análise de Western blot, 72 horas pós-transfecção. Os siRNAs de ROCK1 são RNAs de interferência de filamento duplo tendo especificidade para os seguintes alvos: siROCK1#1 alveja SEQ ID NO:23; siROCK1#2 alveja SEQ ID NO:29; siROCK1#3 alveja SEQ ID NO:10; siROCK1#4 alveja SEQ ID NO:9. As seqüências de siROCK2 estão estabelecidas no Exemplo 2, abaixo. Em 100nM, cada um dos quatros siRNAs de ROCK1 decresceu a expressão de ROCK1 com relação a um siRNA de controle de não-alvejamento conforme mostrado pelos dados de Western blot da Figura 1. siROCK1#2 alvejando SEQ ID NO:29 e siROCK#3 alvejando SEQ ID NO:10 pareceram ser particularmente eficazes. Os siRNAs de ROCK2 tiveram pouco, se algum, efeito sobre a expressão de ROCK1, confirmando a especificidade de siRNAs de ROCK2 para o alvo de ROCK2.

Um outro estudo foi efetuado usando os siRNAs em concentrações mais baixas. Células GTM-3 foram transfectadas com a ROCK1 ou os

siRNAs de controle de não-alveijamento em 10nM, 1nM, e 0,1nM, e a expressão de gene-alvo foi avaliada por análise de Western blot, 72 horas pós-infecção. As amostras de controle incluíram um controle de tampão no qual o volume de siRNA foi substituído com um volume igual de 1X de tampão de siRNA (-siRNA). Como mostrado pelos dados da Figura 2, cada um dos quatro siRNAs de ROCK1 reduziu a expressão da proteína ROCK1 significativamente em 10nM e 1nM, contudo, siROCK1#2 também silenciou a expressão da proteína ROCK1 de forma relativamente eficaz em 0,1nM.

Exemplo 2

RNA de Interferência para Silenciar Especificamente ROCK2 em Células da Rede Trabecular

A presente invenção examina a capacidade do RNA de interferência de ROCK2 de "knock-down" os níveis de expressão endógena de ROCK2 em células de rede trabecular (RT) glaucomatosas cultivadas.

A transfecção de células GTM-3 (Pang, I.H., *et al.*, 1994 *Curr Eye Res.* 13:51-63) foi obtida usando concentrações *in vitro* padrão (100 nM) de siRNAs de ROCK1 ou de ROCK2, ou um siRNA de controle de não-alveijamento e o reagente de transfecção DHARMAFECT® #1 (Dharmacon, Chicago, IL). A expressão de proteína ROCK2 foi avaliada por análise de Western blot, 72 horas pós-infecção. Os siRNAs de ROCK2 são RNAs de interferência de filamento duplo tendo especificidade para os seguintes alvos: siROCK2#1 alveja SEQ ID NO:33; siROCK2#2 alveja SEQ ID NO:38; siROCK2#3 alveja SEQ ID NO:34; siROCK#4 alveja SEQ ID NO:39. Em 100nM, cada um dos quatros siRNAs de ROCK2 decresceu a expressão de ROCK2 com relação um siRNA de controle de não-alveijamento e com relação a um grupo de siRNAs específicos de ROCK1 conforme mostrado pelo dados de Western blot da Figura 3. O grupo de siRNAs de ROCK1 teve pouco, se algum, efeito sobre a expressão de ROCK2, confirmando a especificidade de siRNAs de ROCK1 para o alvo de ROCK1.

Um outro estudo foi efetuado usando os siRNAs em concentrações mais baixas. Células GTM-3 foram transfectadas com a ROCK2 ou siRNAs de controle de não-alveijamento em 10nM, 1nM, e 0,1nM, e a expressão de ge-

ne-alvo foi avaliada por análise de Western blot, 72 horas pós-infecção. As amostras de controle incluíram um controle de tampão no qual o volume de siRNA foi substituído com um volume igual de 1X de tampão de siRNA (-siRNA). Como mostrado pelos dados da Figura 4, cada um dos quatro siRNAs reduziu a expressão da proteína ROCK2 significativamente em 10nM e 1nM, com siROCK2#3 exibindo eficácia ligeiramente maior que os outros.

As referências citadas aqui, até onde elas proporcionarem detalhes exemplares procedimentais ou outros detalhes suplementares àqueles estabelecidos aqui, são especificamente incorporadas a título de referência.

Aqueles versados na técnica, à luz da presente descrição, apreciarão que modificações óbvias das modalidades descritas aqui podem ser efetuadas sem se desviar do espírito e do escopo da invenção. Todas as modalidades descritas aqui podem ser feitas e executadas sem experimentação indevida à luz da presente descrição. O escopo integral da invenção é estabelecido na descrição e em modalidades equivalentes dela. O relatório descritivo não deve ser interpretado para restringir indevidamente o escopo inteiro de proteção ao qual a presente invenção tem direito.

Como usados aqui e a menos que indicado de outro modo, o termo "um" tem o significado de "um", "pelo menos um" ou "um ou mais".

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

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

<120> INIBIÇÃO MEDIADA POR RNAi DE RHO QUINASE PARA O TRATAMENTO DE
 DISTÚRBIOS OCULARES

<130> 45263-P017US

<150> 60/754,796
 <151> 2005-12-29

<160> 45

<170> PatentIn versão 3.3

<210> 1
 <211> 4989
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 1
 tttttttttt ttttgagaaa gggaatttca tcccaaataa aaggaatgaa gtctggctcc 60
 ggaggagggt ccccgacctc gctgtggggg ctctgtttc tctccgccgc gctctcgctc 120
 tggccgacga gtggagaaat ctgcgggcca ggcacgcaca tccgcaacga ctatcagcag 180
 ctgaagcgcc tggagaactg cacggtgacg gagggctacc tccacatcct gctcatctcc 240
 aaggccgagg actaccgcag ctaccgcttc cccaagctca cggtcattac cgagtacttg 300
 ctgctgttcc gagtggctgg cctcgagagc ctcgagagacc tcttcccaa cctcacggtc 360
 atccgcggct ggaaactctt ctacaactac gccctgggtca 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 accgctgcca gaaaatgtgc ccaagcacgt gtgggaagcg ggcgtgcacc 720
 gagaacaatg agtgctgcca ccccgagtgc ctgggcagct gcagcgcgcc tgacaacgac 780
 acggcctgtg tagcttgccg ccactactac tatgccggtg tctgtgtgcc tgcctgcccg 840
 cccaacacct acaggtttga gggctggcgc tgtgtggacc gtgacttctg cgccaacatc 900
 ctcagcgccg agagcagcga ctccgagggg tttgtgatcc acgacggcga gtgcatgcag 960
 gagtgcccct cgggcttcat ccgcaacggc agccagagca tgtactgcat cccttgtgaa 1020
 ggtccttgcc cgaaggctctg tgaggaagaa aagaaaacaa agaccattga ttctgttact 1080
 tctgctcaga tgctccaagg atgcaccatc ttcaagggca atttgcctcat taacatccga 1140
 cgggggaata acattgcttc agagctggag aacttcatgg ggctcatcga ggtggtgacg 1200
 ggctacgtga agatccgcca ttctcatgcc ttggtctcct tgccttctt aaaaaacctt 1260
 cgcctcatcc taggagagga gcagctagaa ggggaattact ccttctacgt 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 gaatcgcatac	1560
atcataacct ggcaccggta ccggccccct gactacaggg atctcatcag cttaccggtt	1620
tactacaagg aagcaccctt taagaatgtc acagagtatg atgggcagga tgcctgcggc	1680
tccaacagct ggaacatggt ggacgtggac ctcccgccca acaaggacgt ggagccccgc	1740
atcttactac atgggctgaa gccctggact cagtacgccg tttacgtcaa ggctgtgacc	1800
ctcaccatgg tggagaacga ccatatccgt ggggccaaga gtgagatctt gtacattcgc	1860
accaatgctt cagttccttc cattcccttg gacgttcttt cagcatcgaa ctctctctt	1920
cagttaatcg tgaagtggaa ccctccctct ctgcccaacg gcaacctgag ttactacatt	1980
gtgcgctggc agcggcagcc tcaggacggc tacctttacc ggcacaatta ctgctccaaa	2040
gacaaaatcc ccatcaggaa gtatgccgac ggcaccatcg acattgagga ggtcacagag	2100
aaccccaaga ctgaggtgtg tgggtggggag aaagggcctt gctgcgcctg ccccaaaact	2160
gaagccgaga agcaggccga gaaggaggag gctgaatacc gcaaagtctt tgagaatttc	2220
ctgcacaact ccatcttcgt gcccagacct gaaaggaagc ggagagatgt catgcaagt	2280
gccaacacca ccatgtccag ccgaagcagg aacaccacgg ccgcagacac ctacaacatc	2340
accgacccgg aagagctgga gacagagtac ctttcttttg agagcagagt ggataacaag	2400
gagagaactg tcatttctaa ccttcggcct ttcacattgt accgcatcga tatccacagc	2460
tgcaaccacg aggctgagaa gctgggctgc agcgctcca acttcgtctt tgcaaggact	2520
atgcccgag aaggagcaga tgacattcct gggccagtga cctgggagcc aaggcctgaa	2580
aactccatct ttttaaagtg gccggaacct gagaatccca atggattgat tctaattgat	2640
gaaataaaat acggatcaca agttgaggat cagcgagaat gtgtgtccag acaggaatac	2700
aggaagtatg gaggggcca gctaaaccgg ctaaaccgg ggaactacac agcccggatt	2760
caggccacat ctctctctgg gaatgggtcg tggacagatc ctgtgttctt ctatgtccag	2820
gccaaaacag gatatgaaaa cttcatccat ctgatcatcg ctctgcccgt cgctgtcctg	2880
ttgatcgtgg gagggttggt gattatgctg tacgtcttcc atagaaagag aaataacagc	2940
aggctgggga atggagtgt gtatgcctct gtgaaccgg agtacttcag cgctgctgat	3000
gtgtacgttc ctgatgagt ggaggtggct cgggagaaga tcaccatgag ccgggaactt	3060
gggcaggggt cgtttgggat ggtctatgaa ggagttgcca aggggtgtggt gaaagatgaa	3120
cctgaaacca gagtggccat taaaacagt aacgaggccg caagcatgag tgagaggatt	3180
gagtttctca acgaagcttc tgtgatgaag gagttcaatt gtcaccatgt ggtgagattg	3240
ctgggtgtgg tgtccaag ccagccaaca ctggtcatca tggaactgat 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
taccggaaaag gaggcaaagg gctgctgccc gtgcgctgga tgtctcctga gtccctcaag 3600
gatggagtct tcaccactta ctccgacgtc 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 tggcttcgag gaggtctcct tctactacag cgaggagaac 3900
aagctgcccc agccggagga gctggacctg gagccagaga acatggagag cgtccccctg 3960
gacccctcgg cctcctcgtc ctccctgcca ctgcccagca gacactcagg acacaaggcc 4020
gagaacggcc ccggccctgg ggtgctgggc ctccgcgcca gcttcgacga gagacagcct 4080
tacgcccaca tgaacggggg ccgcaagaac gagcgggcct tgccgctgcc ccagtcttcg 4140
acctgctgat ccttgatcc tgaatctgtg caaacagtaa cgtgtgcca cgccagcgg 4200
ggtagggggg gagagagagt tttaacaatc cattcacaag cctcctgtac ctcaaggat 4260
cttcagttct gcccttgctg ccgcggggag acagcttctc tgcagtaaaa cacatttggg 4320
atgttccttt tttcaatatg caagcagctt tttattccct gcccaaacc ttaactgaca 4380
tgggccttta agaaccctta tgacaacact taatagcaac agagcacttg agaaccagtc 4440
tcctcactct gtccctgtcc ttccctgttc tccctttctc tctcctctct gcttcataac 4500
ggaaaaataa ttgccacaag tccagctggg aagccctttt tatcagtttg aggaagtggc 4560
tgtccctgtg gcccaccca accactgtac acaccgcct gacaccgtg gtcattacaa 4620
aaaaacacgt ggagatggaa atttttacct ttatctttca cctttctagg gacatgaaat 4680
ttacaaaggg ccacgttca tccaaggctg ttaccatttt aacgctgcct aattttgcca 4740
aaatcctgaa ctttctccct catcgccccg gcgctgattc ctctgtccg gaggcattgg 4800
tgagcatggc agctggttgc tccatttgag agacacgtg gcgacacact ccgtccatcc 4860
gactgcccct gctgtgctgc tcaaggccac aggcacacag gtctcattgc ttctgactag 4920
attattattt gggggaactg gacacaatag gtctttctct cagtgaaggt ggggagaagc 4980
tgaaccggc 4989

```

```

<210> 2
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sequência-alvo

```

<400> 2
tcttcgagat gaccaatct

19

<210> 3
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Filamento sentido com 3'NN

<220>
<221> misc_RNA
<222> (1)..(19)
<223> Ribonucleotídeos

<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> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Filamento sentido com 3'NN

<220>
<221> misc_RNA
<222> (1)..(19)
<223> Ribonucleotídeos

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(21)
<223> any, A, T/U, C, G

<400> 4
agauugguca ucucgaagan n

21

<210> 5
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Filamento Sentido

<400> 5
ucuucgagau gaccaaucuu u

21

<210> 6
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
 <223> Filamento Anti-sentido

 <400> 6
 agauugguca ucucgaagau u 21

 <210> 7
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Dúplex de grampo com loop

 <220>
 <221> misc_RNA
 <222> (1)..(19)
 <223> Ribonucleotídeos

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(27)
 <223> any, A, T/U, C, G

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (28)..(48)
 <223> Ribonucleotides

 <400> 7
 ucuucgagau gaccaaucun nnnnnnnaga uuggucaucu cgaagau 48

 <210> 8
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Sequência-alvo

 <400> 8
 tcaacaatga gtacaacta 19

 <210> 9
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Sequência-alvo
 <400> 9
 gaccattgat tctgttact 19

 <210> 10
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Sequência-alvo

 <400> 10

gaagaatcgc atcatcata	19
<210> 11	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> Sequência-alvo	
<400> 11	
tcatcagctt caccgttta	19
<210> 12	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> Sequência-alvo	
<400> 12	
agaatgtcac agagtatga	19
<210> 13	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> Sequência-alvo	
<400> 13	
ggactcagta cgccgttta	19
<210> 14	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> Sequência-alvo	
<400> 14	
agttaatcgt gaagtggaa	19
<210> 15	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> Sequência-alvo	
<400> 15	
acctttaccg gcacaatta	19
<210> 16	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> Sequência-alvo	

<400> 16
 acggcaccat cgacattga 19

<210> 17
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sequência-alvo

<400> 17
 ttgagaattt cctgcacaa 19

<210> 18
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sequência-alvo

<400> 18
 tctaaccttc ggcctttca 19

<210> 19
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sequência-alvo

<400> 19
 ttcggccttt cacattgta 19

<210> 20
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sequência-alvo

<400> 20
 gatcacaagt tgaggatca 19

<210> 21
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sequência-alvo

<400> 21
 tgtacgtctt ccatagaaa 19

<210> 22
 <211> 19
 <212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Sequência-alvo

<400> 22

ggagaataat ccagtccta

19

<210> 23

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Sequência-alvo

<400> 23

catacctcaa cgccaataa

19

<210> 24

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Sequência-alvo

<400> 24

attgcatggt agccgaaga

19

<210> 25

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Sequência-alvo

<400> 25

ccgaagattt cacagtcaa

19

<210> 26

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Sequência-alvo

<400> 26

tttggatatga cgcgagata

19

<210> 27

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Sequência-alvo

<400> 27

tgacgcgaga tatctatga

19

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

<220>
 <223> Sequência-alvo

<400> 28
 cgcatgtgct ggcagtata

19

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

<220>
 <223> Sequência-alvo

<400> 29
 gcatgtgctg gcagtataa

19

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

<220>
 <223> Sequência-alvo

<400> 30
 tctactacag cgaggagaa

19

<210> 31
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sequência-alvo

<400> 31
 tcgacgagag acagcctta

19

<210> 32
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sequência-alvo

<400> 32
 tcttgaatct gtgcaaaca

19

<210> 33
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sequência-alvo

 <400> 33
 taatagcaac agagcactt 19

<210> 34
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Sequência-alvo

 <400> 34
 ctctgcttca taacggaaa 19

<210> 35
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Sequência-alvo

 <400> 35
 tcattgcttc tgactagat 19

<210> 36
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Sequência-alvo

 <400> 36
 cattgcttct gactagatt 19

<210> 37
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Sequência-alvo

 <400> 37
 gcttctgact agattatta 19

<210> 38
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Sequência-alvo

 <400> 38
 ggccagaaat ggagaataa 19

<210> 39
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Sequência-alvo

 <400> 39
 gcagacacct acaacatca 19

 <210> 40
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Sequência-alvo

 <400> 40
 gtgggagggt tgggtgatta 19

 <210> 41
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Filamento Sentido

 <400> 41
 ucuucgagau gaccaaucu 19

 <210> 42
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Filamento Anti-sentido

 <400> 42
 agauugguca ucucgaaga 19

 <210> 43
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Filamento Sentido

 <400> 43
 tcttcgagat gaccaatctc aagga 25

 <210> 44
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Filamento Sentido

<400> 44
ucuucgagau gaccaaucuc aagga

25

<210> 45
<211> 27
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Filamento Anti-sentido

<400> 45
uccuugagau uggucaucuc gaagau

27

REIVINDICAÇÕES

1. Método para atenuar a expressão de mRNA de Rho quinase de um paciente, que compreende:

5 administrar ao paciente uma composição que compreende uma quantidade eficaz de RNA de interferência tendo um comprimento de 19 a 49 nucleotídeos e um veículo farmaceuticamente aceitável, em que o RNA de interferência compreende:

10 um filamento de nucleotídeo sentido, um filamento de nucleotídeo anti-sentido, e uma região de complementaridade contígua pelo menos quase perfeita de pelo menos 19 nucleotídeos;

em que o filamento anti-sentido hibridiza sob condições fisiológicas para uma porção de mRNA correspondente à SEQ ID NO:1 ou SEQ ID NO:2 e tem uma região de complementaridade contígua pelo menos quase perfeita de pelo menos 19 nucleotídeos com a porção de hibridização de mRNA correspondente à SEQ ID No:1 ou SEQ ID NO:2, respectivamente,

15 em que a expressão de mRNA de Rho quinase é assim atenuada.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o paciente é um ser humano e o ser humano tem hipertensão ocular.

20 3. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o paciente é um ser humano e o ser humano está em risco de desenvolver hipertensão ocular.

25 4. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a composição é administrada via tópica, intravítrea, transcleral, periocular, conjuntival, subtenônica, intracameral, sub-retiniana, subconjuntival, retrobulbar, ou intacanalicular.

5. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o filamento anti-sentido é desenhado para alvejar um mRNA correspondente à SEQ ID No:1 que compreende o nucleotídeo 605, 653, 659, 1248, 1562, 1876, 2266, 2474, 2485, 2740, 2808, 2834, 3007, 3146, 3199, 3245, 3379, 3453, 3511, 30 3513, 3519, 3781, 3782, 998, 1132, 1200, 1648, 1674, 1708, ou 2077.

6. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o filamento anti-sentido é desenhado para alvejar um mRNA correspondente à SEQ ID

NO:2 que compreende o nucleotídeo 1102, 1865, 2000, 2229, 2514, 2584, 2738, 3305, 4111, 4652, 5184, 5187, 5255, 5315, 5439, 5450, 5578, 5579, 5611, 5625, 5795, 6000, 6228, 6264, 584, 1337, 1678, 2773, 2814, 2941, 3357, 3398, 3481, 3633, 3644, 3645, 3767, 3836, 4023, 4097, 5202, ou
5 5440.

7. Método de acordo com a reivindicação 1, que compreende ainda administrar ao paciente um segundo RNA de interferência tendo um comprimento de 19 a 49 nucleotídeos, e que compreende:

um filamento de nucleotídeo sentido, um filamento de nucleotídeo anti-sentido, e uma região de complementaridade contígua pelo menos quase perfeita de pelo menos 19 nucleotídeos;

em que o filamento anti-sentido do segundo RNA de interferência hibridiza sob condições fisiológicas para uma segunda porção de mRNA correspondente à SEQ ID NO:1 ou à SEQ ID NO:2 e o filamento anti-sentido tem uma região de complementaridade contígua pelo menos quase perfeita de pelo menos 19 nucleotídeos com a segunda porção de hibridização de mRNA correspondente à SEQ ID No:1 ou à SEQ ID NO:2, respectivamente.

8. Método para tratar hipertensão ocular em um paciente que necessite do mesmo, que compreende:

administrar a um olho do paciente uma composição que compreende uma quantidade eficaz de RNA de interferência que tem um comprimento de 19 a 49 nucleotídeos e um veículo farmaceuticamente aceitável, em que o RNA de interferência compreende:

um filamento de nucleotídeo sentido, um filamento de nucleotídeo anti-sentido, e uma região de complementaridade contígua pelo menos quase perfeita de pelo menos 19 nucleotídeos;

em que o filamento anti-sentido hibridiza sob condições fisiológicas para uma porção de mRNA correspondente à SEQ ID NO:1 ou à SEQ ID NO:2, e tem uma região de complementaridade contígua pelo menos quase perfeita de pelo menos 19 nucleotídeos com a porção de hibridização de mRNA correspondente à SEQ ID NO:1 ou à SEQ ID NO:2, respectivamente, em que a hipertensão ocular é assim tratada.

9. Método para atenuar a expressão de mRNA de Rho quinase de um paciente, que compreende:

administrar ao paciente uma composição que compreende uma quantidade eficaz de RNA de interferência de filamento simples tendo um comprimento de 19 a 49 nucleotídeos e um veículo farmaceuticamente aceitável, em que o RNA de interferência de filamento simples hibridiza sob condições fisiológicas para uma porção de mRNA correspondente à SEQ ID NO:1 que compreende o nucleotídeo 605, 653, 659, 1248, 1562, 1876, 2266, 2474, 2485, 2740, 2808, 2834, 3007, 3146, 3199, 3245, 3379, 3453, 3511, 3513, 3519, 3781, 3782, 998, 1132, 1200, 1648, 1674, 1708, ou 2077, e o RNA de interferência tem uma região de complementaridade contígua pelo menos quase perfeita de pelo menos 19 nucleotídeos com a porção de hibridização de mRNA correspondente à SEQ ID NO:1, ou em que o RNA de interferência de filamento simples hibridiza sob condições fisiológicas para uma porção de mRNA correspondente à SEQ ID NO:2 que compreende o nucleotídeo 1102, 1865, 2000, 2229, 2514, 2584, 2738, 3305, 4111, 4652, 5184, 5187, 5255, 5315, 5439, 5450, 5578, 5579, 5611, 5625, 5795, 6000, 6228, 6264, 584, 1337, 1678, 2773, 2814, 2941, 3357, 3398, 3481, 3633, 3644, 3645, 3767, 3836, 4023, 4097, 5202, ou 5440, e o RNA de interferência tem uma região de complementaridade contígua pelo menos quase perfeita de pelo menos 19 nucleotídeos com a porção de hibridização de mRNA correspondente à SEQ ID NO:2, em que a expressão de mRNA de Rho quinase é assim atenuada.

10. Método para atenuar a expressão de um MRNA-alvo de hipertensão ocular em um paciente, em que o método compreende:

administrar ao paciente uma composição que compreende uma quantidade eficaz de RNA de interferência que tem um comprimento de 19 a 49 nucleotídeos e um veículo farmaceuticamente aceitável, em que o RNA de interferência compreende:

uma região de pelo menos 13 nucleotídeos contíguos tendo pelo menos 90% de complementaridade de sequência para, ou pelo menos 90% de identidade de sequência com, os 13 últimos nucleotídeos da extremidade

3' de um mRNA correspondente a qualquer uma de SEQ ID NO:3, e SEQ ID NO:9 – SEQ ID NO:79, em que a expressão do mRNA-alvo de hipertensão ocular é assim atenuada.

11. Método de acordo com a reivindicação 10, em que o mRNA-alvo de hipertensão ocular é mRNA de ROCK1 e o RNA de interferência compreende:

uma região de pelo menos 13 nucleotídeos contíguos tendo pelo menos 90% de complementaridade de seqüência para, ou pelo menos 90% de identidade de seqüência com, os 13 penúltimos nucleotídeos da extremidade 3' de um mRNA correspondente à SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:78, ou SEQ ID NO:79.

12. Método de acordo com a reivindicação 10, em que o mRNA-alvo de hipertensão ocular é mRNA de ROCK2 e o RNA de interferência compreende:

uma região de pelo menos 13 nucleotídeos contíguos tendo pelo menos 90% de complementaridade de seqüência para, ou pelo menos 90% de identidade de seqüência com, os 13 penúltimos nucleotídeos da extremidade 3' de um mRNA correspondente à SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:71, ou SEQ ID NO:72.

13. Método de acordo com a reivindicação 10, em que o RNA de interferência compreende uma região de pelo menos 14 nucleotídeos contíguos tendo pelo menos 85% de complementaridade de sequência para, ou pelo menos 85% de identidade de sequência com, os 14 penúltimos nucleotídeos da extremidade 3' de um mRNA que corresponde à sequência identificada pelo identificador de sequência.

14. Método de acordo com a reivindicação 10, em que o RNA de interferência compreende uma região de pelo menos 15, 16, 17, ou 18 nucleotídeos contíguos tendo pelo menos 80% de complementaridade de sequência para, ou pelo menos 80% identidade de sequência com, os 15, 16, 17, ou 18 penúltimos nucleotídeos, respectivamente, da extremidade 3' de um mRNA que corresponde à sequência identificada pelo identificador de sequência.

15. Método de acordo com a reivindicação 10, em que a composição compreende ainda um segundo RNA de interferência tendo um comprimento de 19 a 49 nucleotídeos e compreendendo uma região de pelo menos 13 nucleotídeos contíguos tendo pelo menos 90% de complementaridade para, ou pelo menos 90% de identidade de sequência com, os 13 penúltimos nucleotídeos da extremidade 3' de um segundo mRNA correspondente a qualquer uma da SEQ ID NO:3 e SEQ ID NO:9 – SEQ ID NO:79.

16. Método para tratar hipertensão ocular em um paciente que necessite do mesmo, em que o método compreende:

administrar a um olho do paciente uma composição que compreende uma quantidade eficaz de RNA de interferência tendo um comprimento de 19 a 49 nucleotídeos e um veículo farmacologicamente aceitável, em que o RNA de interferência compreende:

uma região de pelo menos 13 nucleotídeos contíguos tendo pelo menos 90% de complementaridade de sequência para, ou pelo menos 90% de identidade de sequência com, os 13 penúltimos nucleotídeos da extremidade 3' de um mRNA correspondente a qualquer uma de SEQ ID NO:3, e SEQ ID NO:9 – SEQ ID NO:79, em que a hipertensão ocular é assim tratada.

17. Método de acordo com a reivindicação 16, em que o RNA de

interferência compreende:

uma região de pelo menos 13 nucleotídeos contíguos tendo pelo menos 90% de complementaridade de sequência para, ou pelo menos 90% de identidade de sequência com, os 13 penúltimos nucleotídeos da extremidade 3' de um mRNA correspondente à SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:78, ou SEQ ID NO:79.

18. Método de acordo com a reivindicação 16, em que o RNA de interferência compreende:

uma região de pelo menos 13 nucleotídeos contíguos tendo pelo menos 90% de complementaridade de sequência para, ou pelo menos 90% de identidade de sequência com, os 13 penúltimos nucleotídeos da extremidade 3' de um mRNA correspondente à SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:71, ou SEQ ID NO:72.

19. Método de acordo com a reivindicação 16, em que o RNA de interferência compreende uma região de pelo menos 14 nucleotídeos contíguos tendo pelo menos 85% de complementaridade de sequência para, ou pelo menos 85% de identidade de sequência com, os 14 penúltimos nucleotídeos da extremidade 3' de um mRNA que corresponde à sequência identificada pelo identificador de sequência.

20. Método de acordo com a reivindicação 16, em que o mRNA de interferência compreende uma região de pelo menos 15, 16, 17, ou 18 nucleotídeos contíguos tendo pelo menos 80% de complementaridade de sequência para, ou pelo menos 80% identidade de sequência com, os 15,
5 16, 17, ou 18 penúltimos nucleotídeos, respectivamente, da extremidade 3' de um mRNA que corresponde à sequência identificada pelo identificador de sequência.

21. Método de acordo com a reivindicação 16, em que a composição compreende ainda um segundo RNA de interferência tendo um comprimento de 19 a 49 nucleotídeos e compreendendo uma região de pelo menos 13 nucleotídeos contíguos tendo pelo menos 90% de complementaridade para, ou pelo menos 90% de identidade de sequência com, os 13 penúltimos nucleotídeos da extremidade 3' de um segundo mRNA correspondente a qualquer uma da SEQ ID NO:3 e SEQ ID NO:9 – SEQ ID NO:79.

15 22. Método de acordo com a reivindicação 16, em que o paciente tem glaucoma.

23. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o filamento de nucleotídeo sentido e o filamento de nucleotídeo anti-sentido são conectadas por uma alça em grampo de cabelo.

20 24. Método de acordo com a reivindicação 8, em que o filamento de nucleotídeo sentido e o filamento de nucleotídeo anti-sentido são conectados por uma alça em grampo de cabelo.

25 25. Método de acordo com a reivindicação 10, em que o RNA de interferência é um shRNA.

26. Método de acordo com a reivindicação 10, em que o RNA de interferência é um siRNA.

27. Método de acordo com a reivindicação 10, em que o RNA de interferência é um miRNA.

30 28. Método de acordo com a reivindicação 16, em que o RNA de interferência é um shRNA.

29. Método de acordo com a reivindicação 16, em que o RNA de interferência é um siRNA.

30. Método de acordo com a reivindicação 16, em que o RNA de interferência é um miRNA.

31. Método de acordo com a reivindicação 8, em que a composição é administrada via tópica, intravítrea, transcleral, periocular, conjuntival, subtenônica, intracameral, sub-retiniana, subconjuntival, retrobulbar, ou intracanalicular.

32. Método de acordo com a reivindicação 18, em que a composição é administrada via expressão *in vivo* a partir de um vetor de expressão de RNA de interferência.

33. Método de acordo com a reivindicação 16, em que a composição é administrada via tópica, intravítrea, transcleral, periocular, conjuntival, subtenônica, intracameral, sub-retiniana, subconjuntival, retrobulbar, ou intracanalicular.

34. Método de acordo com a reivindicação 16, em que a composição é administrada via expressão *in vivo* a partir de um vetor de expressão de RNA de interferência.

35. Método para tratar hipertensão ocular em um paciente que necessite deste, que compreende:

administrar ao paciente uma composição que compreende uma molécula de siRNA de filamento duplo que infra-regula a expressão de um gene de ROCK1 ou de ROCK2 via interferência de RNA, em que:

cada filamento da molécula de siRNA é independentemente cerca de 19 a cerca de 27 nucleotídeos de comprimento; e

um filamento da molécula de siRNA compreende uma sequência de nucleotídeos tendo complementaridade substancial para um mRNA correspondente ao gene de ROCK1 ou de ROCK2, respectivamente, de modo que a molécula de siRNA direciona a clivagem do mRNA via interferência de RNA.

36. Método de acordo com a reivindicação 35, em que a composição é administrada via aerossol, bucal, dérmica, intradérmica, inalação, intramuscular, intranasal, intra-ocular, intrapulmonar, intravenosa, intraperitoneal, nasal, ocular, oral, ótica, parenteral, emplastro, subcutânea, sublin-

gual, tópica, ou transdérmica.

37. Método de acordo com a reivindicação 35, em que o RNA de interferência é administrado via expressão *in vivo* de um vetor de expressão capaz de expressar o RNA de interferência.

5 38. Método de acordo com a reivindicação 35, em que o RNA de interferência é um miRNA.

39. Método de acordo com a reivindicação 35, em que cada filamento da molécula de siRNA é independentemente cerca de 19 nucleotídeos a cerca de 25 nucleotídeos de comprimento.

10 40. Método de acordo com a reivindicação 35, em que cada filamento da molécula de siRNA é independentemente cerca de 19 nucleotídeos a cerca de 21 nucleotídeos de comprimento.

41. Composição que compreende um RNA de interferência que tem um comprimento de 19 a 49 nucleotídeos e compreende uma sequência de nucleotídeos que corresponde a qualquer uma de SEQ ID NO:3, e SEQ ID NO:9 – SEQ ID NO:79, ou um complemento destas, e um veículo farmacologicamente aceitável.

42. Composição de acordo com a reivindicação 41, em que o RNA de interferência é um shRNA.

20 43. Composição de acordo com a reivindicação 41, em que o RNA de interferência é um siRNA.

44. Composição de acordo com a reivindicação 41, em que o RNA de interferência é um miRNA.

25 45. Composição que compreende uma molécula de siRNA de filamento duplo que infra-regula a expressão de um gene de ROCK1 ou de ROCK2 via interferência de RNA, em que:

cada filamento da molécula de siRNA é independentemente de cerca de 19 a cerca de 27 nucleotídeos de comprimento; e

30 um filamento da molécula de siRNA compreende uma sequência de nucleotídeos que tem substancial complementaridade para um mRNA que corresponde ao gene de ROCK1 ou de ROCK2, respectivamente, de modo que a molécula de siRNA direciona a clivagem do mRNA via interfe-

rência de RNA.

46. Composição de acordo com a reivindicação 45, em que cada filamento da molécula de siRNA é independentemente cerca de 19 nucleotídeos a cerca de 25 nucleotídeos de comprimento.

5 47. Composição de acordo com a reivindicação 45, em que cada filamento da molécula de siRNA é independentemente cerca de 19 nucleotídeos a cerca de 21 nucleotídeos de comprimento.

48. Uso na preparação de uma composição para atenuar a expressão de um mRNA de hipertensão ocular de um paciente, de uma quantidade eficaz de RNA de interferência que tem um comprimento de 19 a 49 nucleotídeos e um veículo farmacologicamente aceitável, em que o RNA de interferência compreende:

uma região de pelo menos 13 nucleotídeos contíguos tendo pelo menos 90% de complementaridade de sequência para, ou pelo menos 90% de identidade de sequência com, os 13 penúltimos nucleotídeos da extremidade 3' de um mRNA correspondente à qualquer uma de SEQ ID NO:3, e SEQ ID NO:9 – SEQ ID NO:79.

49. Uso na preparação de um medicamento para o tratamento de hipertensão ocular em um paciente, de uma composição que compreende:

20 uma quantidade eficaz de RNA de interferência tendo um comprimento de 19 a 49 nucleotídeos e um veículo farmacologicamente aceitável, em que o RNA de interferência compreende:

uma região de pelo menos 13 nucleotídeos contíguos tendo pelo menos 90% de complementaridade de sequência para, ou pelo menos 90% de identidade de sequência com, os 13 penúltimos nucleotídeos da extremidade 3' de um mRNA correspondente à qualquer uma de SEQ ID NO:3, e SEQ ID NO:9 – SEQ ID NO:79, em que a hipertensão ocular é assim tratada.

50. Uso de acordo com a reivindicação 48 ou 49, em que o RNA de interferência compreende:

uma região de pelo menos 13 nucleotídeos contíguos tendo pelo menos 90% de complementaridade de sequência para, ou pelo menos 90%

de identidade de seqüência com, os 13 penúltimos nucleotídeos da extremidade 3' de um mRNA correspondente à qualquer uma de SEQ ID NO:3, e SEQ ID NO:9 – SEQ ID NO:79.

5 51. Uso de acordo com a reivindicação 48 ou 49, em que o RNA de interferência compreende:

uma região de pelo menos 13 nucleotídeos contíguos tendo pelo menos 90% de complementaridade de seqüência para, ou pelo menos 90% de identidade de seqüência com, os 13 penúltimos nucleotídeos da extremidade 3' de um mRNA correspondente à qualquer uma de SEQ ID NO:31 -
10 SEQ ID NO:72

52. Uso de acordo com a reivindicação 48 ou 49, em que o RNA de interferência compreende uma região de pelo menos 14 nucleotídeos contíguos tendo pelo menos 85% de complementaridade de seqüência para, ou pelo menos 85% de identidade de seqüência com, os 14 penúltimos nucleotídeos da extremidade 3' de um mRNA que corresponde à seqüência identificada pelo identificador de seqüência.
15

53. Uso de acordo com a reivindicação 48 ou 49, em que o RNA de interferência compreende uma região de pelo menos 15, 16, 17, ou 18 nucleotídeos contíguos tendo pelo menos 80% de complementaridade de seqüência para, ou pelo menos 80% identidade de seqüência com, os 15, 16, 17, ou 18 penúltimos nucleotídeos, respectivamente, da extremidade 3' de um mRNA que corresponde à seqüência identificada pelo identificador de seqüência.
20

54. Uso de acordo com a reivindicação 48 ou 49, em que a composição que compreende ainda um segundo RNA de interferência tendo um comprimento de 19 a 49 nucleotídeos e compreendendo uma região de pelo menos 13 nucleotídeos contíguos tendo pelo menos 90% de complementaridade para, ou pelo menos 90% de identidade de seqüência com, os 13 penúltimos nucleotídeos da extremidade 3' de um segundo mRNA correspondente a qualquer uma da SEQ ID NO:3 e SEQ ID NO:9 – SEQ ID NO:79.
25
30

55. Uso na preparação de um medicamento para o tratamento de hipertensão ocular em um paciente, de uma composição que compreende:

uma quantidade eficaz de RNA de interferência tendo um comprimento de 19 a 49 nucleotídeos e um veículo farmaceuticamente aceitável, em que o RNA de interferência compreende:

um filamento de nucleotídeo sentido, um filamento de nucleotídeo anti-sentido, e uma região de complementaridade contígua pelo menos
5 quase perfeita de pelo menos 19 nucleotídeos;

em que o filamento anti-sentido hibridiza sob condições fisiológicas para uma porção de mRNA correspondente à SEQ ID No:1 ou à SEQ ID NO:2 e tem uma região de complementaridade contígua pelo menos quase
10 perfeita de pelo menos 19 nucleotídeos com a porção de hibridização de mRNA correspondente à SEQ ID No:1 ou SEQ ID NO:2, respectivamente.

56. Uso na preparação de uma composição para atenuar a expressão de um mRNA de Rho quinase de um paciente, de uma quantidade eficaz de RNA de interferência que tem um comprimento de 19 a 49 nucleotídeos e um veículo farmaceuticamente aceitável, em que o RNA de interferência de filamento simples hibridiza sob condições fisiológicas para uma
15 porção de mRNA correspondente à SEQ ID NO:1 que compreende o nucleotídeo 605, 653, 659, 1248, 1562, 1876, 2266, 2474, 2485, 2740, 2808, 2834, 3007, 3146, 3199, 3245, 3379, 3453, 3511, 3513, 3519, 3781, 3782, 998, 1132, 1200, 1648, 1674, 1708, ou 2077, e o RNA de interferência tem uma
20 região de complementaridade contígua pelo menos quase perfeita de pelo menos 19 nucleotídeos com a porção de hibridização de mRNA correspondente à SEQ ID NO:1, ou

em que o RNA de interferência de filamento simples hibridiza
25 sob condições fisiológicas para um porção de mRNA correspondente à SEQ ID NO:2 que compreende o nucleotídeo 1102, 1865, 2000, 2229, 2514, 2584, 2738, 3305, 4111, 4652, 5184, 5187, 5255, 5315, 5439, 5450, 5578, 5579, 5611, 5625, 5795, 6000, 6228, 6264, 584, 1337, 1678, 2773, 2814, 2941, 3357, 3398, 3481, 3633, 3644, 3645, 3767, 3836, 4023, 4097, 5202, 5440 e o RNA de interferência tem uma região de complementaridade
30 contígua pelo menos quase perfeita de pelo menos 19 nucleotídeos com a porção de hibridização de mRNA correspondente à SEQ ID NO:2.

57. Uso de acordo com a reivindicação 55, em que o filamento de nucleotídeo sentido e o filamento de nucleotídeo anti-sentido são conectados por uma alça em grampo de cabelo.

58. Uso de acordo com a reivindicação 48, 49, ou 55, em que o RNA de interferência é um shRNA.

59. Uso de acordo com a reivindicação 48, 49, ou 55, em que o RNA de interferência é um siRNA.

60. Uso de acordo com a reivindicação 48, 49, ou 55, em que o RNA de interferência é um miRNA.

61. Uso de acordo com a reivindicação 49 ou 55, em que a composição é preparada para administração via tópica, intravítrea, transcleral, periocular, conjuntival, subtenônica, intracameral, sub-retiniana, subconjuntival, retrobulbar, ou intracanalicular.

62. Uso de acordo com a reivindicação 49 ou 55, em que a composição compreende um vetor de expressão capaz de expressar o RNA de interferência.

63. Uso de acordo com a reivindicação 49 ou 55, em que o medicamento é para o tratamento de hipertensão ocular.

64. Uso na preparação de um medicamento para o tratamento de hipertensão ocular em um paciente, de uma composição que compreende:

uma molécula de siRNA de filamento duplo que infra-regula a expressão de um gene de ROCK1 ou de ROCK2 via interferência de RNA, em que:

cada filamento da molécula de siRNA é independentemente cerca de 19 a cerca de 27 nucleotídeos de comprimento; e

um filamento da molécula de siRNA compreende uma sequência de nucleotídeos tendo complementaridade substancial para um mRNA correspondente ao gene de ROCK1 ou ROCK2, respectivamente, de modo que a molécula de siRNA direciona a clivagem do mRNA via RNA de interferência.

65. Uso de acordo com a reivindicação 64, em que a composição é preparada para administração via aerossol, bucal, dérmica, intradérmica.

ca, inalação, intramuscular, intranasal, intra-ocular, intrapulmonar, intravenosa, intraperitoneal, nasal, ocular, oral, ótica, parenteral, emplastro, subcutânea, sublingual, tópica, ou transdérmica.

5 66. Uso de acordo com a reivindicação 64, em que a composição compreende um vetor de expressão capaz de expressar o RNA de interferência.

67. Uso de acordo com a reivindicação 64, em que o RNA de interferência é um miRNA.

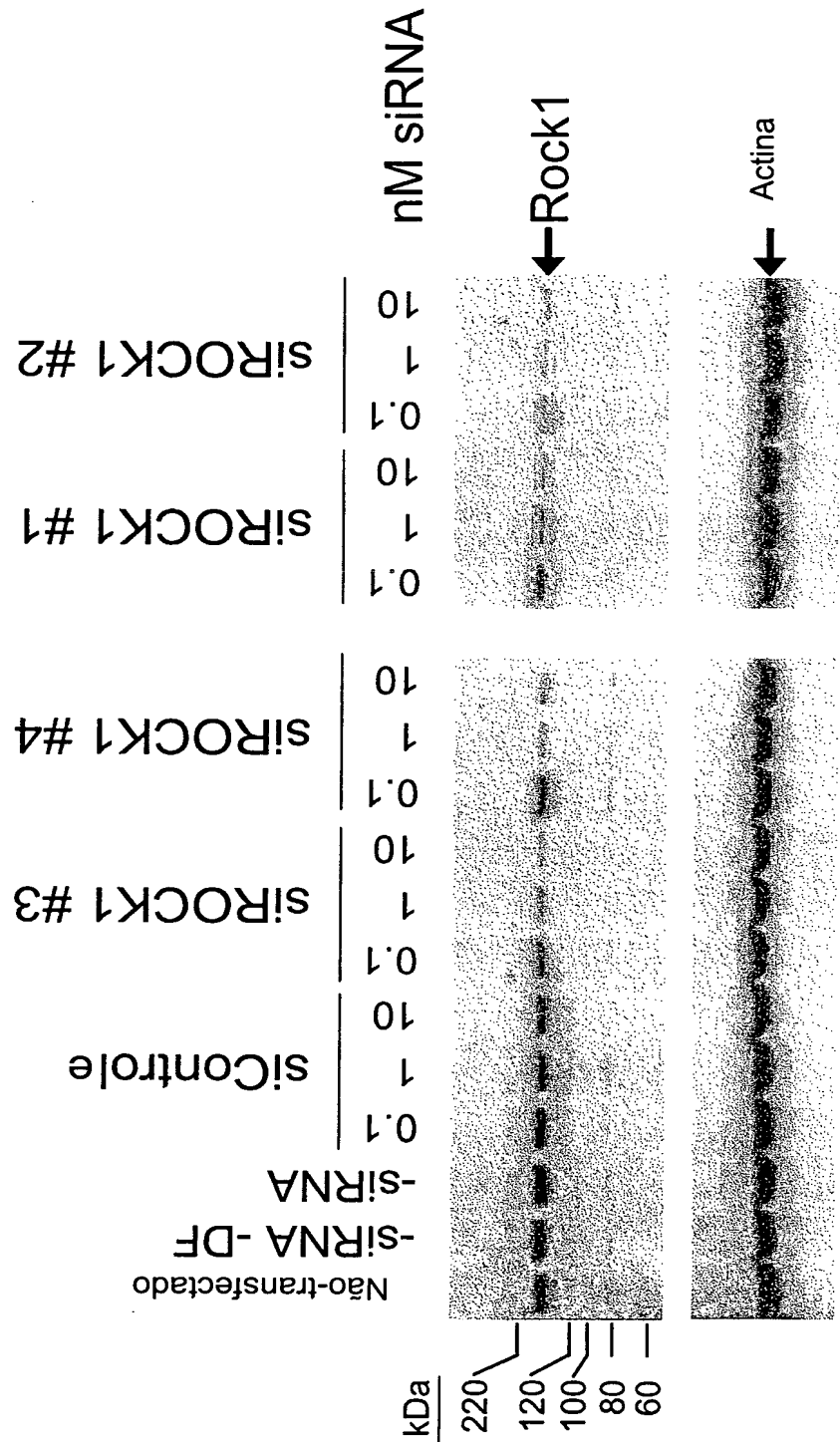


FIG. 2

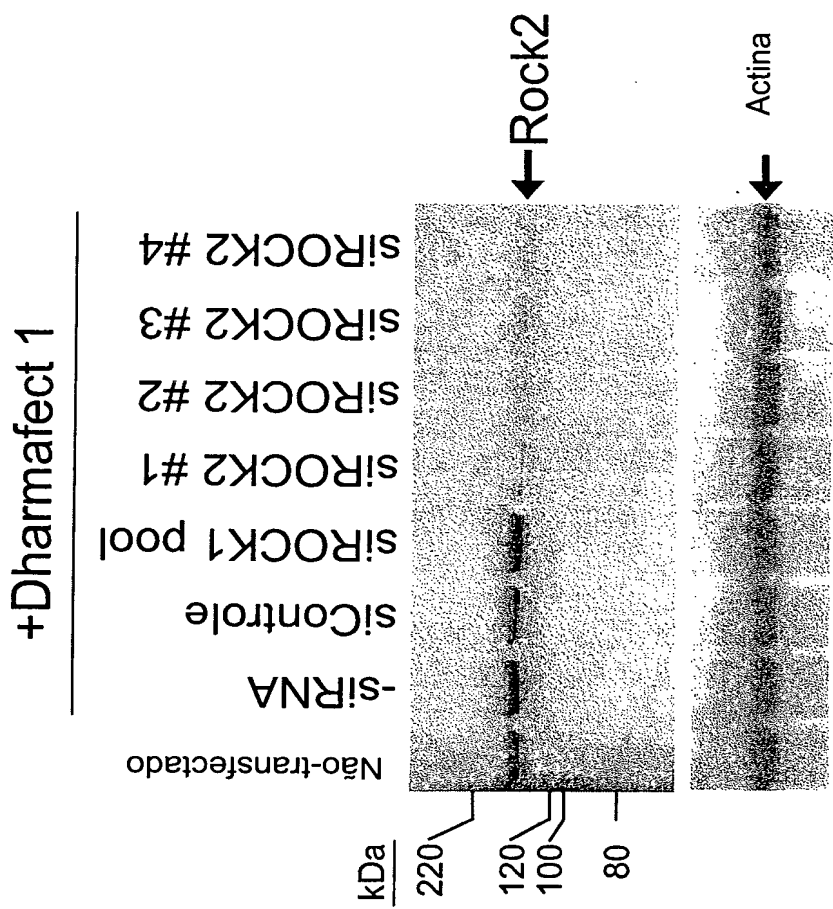


FIG. 3

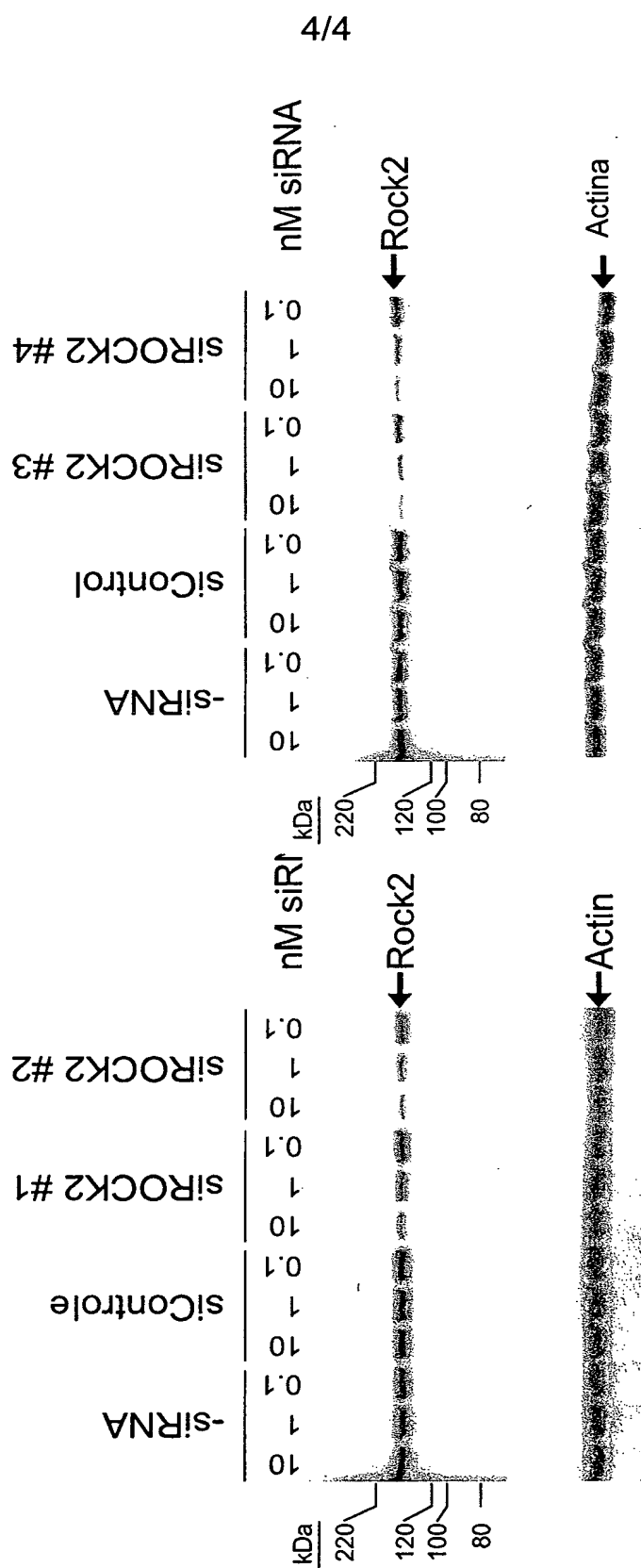


FIG. 4

RESUMO

Patente de Invenção: "INIBIÇÃO MEDIADA POR RNAi DE RHO QUINASE PARA O TRATAMENTO DE DISTÚRBIOS OCULARES".

5 A presente invenção refere-se a interferência de RNA que é proporcionada para inibição de expressão de Rho quinase para o tratamento de pacientes com distúrbios oculares, particularmente para o tratamento de pressão intra-ocular, hipertensão ocular e glaucoma. Alvos de mRNA de Rho quinase incluem mRNA para ROCK1 e ROCK2.