

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

(21) **PI 0713111-9 A2**

(22) Data de Depósito: 18/05/2007
(43) Data da Publicação: 17/04/2012
(RPI 2154)



(51) *Int.Cl.:*
C07H 21/00
A61K 31/7088
A61P 11/00
A61P 29/00

(54) **Título:** OLIGONUCLEOTÍDEOS QUE AFETAM A EXPRESSÃO DAS FOSFODIESTERASES

(30) **Prioridade Unionista:** 19/05/2006 US 60/801384

(73) **Titular(es):** Topigen Pharmaceuticals Inc.

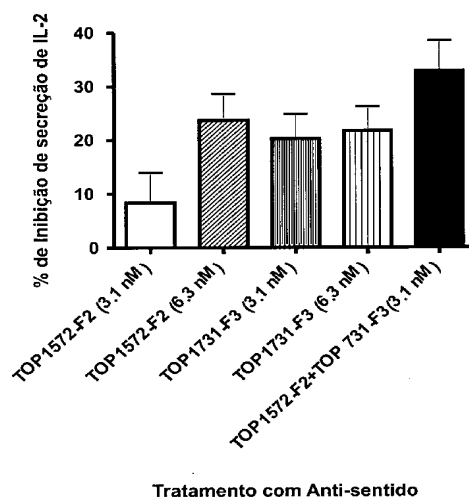
(72) **Inventor(es):** Helene D'Anjou, Luc Paquet, Paolo Renzi

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

(86) **Pedido Internacional:** PCT CA2007000902 de 18/05/2007

(87) **Publicação Internacional:** WO 2007/134451de 29/11/2007

(57) **Resumo:** OLIGONUCLEOTÍDEOS QUE AFETAM A EXPRESSÃO DAS FOSFODIESTERASES. A presente invenção refere-se a oligonucleotídeos anti-sentido, terapêuticos, direcionados contra genes que codificam fosfodiesterases (PDE) e o uso destes oligonucleotídeos anti-sentido em combinação. Esses oligonucleotídeos anti-sentido podem ser usados como ferramentas analíticas e/ou como agentes terapêuticos no tratamento de doença associada ao cAMP celular reduzido em um paciente, tais como doenças inflamatórias do aparelho respiratório incluindo, por exemplo, asma, doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD), síndrome de angústia respiratória aguda, bronquite, bronquite crônica, silicose, fibrose pulmonar, rejeição a aloenxerto pulmonar, rinite alérgica e sinusite crônica, bem como outras condições onde um aumento no AMP cíclico ou uma redução nos níveis da PDE é benéfico.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**OLIGONUCLEOTÍDEOS QUE AFETAM A EXPRESSÃO DAS FOSFODIESTERASES**".

Referência Cruzada a Pedidos Relacionados

- 5 Este pedido reivindica a prioridade do Pedido de Patente US 60/801.384 depositado em 19 de maio de 2006.

Campo da Invenção

- A presente invenção refere-se a métodos, reagentes e composições de uso para terapia com base em oligonucleotídeo anti-sentido. Em particular, a invenção refere-se à aplicação de terapia com base em oligonucleotídeo anti-sentido ao tratamento de doenças associadas à cAMP em um paciente, incluindo por exemplo, doença relacionada à PDE, tais como condições inflamatórias e câncer. A invenção também refere-se a métodos de terapia gênica e métodos para identificar nova estratégia com base em anti-sentido, em que AMP cíclica fosfodiesterases estão envolvidas.
- 10
- 15

Antecedentes da Invenção

- O epitélio alveolar e das vias aéreas é reconhecido como uma barreira dinâmica que desempenha um importante papel na regulação das respostas inflamatórias e metabólicas ao estresse oxidativo, sepse, endotoxemia, e outras doenças críticas no pulmão. O epitélio respiratório, em particular, é um alvo primário das condições inflamatórias/infecções inflamatórias na interface epitelial-sangüínea, e é por si próprio capaz de amplificar um sinal inflamatório ao recrutar células inflamatórias e produzir mediadores inflamatórios.
- 20

- 25 Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (COPD) é um exemplo de uma doença inflamatória da via respiratória e alveolar, em que se acredita que a supra-regulação da inflamação desempenha uma função. A inflamação na COPD é caracterizada por infiltração aumentada de neutrófilos, linfócitos positivos a CD8, e macrófagos nas vias aéreas. Neutrófilos e macrófagos desempenham um importante papel na patogênese da inflamação nas vias aéreas na COPD devido a sua capacidade de liberar vários mediadores incluindo elastase, metaloproteases, e radicais de oxigênio que promovem
- 30

inflamação e lesão tecidual. Foi sugerido que o acúmulo de células inflamatórias nas vias aéreas dos pacientes com COPD é desencadeado pela liberação aumentada de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias que atraem as células inflamatórias para as vias aéreas, ativam as mesmas e mantêm a sua presença. As células, que estão presentes, também liberam enzimas (como metaloproteases) e radicais de oxigênio que têm efeito negativo no tecido e perpetuam a doença. Tem sido mostrado que uma ampla faixa de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias aumenta dentro dos pulmões de pacientes com COPD. Dentre essas, um papel importante é desempenhado pelo fator alfa de necrose tumoral (TNF-alfa), fator estimulador de colônias de macrófagos (GM-CSF) e interleucina 8 (IL-8), que são aumentados nas vias aéreas de pacientes com COPD.

Outros exemplos de doenças respiratórias, nas quais a inflamação parece desempenhar um papel, incluem: asma, tosse eosinofílica, bronquite, rejeição aguda e crônica a aloenxerto de pulmão, sarcoidose, fibrose pulmonar, rinite e sinusite. Asma é definida por inflamação das vias aéreas, obstrução reversível e hiperresponsoimento das vias aéreas. Nessa doença, as células inflamatórias, que estão envolvidas, são predominantemente eosinófilos, linfócitos T e mastócitos, embora neutrófilos e macrófagos possam ser também importantes. Uma ampla faixa de citocinas e quimiocinas foi mostrada como tendo sido aumentada nas vias aéreas e desempenha uma função na patofisiologia desta doença ao promover inflamação, obstrução e hiperresponsoimento.

Tosse eosinofílica é caracterizada por tosse crônica e a presença de células inflamatórias, na maior parte eosinófilos, dentro das vias aéreas dos pacientes em ausência de obstrução das vias aéreas ou hiperresponsoimento. Várias citocinas e quimiocinas são aumentadas nessa doença, embora elas sejam na maioria direcionadas aos eosinófilos. Os eosinófilos são recrutados e ativados dentro das vias aéreas e liberam, potencialmente, enzimas e radicais de oxigênio que desempenham uma função na perpetuação da inflamação e tosse.

Bronquite aguda é uma doença aguda que ocorre durante uma

infecção ou evento irritante, por exemplo, por poluição, poeira, gás ou produtos químicos, das vias aéreas inferiores. A bronquite crônica é definida pela presença de tosse e produção de flegma na maioria dos dias, por pelo menos 3 meses do ano, por 2 anos. Podem ser também encontradas dentro das vias aéreas, durante bronquite aguda ou crônica, células inflamatórias, predominantemente neutrófilos, com uma série de quimiocinas e citocinas. Acredita-se que esses mediadores tenham uma função na inflamação, sintomas e produção de muco que ocorrem durante estas doenças.

Transplante de pulmão é realizado em pacientes com doença pulmonar em estágio terminal. Rejeição aguda a aloenxerto e, mais importante, crônica, ocorre quando as células inflamatórias do nosso corpo, linfócitos, não reconhecem o órgão doador como "seu". Células inflamatórias são recrutadas por quimiocinas e citocinas e liberam uma vasta coleção de enzimas que levam à destruição de tecidos e, no caso da rejeição crônica, a uma doença chamada de bronquite obliterante.

Sarcoidose é uma doença de causa desconhecida, na qual granulomas não-caseificantes, crônicos, ocorrem dentro do tecido. O pulmão é o órgão mais comumente afetado. A lavagem broncoalveolar pulmonar mostra um aumento principalmente nos linfócitos, macrófagos e algumas vezes neutrófilos e eosinófilos. Essas células são também recrutadas e ativadas por citocina e quimiocinas e acredita-se que estejam envolvidas na patogênese da doença.

Fibrose pulmonar é uma doença do tecido pulmonar caracterizada por fibrose progressiva e crônica (formação de cicatriz), que levará à insuficiência respiratória crônica. Tipos e causas diferentes da fibrose pulmonar existem, mas são todas caracterizadas por influxo e persistência das células inflamatórias, ativação e proliferação de fibroblastos com deposição de colágeno no tecido pulmonar. Esses eventos parecem estar relacionados à liberação de citocinas e quimiocinas dentro do tecido pulmonar.

Rinite aguda é uma doença aguda que ocorre durante uma infecção ou evento irritante, por exemplo, por poluição, poeira, gás ou produtos químicos, do nariz ou das vias aéreas superiores. A rinite crônica é defi-

nida pela presença do nariz escorrendo constantemente, congestão nasal, espirro e prurido. Também podem ser encontradas dentro da vias aéreas superiores, durante rinite aguda ou crônica, células inflamatórias com uma ampla faixa de quimiocinas e citocinas. Acredita-se que esses mediadores desempenhem um papel na inflamação, sintomas e produção de muco que ocorrem durante estas doenças.

Sinusite aguda é uma doença infecciosa usualmente aguda dos seios, caracterizada por congestão nasal, escorrimento, flegma purulento, cefaléia ou dor no seio, com ou sem febre. Sinusite crônica é definida pela persistência por mais de 6 meses dos sintomas da sinusite aguda. Pode-se também encontrar durante a sinusite aguda ou crônica dentro a vias aéreas superiores e seios, células inflamatórias com uma ampla faixa de quimiocinas e citocinas. Acredita-se que esses mediadores desempenhem um papel na inflamação, sintomas e produção de flegma que ocorrem durante essas doenças.

Há um volume crescente de evidências que sugere uma ligação íntima entre a inflamação e as doenças neoplásicas. O microambiente tumoral é conformado por células que entram nele, e suas funções refletem as condições locais. Alterações sucessivas que ocorrem no sítio do tumor durante a progressão do tumor se assemelham à inflamação crônica. Essa reação inflamatória crônica parece ser significativamente orquestrada pelo tumor, e parece promover a sobrevivência do tumor. Ficou evidente que respostas inflamatórias precoces e persistentes observadas em ou em torno dos neoplasmas em desenvolvimento regula vários aspectos do desenvolvimento do tumor (remodelação de matriz, angiogênese, potencial maligno) por proporcionar diversos mediadores implicados em manter a homeostasia de tecido, por exemplo, fatores de crescimento e de sobrevivência solúveis, enzimas remodeladoras de matriz, espécies de oxigênio reativo e outras moléculas bioativas.

Conforme descrição acima, essas doenças respiratórias inflamatórias ou doenças, nas quais a inflamação desempenha um papel crítico, são todas caracterizadas pela presença de mediadores que recrutam e ativam

diferentes células inflamatórias, que liberam enzimas ou radicais de oxigênio provocando sintomas, a persistência da inflamação e quando crônicas, a destruição ou rompimento do tecido normal.

Uma abordagem terapêutica lógica seria infra-regular a produção de citocinas e de quimiocinas e a resposta celular inflamatória. Isso tem sido realizado em todas as doenças descritas acima através do emprego ou de corticosteróides tópicos ou sistêmicos com níveis diferentes de sucesso. Os corticosteróides são imunossupressivos e têm efeitos não somente sobre as células inflamatórias, mas também sobre outras células do corpo que levam à toxidez, quando administrados cronicamente.

Apesar da disponibilidade de medicamentos para COPD, asma e outras doenças respiratórias inflamatórias, a prevalência e a morbidez destas doenças permaneceram estáveis ou aumentaram. É óbvio que há uma necessidade médica não satisfeita quanto à terapia das doenças respiratórias inflamatórias, e agentes terapêuticos inovadores são requeridos com urgência. A terapia com base em oligonucleotídeo anti-sentido oferece uma nova abordagem alternativa para diminuir, seletivamente, a expressão de genes específicos sem os efeitos tóxicos indesejáveis das estratégias terapêuticas tradicionais. Terapias anti-sentido estão sendo investigadas para o tratamento de várias doenças. Tem sido previamente mostrado que oligonucleotídeos anti-sentido direcionados contra receptores para mediadores inflamatórios podem ser administrados aos pulmões e infra-regulam seus alvos conforme descrito no WO9966037.

Uma abordagem terapêutica que reduziria a liberação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias por uma ampla faixa de células, enquanto teria um efeito reduzido sobre a liberação dos mediadores antiinflamatórios ou enzimas antiinflamatórias, pode ser vantajosa sobre as terapias correntes para doenças respiratórias inflamatórias ou para qualquer outra doença inflamatória sistêmica.

Os nucleotídeos cíclicos, cAMP e cGMP, são os segundos mensageiros ubíquos que participam da sinalização de vias e de mecanismos de transdução. Células mamíferas têm desenvolvido um complexo e altamente

conservado complemento de enzimas que regulam a geração e inativação de nucleotídeos cíclicos através de mecanismos, múltiplos e complexos, de alimentação de avanço e de retroalimentação. Ambas as cAMP e cGMP são formadas a partir de seus respectivos trifosfatos (ATP e GTP) pela atividade catalítica de adenilil (adenilato) ou guanilil (guanilato) ciclase, respectivamente, conforme descrito por Essayan D. M. *Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) inhibitors and immunomodulation*. Biochem. Pharmacol., 1999, 57, 965-973. Inativação de cAMP/cGMP é obtida por clivagem hidrolítica da ligação 3'-fosfodiéster catalisada pelas fosfodiesterases dependentes de nucleotídeos cíclicos (PDEs), resultando na formação do 5'-monofosfato inativo, correspondente, conforme descrito por Essayan, 1999 e Perry M.J. e Higgs G.A. *Chemotherapeutic potential of phosphodiesterase inhibitors*. 1998, Curr Opin Chem Biol. 4:472-81.

Foi demonstrado que a resposta inflamatória e sua progressão são altamente sensíveis a modulações nos níveis de estado constante de nucleotídeos cíclicos para modulações, onde as células alvo, quanto a seus efeitos, se estendem além das células imunes para incluir células acessórias, tais como células da musculatura lisa das vias aéreas, epiteliais e endoteliais, e neurônios conforme descrito por Perry e Higgs, 1998; Essayan, 1999. A esse respeito, o conceito emergente de que a modulação de nucleotídeos cíclicos intracelulares desempenha um papel principal na regulação do meio inflamatório foi recentemente evoluído para alvejar e melhorar as respostas inflamatórias/auto-imunes. As PDEs *de nucleotídeos cíclicos são uma grande família de multi-genes em crescimento, que compreende pelo menos 11 famílias de enzimas PDE*. O perfil de inibidores de PDE seletivos e não seletivos *in vitro* e *in vivo* sugere, portanto, uma utilidade terapêutica potencial como antidepressivos, imunomoduladores, tocolíticos, inótrópos/cronótrópos, e agentes citoprotetores.

cAMP intracelular parece ter um papel fundamental, não somente no relaxamento, ativação e proliferação da musculatura lisa, mas também na modulação dos mediadores de liberação por células inflamatórias. Níveis de cAMP reduzidos podem levar à produção aumentada de mediadores in-

flamatórios tais como TNF-alfa, GM-CSF, e IL-8 nas células epiteliais das vias aéreas.

Entendimento dos mecanismos moleculares do papel regulador das citocinas na homeostasia celular, bem como nas doenças antiinflamatórias/auto-imunes/infecciosas tem começado a proporcionar novas abordagens para que sejam projetadas estratégias terapêuticas para intervenções farmacológicas. Uma tal abordagem é o potencial quimioterapêutico de bloqueio da enzima PDE, que revelou esquema de diversidade e complexidade fenomenal que promete produtos terapêuticos para um largo espectro de estados doentes. Um entendimento da mecânica da inibição de PDE está centrado nas propriedades imunorreguladoras dos nucleotídeos cíclicos (cAMP/cGMP), pavimentando, assim, um canal através do qual aplicações terapêuticas antiinflamatórias poderiam ser claramente entendidas.

A resposta inflamatória e sua progressão são altamente sensíveis às modulações nos níveis em estado constante de nucleotídeos cíclicos, onde a células alvo para seus efeitos se estendem além das células imunes para incluir células estruturais, tais como células epiteliais, da musculatura lisa, e células endoteliais, e neurônios (Perry e Higgs, 1998; Essayan, 1999). A modulação dos nucleotídeos cíclicos intracelulares desempenha um papel principal na regulação da resposta inflamatória. As PDEs de nucleotídeos cíclicos são uma família multigênica grande e crescente, compreendendo pelo menos 11 famílias de PDE. PDEs diferem em sua distribuição tecidual e celular, bem como em duas características moleculares e físico-químicas, incluindo sequências de nucleotídeos e de proteínas, especificidade para substrato, sensibilidade a inibidor, e exigências de cofatores. Dentro das diferentes famílias, isoformas específicas para tecido são geradas do mesmo gene por *splicing* alternativo de mRNA e uso de promotor diferencial.

A família de PDE4 específica para cAMP é uma das PDEs mais estudadas. Enzimas dentro desta família são encontradas na maioria das células pró-inflamatórias e imunes, onde elas desempenham um papel chave na regulação do metabolismo da cAMP. Enzimas PDE4 são expressas

em macrófagos, neutrófilos, células T CD8+ citotóxicas, células epiteliais bronquiais, e células da musculatura lisa das vias aéreas. Além disso, inibidores de PDE4 modulam inflamação em modelos de animais de doenças respiratórias, sugerindo que PDE4 pode representar um alvo adequado em
5 uma estratégia com base em produtos terapêuticos para intervenção com inibidores de moléculas pequenas. Fármacos anti-PDE4 inibem a hidrólise da cAMP intracelular, que, por sua vez, proporciona broncodilatação e supressão da resposta inflamatória. Inibidores de PDE4 seletivos, tais como cilomilast e roflumilast, são ativos em modelos de animal de inflamação de
10 neutrófilos (Bundschuh DS et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2001, 297: 280-290). Embora o uso de inibidores de PDE4 para o tratamento de inflamação das vias aéreas esteja sob investigações clínicas intensivas, vários inibidores foram rejeitados devido a sua toxicidade, seus efeitos colaterais limitadores de dose, dos quais náusea e vômitos são as manifestações fisiológicas
15 mais comuns. Consequentemente, melhorar a razão terapêutica dos inibidores de PDE4 fez surgir um grande desafio que é ainda um importante campo de investigação.

Considerando a distribuição de enzimas nos tecidos alvo, com a atividade alta da PDE3 e da PDE4 nas células da musculatura lisa das vias
20 aéreas e inflamatórias, inibidores seletivos destas enzimas podem incrementar a terapia de obstrução crônica ao fluxo aéreo. Geralmente, inibidores de moléculas pequenas focaram em um ou vários PDE sem avaliar os efeitos prejudiciais potenciais de inibir todas as isoenzimas de uma PDE. Por exemplo, foi sugerido que a maior parte da toxicidade atribuída aos antagonistas
25 de PDE4 ocorre através da inibição do isótipo D de PDE4. Além disso, como mostrado aqui, a inibição de certas isoenzimas de PDEs não reduz todos os mediadores pró-inflamatórios, contudo, uma combinação de oligonucleotídeos específicos para isótipos pode levar a um efeito que é muito mais amplo quando a combinação certa de oligonucleotídeos anti-sentido é empregada.
30

A família de PDE3 contém dois genes diferentes, PDE3A e PDE3B, que são inibidos por cGMP e exibem uma alta afinidade com cAMP.

Cada gene de PDE3 codifica pelo menos duas isoformas de *splice*. O PDE3A é mais abundante em adipócitos e células hepáticas. Contudo, os dados iniciais de experimentos químicos com inibidores de PDE3 seletivos ou uma combinação com inibidores de PDE4 têm sido um tanto decepcionantes e têm diminuído as expectativas consideravelmente, já que esses fármacos tiveram eficácia limitada e seu uso era clinicamente limitado pelos seus efeitos colaterais.

PDE7 foi primeiramente isolada de um glioblastoma humano. PDE7A codifica uma PDE específica de cAMP, que é insensível a cGMP e a inibidores de PDE3 e de PDE4, e tem uma sequência de aminoácidos distinta de outras cAMP PDEs. Em humanos, dois genes (PDE7A e PDE7B) foram caracterizados. O gene PDE7A codifica três isoenzimas (PDE7A1, PDE7A2, e PDE7A3) derivadas do mesmo gene por *splicing* alternativo de mRNA. Em humanos, mRNA de PDE7A2 é expresso abundantemente no músculo esquelético, coração, e rim, ao passo que nos testículos, pulmão, e no sistema imunológico (timo, baço, linfonodo, leucócitos sangüíneo) são fontes ricas de PDE7A1. Além disso, linfócitos T humanos ativados, mas não *naïve*, expressam a variante *splice* PDE7A3. Em contraste, PDE7B existe como uma isoenzima simples em humanos, ela compartilha ~70% de similaridade de sequência com PDE7A, mas com propriedades cinéticas distintas. PDE7B é expressa predominantemente no cérebro e em vários outros tecidos incluindo fígado, coração, glândulas da tireóide, e musculatura esquelética. Foi demonstrado que a estimulação de células T *naïve* humanas com anticorpos anti-CD3 e anti-CD28 promove a produção de IL-2 e a ampliação clonal. Esses efeitos foram atribuídos à PDE7A e a infra-regulação desta enzima previne a proliferação de linfócitos (Li L et al., *Science*, 1999, 283, 848-851).

A família da PDE4 contém 4 genes diferentes (PDE4 A-D). Devido ao *splicing* alternativo de genes, múltiplas variantes de *splice* são reportadas e classificadas em dois grupos principais, as formas longas e as formas curtas. Os produtos gênicos de PDE4A, B e D são encontrados na maior parte das células imunes e inflamatórias. Esses estão presentes tanto

constitutivamente como depois da ativação, conforme descrito por Burnouf C. em Pruniaux M.P. *Current Pharmaceutical Design* 2002; 8:1255-12965. A inibição de todos ou de certos isótipos de PDE4 está associada à infra-regulação de vários mediadores inflamatórios; contudo, um aumento de certas citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, IL-6) tem sido descrito (Giembycz M.A. *Expert Opin Invest Drugs* 2001, 10:1361-1379).

Portanto, seria desejável inibir todas as três enzimas PDE; contudo, esta abordagem pode ser problemática devido à toxicidade que tem sido descrita com a administração de inibidores de cada uma dessas enzimas. A aplicação tópica de oligonucleotídeos anti-sentido poderia evitar a toxicidade sistêmica da inibição da enzima, mas parece que existem muitas isoenzimas desta PDE para tornar esta abordagem prática. A inibição de um ou vários isótipos de enzimas PDE podem não ser tão eficazes quando a inibição completa de PDE, já que outros isótipos estariam presentes para terem seus efeitos pró-inflamatórios.

Portanto, parecia ser desejável procurar um modo de infra-regular os mediadores pró-inflamatórios e suas células enquanto menos mediadores antiinflamatórios ou enzimas inibidoras para a terapia das doenças respiratórias inflamatórias seriam afetados. Logo, é aqui proposta a aplicação terapêutica de uma combinação de oligonucleotídeos anti-sentido direcionados contra isótipos selecionados de enzimas PDE como uma terapia para doenças respiratórias antiinflamatórias ou qualquer doença, em que AMP cíclica desempenhe um papel.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção proporciona compostos de oligonucleotídeo anti-sentido que são eficazes na infra-regulação de genes de isótipos de PDE contra os quais eles são direcionados bem como compostos de oligonucleotídeos anti-sentido selecionados que são eficazes na infra-regulação não somente dos genes de isótipos de PDE contra os quais eles são direcionados, mas também outros genes relacionados, inclusive outros genes de isótipos de PDE, genes inflamatórios e mitogênicos.

Em um outro aspecto, a presente invenção proporciona uma

composição que compreende pelo menos 2 compostos de oligonucleotídeos anti-sentido, em que cada oligonucleotídeo anti-sentido é capaz de infra-regular um gene diferente. Em algumas modalidades deste aspecto, a combinação dos pelo menos 2 compostos de oligonucleotídeos anti-sentido leva a uma infra-regulação de cada um dos genes que é mais que a capacidade aditiva de cada anti-sentido em infra-regular cada gene individualmente. Em outras modalidades, a presente invenção também proporciona uma composição que compreende pelo menos 2 compostos de oligonucleotídeos anti-sentido, em que cada composto de oligonucleotídeo anti-sentido é capaz de infra-regular um gene diferente, estando cada composto de oligonucleotídeo anti-sentido presente em uma concentração na qual o composto de oligonucleotídeo anti-sentido é praticamente ineficaz, ele mesmo, na infra-regulação do gene ao qual ele é direcionado contra, a combinação dos pelo menos 2 compostos de oligonucleotídeo anti-sentido leva a uma infra-regulação significativa de cada um dos genes contra os quais os compostos de oligonucleotídeo anti-sentido são direcionados e opcionalmente outros genes relacionados. Em ainda outras modalidades desse aspecto da presente invenção, é proporcionada uma composição que compreende uma combinação de pelo menos dois compostos de oligonucleotídeo anti-sentido em que cada um deles é direcionado contra um gene alvo de PDE diferente e em que cada um é eficaz para infra-regular ou inibir um gene alvo de PDE, em que cada composto de oligonucleotídeo está presente na combinação em uma concentração na qual ele exibe menos que 20% de inibição de seu gene alvo, em que a combinação dos compostos de oligonucleotídeo exibe mais que 20% de inibição e pelo menos dobra a inibição de pelo menos um dos genes alvo.

A presente invenção proporciona ainda um oligonucleotídeo eficaz nas composições e métodos da presente invenção que têm uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID N^{os}: 1 a 92 e 113 a 126.

A presente invenção proporciona ainda composições farmacêuticas que compreendem um veículo farmacêuticamente aceitável e um oligo-

nucleotídeo da presente invenção ou uma combinação de pelo menos dois oligonucleotídeos anti-sentido conforme descritos acima. A presente invenção proporciona também o uso de tais composições no tratamento e/ou na prevenção de doenças respiratórias inflamatórias e outras doenças relacionadas à inflamação.

As combinações da presente invenção parecem exercer ação inibidora por uma abordagem que foi denominada nocaute de genes múltiplos. O nocaute de genes múltiplos engloba situações, nas quais:

- 1) um oligonucleotídeo infra-regula não somente o gene contra o qual ele é direcionado, mas também outros genes relacionados; e/ou
- 2) uma combinação de pelo menos 2 oligonucleotídeos anti-sentido, cada um presente em uma concentração na qual o oligonucleotídeo anti-sentido é praticamente ineficaz para infra-regular o gene contra o qual ele é direcionado por si só, em que a combinação leva a uma significativa infra-regulação de ambos os genes contra os quais o oligonucleotídeos são direcionados contra e opcionalmente outros genes relacionados.

A presente invenção usa a abordagem acima para proporcionar métodos, composições e kits para tratar e/ou prevenir doença associada à cAMP reduzida em paciente, incluindo doença relacionada à PDE, doença inflamatória que inclui doenças inflamatórias e mais particularmente COPD e asma, e outras doenças nas quais a inflamação desempenha um papel importante, inclusive câncer.

A invenção proporciona também métodos, reagentes e composições para reduzir a expressão e, conseqüentemente, a atividade de cAMP fosfodiesterases cíclicas e, assim, é mantido o equilíbrio correto de produção de cAMP e citocina/quimiocina intracelulares.

A invenção proporciona ainda métodos e ferramentas para identificar/selecionar *in vitro*, *in vivo* e *ex vivo*, combinações de novos compostos, fármacos e vacinas de oligonucleotídeos anti-sentido que são capazes de

interferirem com a expressão de PDE e elevarem o nível de c-AMP intracelular.

A presente invenção proporciona também terapia e métodos de transfecção com base em gene, em que um ou mais compostos de oligonucleotídeo anti-sentido são usados para transfecção de células ou distribuídos para humanos e animais para interferirem com a expressão de genes de isótipos de PDE.

A presente invenção proporciona ainda oligonucleotídeos anti-sentido eficazes contra isótipos de PDE3, tais como PDE3A e PDE3B; isótipos de PDE4 tais como PDE4A, PDE4B e PDE4D e isótipos de PDE7 tal como PDE7A, entre outras PDEs.

De acordo com um outro amplo aspecto da presente invenção, é proporcionado um método para aumentar pelo menos uma estabilidade de nuclease e a atividade de inibição de gene alvo de um oligonucleotídeo anti-sentido, que compreende repor pelo menos um nucleotídeo do oligonucleotídeo com um nucleotídeo modificado com arabinose, preferivelmente 2'-desóxi-2'-fluorarabinonucleotídeo (FANA).

Outros objetos e vantagens da presente invenção tornar-se-ão aparentes mediante leitura da seguinte descrição não restritiva de várias modalidades preferidas feitas com referência aos desenhos acompanhantes.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A presente invenção será agora descrita, em maiores detalhes, com respeito aos desenhos apensos, nos quais:

A figura 1 mostra a eficácia de AON diferentes na inibição de seu nocaute alvo específico. (A) células A549 foram transferidas com AON específico alvejando PDE3A, PDE3B, PDE7A, PDE4A, PDE4B, ou PDE4D por 24 horas usando Lipofectamine® 2000 (Invitrogen, razão de 1 µg de oligonucleotídeo: 1µL de Lipofectamine® 2000) e 200 ng a 400 ng de AON (AS) ou a sequência de pareamento errôneo correspondente (Mi/Sentido). Níveis de expressão de PDE3B, PDE4A e mRNA de PDE4B foram quantificados usando o ensaio Quantigene® (Panomics). PCR em tempo real foi usado para quantificar a expressão de PDE3A, PDE7A e PDE4D. A expressão de

PDE foi normalizada para a expressão de um gene de controle ($\beta 2M$, Ppib ou HPRT). Os dados expressos como % de inibição média relativa ao nível de expressão nas células não tratadas (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, $n=3$). (B) Células 293 transfectadas durante a noite com AON que alveja mais que uma isoforma de PDE4. O nível de expressão de mRNA de isoforma de PDE4 foi quantificado usando PCR em tempo real e normalizado para a expressão do gene de controle $\beta 2M$. Os dados expressam a % de inibição média para nível de expressão de células transfectadas com AON de sentido relevante ou de pareamento errôneo.

A figura 2 mostra o efeito biológico sobre o AON nas células epiteliais do pulmão. Células A549 transfectadas durante a noite com AON conforme descrição acima foram estimuladas com IL-1 β (10 mg/mL) por 4 horas para induzir a secreção de quimiocinas (IL-8, MCP-1) e citocina (GM-SCF). Os sobrenadantes de células foram colhidos e os níveis de quimiocinas/citocinas determinados usando ELISA. Dados expressos em % de inibição média da secreção específica que compara os níveis de secreção entre células alvejadas com PDE-AON com células alvejadas com AON de pareamento errôneo/sentido.

A figura 3 mostra o efeito biológico de AON sobre células imunes. PBMCs humanas transfectadas com AON por 20 h usando o reagente lipídico Escort IV (1 μg de AON:0,5 μL de Lipídio) foram então estimuladas com PHA (10 $\mu g/mL$), por 6 horas. Os sobrenadantes de células foram colhidos e os níveis de citocinas TNF- α e IL-2 secretadas pelas PBMCs em resposta a PHA foram avaliados usando ELISA (BD Biosciences). A redução de citocina foi comparada aos níveis de células estimuladas com PHA em ausência de distribuição de AON. Dados expressos como % de inibição de AON relativa aos níveis de inibição de citocina específica observada com AON de sequência de pareamento errôneo ou de controle de sentido (eixo à esquerda). Lisados de células foram colhidos para determinação de cAMP usando cAMP EIA (Cayman Chemical) como uma medida da atividade de PDE. Aumento de níveis comparados de cAMP em células estimuladas por PHA em ausência de distribuição de AON. Dados expressos como % do

aumento específico de cAMP relativos aos níveis obtidos com AON de sequência de pareamento errôneo ou de controle de sentido (eixo à direita). Dados expressos como % de alteração média $\pm$ SE de entre 9 e 15 doadores.

5 A figura 4 mostra a potência de AON contendo 2'F-ANA na inibição de expressão de gene alvo. Células A549 transferidas por 24 horas com AON específico de PDE4D composto de PS-DNA ou compostos com modificações de PS-FANA ou sequências de pareamento errôneo corresponden-
tes usando Lipofectamine[®] 2000 (Invitrogen, 1 μ g de AON:1 μ L de Lipofec-
tamine[®] 2000) nas doses indicadas (A). O nível de expressão de mRNA de
10 PDE4D de genes alvo foi quantificado usando o ensaio Quantigene[®] (Panomics) e foi normalizado para expressão de gene β 2M. Os dados expressos como % de inibição específica relativa ao nível de expressão em células como a sequência de controle de sentido. Células A549 transfectadas por 24
15 horas com modificações de PS-FANA ou sequências de pareamento errôneo correspondentes usando Lipofectamine[®] (Invitrogen, 1 μ g de AON:1 μ L de Lipofectamine[®] 2000) com uma dose simples para pontos de tempo diferentes (8, 24 ou 48 horas) (B). O nível de expressão de mRNA de PDE4D de genes alvo foi quantificado usando o ensaio Quantigene[®] (Panomics) e foi
20 normalizada para expressão de gene β 2M. Os dados expressos como % de inibição específica relativa ao nível de expressão em células tratadas com a sequência de controle de sentido. Legendas embaixo da figura demonstram as modificações com FANA no AON (específico de PDE4) TOP 1497.

25 A figura 5 mostra o efeito de AON contendo 2'F-ANA sobre os efeitos biológicos das células epiteliais no pulmão. Células A549 transfectadas com AON específico dual para PDE4B/AD composto de PS-DNA (TOP 1545) ou modificado com FANA (PS-FANA, TOP 1545-F3) durante a noite e foram então estimuladas com IL-1 β (10 ng/mL) por 4 horas. Os sobrenadantes foram analisados com respeito à secreção de IL-8 e MCP-1 por ELISA
30 (BD Biosciences) com níveis normalizados para viabilidade de células pelo ensaio AlamarBlue[®]. Dados expressos como % de inibição média relativa ao nível de expressão em células tratadas com sequência de controle de senti-

do (**p<0,01, n=3).

A figura 6 mostra o efeito de AON contendo 2'-F-ANA em células imunes. (A) PBMCs humanas transfectadas com PDE4B/4D AON (TOP 1545) dual modificado com FANA ou AON (TOP 1731) específico de PDE7A modificado com FANA ou ambos por 20 horas, e foram então estimuladas com PHA (10 µg/mL) por 6 horas. Expressão de mRNA de genes alvo foi avaliada usando o ensaio Quantigene® (Panomics) com todos os nível de expressão de gene de PDE normalizados para expressão de gene β 2M. Dados expressos como % específica de inibição da expressão de mRNA para PDE4B (n=8), PDE4D (n=6) e PDE7A (n=8) com relação aos níveis nas células transfectadas com AON sentido. Valores P determinados para teste-t não pareados indicados nas colunas de comparação. (B) Sobrenadantes das células foram colhidos e os níveis de citocinas TNF- α e IL-2 secretadas por PBMCs em resposta à PHA foram avaliados usando ELISA (Medicorp). Decréscimo de citocina foi comparado com os níveis nas células estimuladas com PHA em ausência de distribuição de AON. Dados expressos como % de inibição de AON com relação aos níveis de inibição observados com a mesma dose de oligonucleotídeos de pareamento errôneo ou de controle de sentido. Dados expressos como % média de alteração $\pm$ SE de entre 8 doadores.

A figura 7 mostra a inibição da expressão do gene de timidilato sintase (TYMS) em células 293 transfectadas com AON (TOP-1545-F3) específico de PDE4B/AD ou AON (TOP- 1549) específico de TYMS usando Lipofectamine® 2000 (Invitrogen, razão de µg de oligonucleotídeo:1 µL de Lipofectamine® 2000) e 200 ng, 400 ng e 800 ng de AON TOP-1545-F3 ou TOP-1549. PCR em tempo real foi usada para quantificar a expressão de TYMS que foi normalizada para a expressão de um gene de controle (Ppib). Dados expressos como % de inibição média relativa ao nível de expressão das células transfectadas com AON sentido ou pareamento errôneo.

A figura 8 mostra a eficácia de (A) TOP1572-F2 na redução da expressão de mRNA de PDE4B e (B) TOP1731-F3 na redução da expressão de mRNA de PDE7A na linhagem de células de macaco CYNOM-K1. As

células foram transfectadas por 24 horas com 250 nM de AON ou controle correspondente complexado para Lipofectamine® 2000 em uma razão de 1 µg de oligo: 2 µL de lipídio em meios isentos de antibióticos. Os níveis de expressão de mRNA de PDE4D, PDE4B e PDE7A foram medidos por RT-PCR com quantificação relativa para a expressão do gene de controle de PPIB. A porcentagem de inibição de mRNA de PDE foi determinada com relação ao nível de gene em células não transfectadas. Análise estatística foi realizada usando Anova de um caminho seguido por comparação de Dunnett, **p<0,01.

10 A figura 9 mostra a eficácia de TOP1572-F2 e TOP1545 na redução (A) da expressão de mRNA de PDF4D e (B) na secreção da proteína MCP-1 em células epiteliais bronquiais, humanas, normais (NHBE). As células foram transfectadas por 24 horas com 250 nM de AON ou controle correspondente complexado para Lipofectamine® 2000, em uma razão de 1 µg de oligo: 1 µL de lipídio em meios isentos de antibióticos. As células foram estimuladas por 4 horas com citomix (500 U/mL de TNF-α + 10 ng/mL de IL1-β + 10 ng/mL de IFNγ) no final do período de transfecção. A secreção da proteína MCP-1 foi medida no sobrenadante por ELISA com normalização para a viabilidade celular conforme medida por ensaio de AlamarBlue. O nível de expressão de mRNA de PDE4D foi medido por RT-PCR com quantificação relativa para a expressão do gene de controle B2M. A porcentagem de inibição foi determinada com relação às células tratadas com o controle correspondente. Análise estatística foi realizada usando o teste t, *p<0,05, ***p<0,001.

25 A figura 10 mostra a eficácia do oligonucleotídeo anti-sentido (AON) TOP 1572 na inibição da secreção de citocina por PBMCs humanas estimuladas com PHA. As PBMCs foram transfectadas ou com TOP 1572 (6,2nM) ou com um AON de controle relevante (TOP 1572s, 6,3nM) durante a noite e então estimuladas no dia seguinte com PHA mitogênico (10 µg/mL) por 6 horas. Os níveis de citocinas, IL-2 (A) e TNF-α (B) nos sobrenadantes de células foram quantificados usando ELISA. Os dados representam valores médios de poços em triplicata ± SE de IL-2 (pg/mL) ou TNF-α (ng/mL).

Análise estatística foi realizada usando ANOVA de um caminho seguido pelo teste de comparação múltipla comparando-se os níveis de citocina seguinte à transfecção de AON para as células estimuladas com PHA, ou para as células tratadas com AON de controle, relevantes, $**p<0,01$ e $***p<0,001$. A
5 porcentagem de inibição da secreção de citocina é relativa aos níveis obtidos em resposta à PHA.

A figura 11 mostra a eficácia do AON TOP 1731 na inibição da secreção de citocina por PBMCs humanas estimuladas com mitógenos. PBMCs foram transfectadas ou com TOP1731 (3,1nM) ou AON de controle
10 relevantes (TOP 1731s, 3,1nM) complexadas com Escort IV durante a noite e então estimuladas no dia seguinte com PHA mitogênica (10 $\mu\text{g/mL}$) por 6 horas. Os níveis de citocinas IL-2 (A) e TNF- α (B) em sobrenadantes de células foram quantificados por ELISA. Os dados representam valores médios de poços em triplicata $\pm$ SE de IL-2 (pg/mL) ou TNF- α (ng/mL). A análise
15 estatística foi realizada usando-se ANOVA de um caminho seguido por um teste de comparação múltipla de Bonferroni comparando os níveis de citocina depois de tratamento com AON para as células estimuladas com PHA ou para as células tratadas com AON de controle relevante, $*** p<0,001$. A porcentagem de inibição da secreção de citocina é relativa aos níveis obtidos
20 em resposta à PHA.

A figura 12 mostra a eficácia intensificada quando TOP 1572 e TOP 1731 modificado coms F'ANA são combinados na redução da secreção de citocina por PBMCs estimuladas com PHA. PBMCs humanas foram transfectadas durante a noite com TOP 1572-F2 (3,1 e 6,3nM), TOP1731-F3
25 (3,1 e 6,3nM) ou ambos AON (3,1nM cada, total de 6,3nM). No dia seguinte as PBMCs foram estimuladas com PHA (10 $\mu\text{g/mL}$) por 6 horas e então os níveis de citocina IL-2 em sobrenadantes de células foram quantificados por ELISA. A porcentagem de inibição da secreção de IL-2 foi determinada em comparação com os níveis produzidos por células não transfectadas seguindo
30 te à estimulação com PHA. Os valores representam a média $\pm$ SE.

A figura 13 compara a eficácia do TOP1572 (PS-DNA) com a eficácia do TOP1572-F1, TOP1572-F2 e TOP1572-F3 (versões PS-FANA)

na redução de (A) expressão de PDE4D e (B) de mRNA de PDE4B na linhagem de células 293. As células foram transfectadas por 24 horas, 48 horas ou 72 horas com 250nM de AON ou com controle correspondente complexo para Lipofectamine® 2000 em uma razão de 1 µg de oligo: 1 µL de lipídio em meios isentos de antibióticos. Os níveis de expressão de mRNA de PDE4D e PDE4B foram medidos por RT-PCR com quantificação relativa para a expressão de gene de controle de PPIB. A porcentagem de inibição de mRNA de PDE específica foi determinada com relação ao nível de gene em células transfectadas com o controle correspondente.

A figura 14 compara a eficácia do TOP1731 (PS-DNA) com a eficácia do TOP1731-F3, (PS-FANA) na redução da expressão de mRNA de PDE7A na linhagem de células A549. As células foram transfectadas por 48 horas com 250nM, 125nM ou 75nM de AON ou oligo de controle correspondente complexo para Lipofectamine® 2000 em uma razão de 0,8 µg de oligo: 1 µL de lipídio em meios isentos de antibióticos. O nível de expressão de mRNA de PDE7A foi medido por ensaio Quantigene® com quantificação relativa para a expressão do gene de controle B2M. A porcentagem da inibição de mRNA de PDE foi determinada com relação ao nível de gene em células transfectadas com o controle correspondente.

BREVE DESCRIÇÃO DAS TABELAS

A Tabela 1A define os oligonucleotídeos anti-sentido de PDE7A humana de acordo com a presente invenção.

A Tabela 1b identifica os oligonucleotídeos anti-sentido de PDE3A humana de acordo com a presente invenção.

A Tabela 1c identifica os oligonucleotídeos anti-sentido com especificidade dual contra mais que uma isoforma de PDE4 (ou PDE4A/4D ou PDE4B/4D) de acordo com a presente invenção. Pareamentos errôneos de pares de base entre as isoformas de PDE4 nas sequências de AON estão sublinhados. A reposição de pares de base com inosina em AON está indicada pela letra I.

A Tabela 1d identifica oligonucleotídeos anti-sentido com especificidade contra PDE3B, PDE4D e PDE7A e especificidade dual contra

PDE4A e 4B.

A Tabela 2a identifica os oligonucleotídeos anti-sentido de PDE7A humana contendo bases FANA de acordo com a presente invenção. Bases modificadas com FANA estão indicadas por letras em negrito.

5 A Tabela 2b identifica os oligonucleotídeos anti-sentido de PDE3A humana contendo bases FANA de acordo com a presente invenção. Bases modificadas com FANA estão indicadas por letras em negrito.

A Tabela 2c identifica os oligonucleotídeos anti-sentido de PDE3B humana contendo bases FANA de acordo com a presente invenção.
10 Bases modificadas com FANA estão indicadas por letras em negrito.

A Tabela 2d identifica os oligonucleotídeos anti-sentido de PDE4A humana contendo bases FANA de acordo com a presente invenção. Bases modificadas com FANA estão indicadas por letras em negrito.

A Tabela 2e identifica os oligonucleotídeos anti-sentido de
15 PDE4D humana contendo bases FANA de acordo com a presente invenção. Bases modificadas com FANA estão indicadas por letras em negrito.

A Tabela 2f identifica os oligonucleotídeos anti-sentido de PDE4B humana contendo bases FANA de acordo com a presente invenção. Bases modificadas com FANA estão indicadas por letras em negrito.

20 A Tabela 2g identifica os oligonucleotídeos anti-sentido humano com especificidade dual contra mais que uma isoforma de PDE4A e contendo bases FANA de acordo com a presente invenção. Bases modificadas com FANA estão indicadas por letras em negrito.

A Tabela 3 mostra iniciadores de oligonucleotídeos humanos
25 usados na PCR em tempo real.

DESCRIÇÃO DETALHADA

A invenção refere-se a compostos com base em oligonucleotídeo anti-sentido, composições terapêuticas e métodos para o tratamento de uma doença associada à cAMP celular reduzida e/ou doença associada a
30 níveis elevados de pelo menos uma PDE. A invenção tem por objetivo aumentar o nível de cAMP em células, enquanto é diminuído o nível de mediadores pró-inflamatórios bem como de enzimas que são liberadas por células

inflamatórias.

Para obter esses efeitos, a presente invenção utiliza, em um de seus aspectos, o que é aqui referido por "nocaute de genes múltiplos". Nocaute de genes múltiplos refere-se à inibição ou infra-regulação de genes múltiplos por um de um composto de oligonucleotídeos simples de acordo com a presente invenção, que infra-regula não somente o gene de isoenzima contra o qual ele é também direcionado, mas também gene(s) relacionado(s), ou por uma combinação de pelo menos dois compostos de oligonucleotídeos anti-sentido, em que cada um infra-regula um gene de isoenzima diferente.

Doenças associadas aos níveis reduzidos de cAMP celular incluem doenças nas quais há níveis aumentados de pelo menos uma PDE específica de cAMP (isto é, um doença relacionada à PDE).

O termo "infra-regular" é usado aqui para referir-se à inibição pelo menos parcial da expressão de um gene. De acordo com a invenção, um composto de oligonucleotídeo anti-sentido infra-regula ou inibe um gene contra o qual ele é direcionado, isto é, um gene para o qual o composto de oligonucleotídeo anti-sentido exibe complementaridade de sequência suficiente para causar a inibição.

O termo "genes relacionados" refere-se a outros genes que podem também desempenhar um papel na patofisiologia da doença associadas à cAMP celular reduzida e/ou níveis aumentados de pelo menos uma PDE mas para o qual o composto anti-sentido de oligonucleotídeo não é complementar, ou completamente ou parcialmente. Tais genes incluem, mas sem limitação, genes que codificam enzimas de PDE ou isótipos, mediadores, por exemplo, citocinas ou quimiocinas e genes que codificam enzimas. Exemplos de mediadores incluem IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-15 e TNF-alfa. Exemplos de enzimas apropriadas incluem, mas sem limitação, metaloproteinases de matriz (MMPs), tais como MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9 e MMP-12.

De acordo com a presente invenção, os compostos de oligonucleotídeo anti-sentido (AON) são aqui definidos como oligonucleotídeos na-

turais ou modificados, preferivelmente resistentes à nuclease, que exibem complementaridade ao DNA ou ao mRNA que codifica uma proteína alvo particular de modo que eles são capazes de interferir com a transcrição ou tradução do mRNA e/ou de induzir a atividade de RNase ou similar à RNase e assim funcionarem para reduzir a expressão da proteína alvo. A expressão da proteína alvo é reduzida quando o composto de oligonucleotídeo hibridiza para o DNA ou mRNA alvo, assim interferindo/prevenindo sua transcrição/tradução. Os presentes compostos de oligonucleotídeo devem ser, assim, suficientemente complementares ao ácido nucléico ao qual ele é direcionado de modo a hibridizar para o mesmo. Deste modo, embora em uma modalidade mais preferida os compostos de oligonucleotídeo sejam 100% complementares ao ácido nucléico ao qual eles são direcionados, 100% de complementaridade não são necessários para que a hibridização ocorra entre um composto de oligonucleotídeo e o ácido nucléico ao qual ele é direcionado, como o técnico versado apreciará. Como tal, em algumas modalidades, os compostos de oligonucleotídeo podem ser de cerca de 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 60% e 50% complementares ao ácido nucléico ao qual ele são direcionados.

Os termos "ácido nucléico" e "molécula de ácido nucléico", como usados intercambiavelmente aqui, referem-se a uma molécula compreendida de nucleotídeos, isto é, ribonucleotídeos, desorribonucleotídeos ou ambos. O termo inclui monômeros e polímeros de ribonucleotídeos e desoxirribonucleotídeos, com o ribonucleotídeo e/ou os desoxirribonucleotídeos estando conectados juntos, no caso dos polímeros, via ligações 5' a 3'. Contudo, as ligações podem incluir qualquer uma das ligações conhecidas na síntese de ácido nucléico, incluindo, por exemplo, ligações 5' a 2'. Os nucleotídeos usados na molécula de ácido nucléico podem ser naturais ou podem ser análogos produzidos sinteticamente que são capazes de formar relações de pares de base com pares de base naturais. Exemplos de bases não naturais que são capazes de formar reações de pareamento de base incluem, sem limitação, análogos de aza e desaza primidina, análogos de aza e desaza purina, e outros análogos de base heterocíclica, em que um ou mais dos

átomos de carbono e nitrogênio dos anéis de purina e de pirimidina foram substituídos por heteroátomos, por exemplo, oxigênio, enxofre, selênio, fósforo, e similares.

5 A invenção aqui refere-se também a modificações em oligonucleotídeo(s) anti-sentido que não afetam de modo significativamente adverso a sua atividade de redução ou inibição de expressão de uma proteína alvo, mas que podem intensificar essa atividade.

Os presentes compostos de oligonucleotídeos anti-sentido podem ser também modificados por inserção ou deleção de 1 ou mais bases sem afetar de modo significativamente adverso a sua atividade. Em particular, a adição ou deleção de bases nas extremidades terminais dos oligonucleotídeos que exibem 100% de complementação ao gene contra o qual eles são direcionados, pode ser feita sem perda significativa da atividade inibidora. Tais modificações podem ser feitas de modo a aumentar a atividade ou
10 para proporcionar estabilidade intensificada do oligonucleotídeo. Além disso, a substituição de 1 ou mais bases nos presentes compostos de oligonucleotídeo anti-sentido pode ser também efetuada sem afetar adversamente a atividade, por exemplo, substituição de purina com uma outra purina (adenina, guanina) e pirimidina com pirimidina (citossina, timina, uracila).

20 Os compostos de oligonucleotídeo anti-sentido de acordo com a presente invenção incluem também siRNAs (RNAs de pequena interferência), e RISCs (complexos silenciadores induzidos por RNA) contendo os mesmos que resultam da abordagem de RNAi (interferência de RNA). A abordagem de interferência de RNA (RNAi), que foi descrita recentemente, é
25 considerada como uma nova ferramenta para a inibição de expressão de gene alvo. Como já era conhecido de há muitos, RNAi é baseado em um mecanismo de defesa anti-viral antigo em eucariotos inferiores. Ele é induzido por RNA de fita dupla e seu processamento para 21-23 nt de RNAs de pequena interferência (siRNAs), que provocam a degradação de mRNA endógeno homólogo depois da hibridização para o mRNA alvo em um modo de
30 fita simples com o auxílio do complexo RISC. O modo que RNAi trabalha está ainda para ser inteiramente elucidado, mas ele já serve como uma a-

bordagem de primeira escolha para gerar fenótipos com perda de função dentre a ampla variedade das espécies eucarióticas, tais como nematódeos, moscas, plantas, fungos e mamíferos.

5 Compostos de oligonucleotídeos anti-sentido de acordo com a presente invenção incluem também ribozimas e sequências de nucleotídeos curtas, RNA ou DNA de fita dupla ou simples, que podem incorporar modificações químicas conforme descrição acima, capazes de inibir transcrição e/ou inibição de genes *in vitro* e/ou *in vivo*.

10 As composições e métodos da presente invenção, em um aspecto, embora sem se estar ligado por um modo de ação particular, parecem agir por um mecanismo que foi denominado de "nocaute de genes múltiplos". Nocaute de genes múltiplos no contexto de presente invenção refere-se a:

- 15 1) um composto de oligonucleotídeo anti-sentido que infra-regula não somente o gene contra o qual ele é direcionado, mas também infra-regula outros genes relacionados;
- 20 2) uma combinação de pelo menos 2 compostos de oligonucleotídeos anti-sentido, em que cada um é capaz de infra-regular um gene, em que cada um está presente em uma concentração na qual o composto de oligonucleotídeos anti-sentido é, por ele mesmo, praticamente ineficaz em infra-regular um gene contra o qual ele é direcionado, em que a combinação leva à infra-regulação significativa de ambos genes contra os quais os oligonucleotídeos são direcionados e podem também infra-regular outros genes relaciona-
- 25 dos. Esse efeito foi inicialmente descrito no Pedido de Patente PCT, da aqui requerente, publicado como WO 05/030787.

30 Em um aspecto, a presente invenção proporciona uma composição que compreende pelo menos dois compostos oligonucleotídeos anti-sentido, em que cada composto anti-sentido é capaz de infra-regular um gene diferente. Em algumas modalidades deste aspecto, a combinação dos

pelo menos 2 compostos de oligonucleotídeo anti-sentido leva a uma significativa infra-regulação de cada um dos genes que é mais que a capacidade aditiva de cada anti-sentido de infra-regular cada gene individualmente.

Em um aspecto, a presente invenção proporciona uma composição farmacêutica para tratar e/ou prevenir doença associada à cAMP celular reduzida e/ou níveis elevados de pelo menos uma PDE, em que a dita composição compreende um veículo farmaceuticamente aceitável e pelo menos dois compostos de oligonucleotídeo anti-sentido, em que cada oligonucleotídeo é direcionado contra pelo menos uma parte de um gene que codifica um PDE alvo diferente, sendo que cada oligonucleotídeo é capaz de infra-regular o gene alvo contra o qual ele é direcionado, estando cada oligonucleotídeo presente em uma concentração na qual ele exibe menos que 20% de inibição de seu gene de PDE alvo, a combinação exibindo maior que 20% de inibição e pelo menos duplicando a inibição de pelo menos um dos genes alvo e opcionalmente outros genes relacionados.

Como aquele versado na técnica apreciará a combinação de compostos de oligonucleotídeo, de acordo com presente invenção, em concentrações muito baixas, por exemplo, concentrações que exibem uma inibição de pelo menos 20%. A menor concentração em que cada composto de oligonucleotídeos pode ser usado para formar uma combinação de acordo com a presente invenção variará, e esta concentração pode ser aquela na qual 0,5% de inibição é obtida, ou aquela concentração na qual 1% a 5% de inibição são obtidas. A presente invenção proporciona uma composição farmacêutica para tratar e/ou prevenir uma doença associada à cAMP celular reduzida e/ou níveis elevados de pelo menos uma PDE, em que a dita composição compreende um veículo farmaceuticamente aceitável e pelo menos dois oligonucleotídeos anti-sentido em que cada um é capaz de infra-regular um gene alvo diferente, em que pelo menos um dos oligonucleotídeos está presente em uma concentração na qual é, por si só, praticamente ineficaz, por exemplo, uma concentração que exibe menos que 20% de inibição do gene alvo, em que a combinação de oligonucleotídeos exibe mais que 20% de inibição e pelo menos duplica a inibição de pelo menos um dos genes

alvo, e opcionalmente de outros genes relacionados.

A presente invenção proporciona ainda o uso de uma combinação de pelo menos dois compostos de oligonucleotídeo anti-sentido para tratar e/ou prevenir doença associada à cAMP celular reduzida, tal como

5 doença inflamatória respiratória, em que cada composto de oligonucleotídeo é direcionado contra um gene que codifica isótipo de PDE diferente, sendo cada composto de oligonucleotídeo capaz de infra-regular o gene contra o qual ele é direcionado, em que os compostos de oligonucleotídeo anti-sentido estão presentes em uma concentração na qual cada oligonucleotídeo é, por si só, praticamente ineficaz para infra-regular o gene contra o qual

10 ele é direcionado, sendo a combinação dos pelo menos dois compostos de oligonucleotídeo eficazes para infra-regular pelo menos um dos genes contra o qual os compostos de oligonucleotídeo são direcionados e opcionalmente outro genes relacionados.

A presente invenção proporciona ainda um método para tratar e/ou prevenir doença associada à cAMP celular, tal como doença respiratória inflamatória, em que o método compreende administrar a um paciente pelo menos dois compostos de oligonucleotídeo anti-sentido, em que cada um é capaz de infra-regular um gene de PDE alvo diferente, sendo os com-

20 postos de oligonucleotídeo administrados em uma concentração na qual cada composto de oligonucleotídeo é, por si próprio, ineficaz para infra-regular o seu gene alvo, por exemplo, uma concentração que exibe menos que 20% de inibição do gene alvo, em que a combinação dos compostos de oligonucleotídeos é eficaz para infra-regular pelo menos um dos genes contra o qual os compostos de oligonucleotídeos são direcionados e opcionalmente

25 outros genes relacionados.

A presente invenção proporciona ainda o uso de uma composição farmacêutica, conforme descrita acima, na fabricação de um medicamento para tratar e/ou prevenir doença associada à cAMP celular ou níveis de PDE específica de cAMP (doença relacionada à PDE) tais como doença

30 inflamatória e câncer. A doença inflamatória à qual os presentes métodos e composições são direcionados é geralmente definida como doenças nas

quais células e/ou mediadores inflamatórios estão presentes. Exemplos de doenças inflamatórias incluem, mas sem limitação, esclerose múltipla, dermatite de contato, doenças oculares alérgicas e não alérgicas, artrite reumatóide, choque séptico, osteoporose e distúrbios cognitivos. Doença respiratória inflamatória à qual os presentes métodos e composições são direcionados é geralmente definida como doenças do aparelho respiratório e pulmões onde as células e mediadores inflamatórios estão presentes. Exemplos de doença respiratória inflamatória incluem, mas sem limitação, COPD, asma, tosse eosinofílica, bronquite, rejeição aguda e crônica a aloenxerto de pulmão, sarcoidose, fibrose pulmonar, rinite e sinusite.

A presente invenção proporciona ainda o uso de uma composição farmacêutica conforme descrita acima na fabricação de um medicamento para tratar e/ou prevenir doença em que AMP cíclica reduzida está envolvida na fisiopatologia.

A presente invenção proporciona ainda métodos para modificar oligonucleotídeos anti-sentido de modo que possam alcançar o nucleotídeo alvo e/ou ser mais eficazes contra o gene alvo para tratar e/ou prevenir doenças respiratórias inflamatórias.

A presente invenção proporciona ainda uma formulação, que inclui a composição descrita acima, em que a formulação é sistêmica e/ou tópica.

A presente invenção proporciona um método *in vivo* para distribuir uma composição farmacêutica para um polinucleotídeo alvo, que compreende administrar a um paciente a composição conforme descrita acima em combinação com um tensoativo que permite que a composição atinja o(s) gene(s) alvo.

Preferivelmente, os pacientes ou indivíduos que podem ser tratados usando os compostos de oligonucleotídeo anti-sentido da presente invenção incluem, mas sem limitação, invertebrados, vertebrados, pássaros, mamíferos tais como porcos, cabras, carneiros, vacas, cachorros, gatos, e, particularmente, humanos. Os compostos de oligonucleotídeo de acordo com a presente invenção são desenhados para serem apropriados para o

animal particular a ser tratado. Em particular, a sequência dos compostos de oligonucleotídeo anti-sentido variará com o paciente que está sendo tratado por causa das diferenças genômicas entre as espécies.

A presente invenção proporciona ainda oligonucleotídeos anti-sentido eficazes contra, por exemplo, capazes de inibirem a expressão da família de enzimas PDE, incluindo, mas sem limitação, PDE3, PDE4 e PDE7. Como será apreciado por aquele versado na técnica, cada subtipo de PDE pode incluir também isótipos. Por exemplo, o subtipo de PDE3 inclui os isótipos de PDE3A e PDE3B; o subtipo de PDE4 inclui os isótipos PDE4A, PDE4B, PDE4C, e PDE4D; e o subtipo de PDE7 inclui os isótipos PDE7A1, PDE7A2, PDE7A3 e PDE7B.

Quando usado aqui, a frase "concentração na qual o composto de oligonucleotídeo anti-sentido é praticamente ineficaz" refere-se ao uso de cada composto de oligonucleotídeo, quando considerado sozinho, em uma concentração na qual praticamente não é observada infra-regulação para o gene contra o qual o composto de oligonucleotídeo é direcionado (em uma concentração na qual menos que 20% de inibição do gene alvo são exibidos). Isso contrasta com o efeito da combinação de pelo menos dois compostos de oligonucleotídeo de acordo com a presente invenção, cada um presente em uma concentração na qual eles são ineficazes, sozinhos, para infra-regular o gene contra o qual eles são direcionados (em uma concentração na qual menos que 20% de inibição são exibidos), exibindo, esta combinação, mais que 20% de inibição e sendo eficaz para pelo menos duplicar os compostos que são direcionados.

O termo "oligonucleotídeo", como usado aqui, refere-se a uma molécula de ácido nucléico que compreende cerca de 1 a cerca de 100 nucleotídeos, mais preferivelmente, de 1 a 80 nucleotídeos, e ainda mais preferivelmente de cerca de 4 a cerca de 35 nucleotídeos. O termo "oligonucleotídeo" inclui também oligonucleotídeos modificados e compostos de oligonucleotídeos como estabelecido acima.

Os termos "oligonucleotídeo modificado" e "molécula de ácido nucléico modificada", como usado aqui, incluem oligonucleotídeos com uma

ou mais modificações químicas no nível molecular das estruturas moleculares naturais de todas ou quaisquer das bases de ácido nucléico, frações de açúcar, ligações de fosfato de internucleosídeo, bem como moléculas tendo substituintes adicionados, tais como diaminas, colessterila ou outros grupos lipofílicos, ou uma combinação de modificações nestes sítios. As ligações de fosfato de internucleosídeo podem ser fosfodiéster, fosfotriéster, fosforamido, siloxano, carbonato, éster carboximetílico, acetamidato, carbamato, tioéter, fosforanidato em ponte, fosfanato de metileno em ponte, fosforotioato, metilfosfonato, fosforoditioato, fosforotioato em ponte e/ou ligações de sulfona internucleotídeo, ou ligações 3'-3', 2'-5' ou 5'-5', e combinações de tais ligações similares (para produzirem oligonucleotídeos modificados na cadeia principal, mistos). As modificações podem ser internas (simples ou repetidas) ou na(s) extremidade(s) da molécula de oligonucleotídeo e podem incluir adições à molécula das ligações de fosfato de internucleosídeo, tais como colessterila, compostos de diamina com números variáveis de resíduos de carbono entre grupos amino e modificações na ribose terminal, desoxirribose e fosfato, que clivam ou reticulam para as cadeias opostas ou para as enzimas associadas ou para outras proteínas. Grupos hidrofílicos, tal como ribose-dialdeído, podem ser covalentemente ligados a um grupo épsilon-amino do resíduo lisila de tal proteína. Um grupo nucleofílico, tal como n-etilmaleimida limitado a um oligômero poderia se ligar covalentemente à extremidade 5' de um mRNA ou a um outro sítio eletrofílico. O termo "oligonucleotídeos modificados" inclui também oligonucleotídeos compreendendo modificações nas frações açúcar tais como ribonucleotídeos substituídos em 2', ou monômeros de desoxirribonucleotídeos, quaisquer dos quais estão conectados juntos via ligações 5' a 3'. Os oligonucleotídeos modificados podem ser também compreendidos de PNA ou de cadeias principais modificadas com morfolino, onde a especificidade alvo da sequência é mantida.

Opcionalmente, os oligonucleotídeos presentemente descritos podem ser formulados com uma variedade de moléculas de veículos fisiológicos. Os oligonucleotídeos presentemente descritos podem ser também complexados com moléculas que intensificam sua capacidade de entrar nas

células alvo. Exemplos de tais moléculas incluem, mas sem limitação, carboidratos, poliaminas, aminoácidos, peptídeos, lipídios, e moléculas vitais ao crescimento celular. Por exemplo, os oligonucleotídeos podem ser combinados com um lipídio, em que a emulsão de oligonucleotídeo/lipídio, ou suspensão lipossômica pode, entre outros, aumentar eficazmente a meia-vida *in vivo* do oligonucleotídeo.

Alternativamente, os oligonucleotídeos direcionados aos alvos de PDE podem ser também protonados/acidificados para funcionarem em uma função dual como inibidores de fosfodiesterase e agentes antibacterianos. Por conseguinte, uma outra modalidade da invenção presentemente descrita é o uso de um oligonucleotídeo terapêutico que modula PDE que é adicionalmente protonado/acidificado para aumentar a absorção, aperfeiçoar o encapsulamento em lipossomos, de modo que ele pode servir também como um antibiótico. Adicionalmente, o oligonucleotídeo pode ser complexo-

10 do com uma variedade de compostos bem estabelecidos ou estruturas que, por exemplo, ainda intensifica a estabilidade *in vivo* do oligonucleotídeo, ou de outro modo intensificam suas propriedades farmacológicas (por exemplo, aumentam a meia-vida *in vivo*, reduzem a toxicidade, etc.).

O termo "cadeia principal de ácido nucléico", como usado aqui,

20 refere-se à estrutura dos nucleotídeos que se ligam à fração química em uma molécula. Isso pode incluir estruturas formadas de quaisquer e todos os meios de nucleotídeos que se ligam quimicamente. Uma cadeia principal modificada, como usada aqui, inclui modificações na ligação química entre os nucleotídeos, bem como outras modificações que podem ser usadas para

25 intensificar a estabilidade e a afinidade, tais como modificações para a estrutura de açúcar. Por exemplo, um [alfa]-anômero de desoxirribose pode ser usado, onde a base é invertida com respeito ao [beta]-anômero natural. Em uma modalidade preferida, o 2'-OH do grupo açúcar pode ser alterado para 2'-O-alquila ou 2'-O-alquil-n(O-alquila), que proporciona resistência à degradação sem comprometer a afinidade.

30

Os termos "acidificação" e "protonação/acidificação", como usados aqui, se referem ao processo pelo qual prótons (ou íons hidrogênio posi-

tivos) são adicionados aos sítios receptores de prótons em um ácido nucléi-
co. Os sítios receptores de prótons incluem os grupos amina nas estruturas
de base do ácido nucléico e o fosfato das ligações de fosfodiéster. Conforme
o pH diminui, o número desses sítios receptores, que são protonados, au-
5 menta, resultando em um ácido nucléico mais altamente protona-
do/acidificado.

O termo "ácido nucléico protonado/acidificado" refere-se a um
ácido nucléico que, quando dissolvido em água a uma concentração de a-
proximadamente 16 A260 por mL, tem um pH inferior ao pH fisiológico, isto
10 é, menor que aproximadamente pH 7. Ácidos nucléicos modificados, ácidos
nucléicos resistentes à nuclease, e ácidos nucléicos anti-sentido devem ser
entendidos como estando englobados nesta definição. Geralmente, ácidos
nucléicos são protonados/acidificados por adição de prótons aos sítios reati-
vos sobre um ácido nucléico, embora outras modificações que reduzirão o
15 pH do ácido nucléico podem ser também usadas e é pretendido aqui que
elas estejam incluídas neste termo.

O termo "bloqueado na extremidade", como usado aqui, refere-
se a um ácido nucléico com uma modificação química no nível molecular
que previne a degradação dos nucleotídeos selecionados, por exemplo, por
20 ação da nuclease. Essa modificação química é posicionada de modo que ela
proteja a parte integral do ácido nucléico, por exemplo, a região de codifica-
ção de um oligonucleotídeo anti-sentido. Um bloco de extremidade pode ser
um bloco de extremidade 3' ou um bloco de extremidade 5'. Por exemplo, o
bloco de extremidade 3' pode estar na posição máxima de 3' da molécula,
25 ou pode estar interna às extremidades 3', com a condição que ela seja 3'
das sequências integrais do ácido nucléico.

O termo "substancialmente resistente à nuclease" refere-se aos
ácidos nucléicos que são resistentes à degradação por nuclease, em compa-
ração com ácidos nucléicos naturais ou não modificados. Os ácidos nucléi-
cos modificados da invenção são pelo menos 1,25 vezes mais resistentes à
30 degradação por nuclease, ainda mais preferivelmente pelo menos 5 vezes
mais resistentes, e de maior preferência pelo menos 10 vezes mais resisten-

tes que seu equivalente não modificado. Tais ácidos nucléicos substancialmente resistentes à degradação por nuclease incluem, mas sem limitação, ácidos nucléicos com cadeias principais modificadas tais como fosforotios, metilfosfonatos, etilfosfotriésteres, 2'-O-metilfosforotioatos, 2'-O-metil-p-
 5 etóxi ribonucleotídeos, 2'-O-alquilas, 2'-O-alquil-n(O-alquila), 3'-O-alquilas, 3'-O-alquil-n(O-alquilas), 2'-flúor, 2'-desóxi-eritropentofuranosilas, 2'-O-metil ribonucleosídeos, carbamatos de metila, carbonatos de metila, bases invertidas (por exemplo, T's invertidos), ou versões quiméricas dessas cadeias laterais.

10 O termo "substancialmente resistente a ácido", como usado aqui, refere-se a ácidos nucléicos que são resistentes à degradação com ácido em comparação com os ácidos nucléicos não modificados. Tipicamente, a resistência a ácido relativa de um ácido nucléico será medida comparando-se a degradação percentual de um ácido nucléico resistente com a degradação percentual de seu equivalente não modificado (isto é, um ácido nucléico
 15 correspondente com cadeia principal "normal", bases, e ligações de fosfodiéster). Um ácido nucléico que é resistente a ácido é preferivelmente pelo menos 1,5 vezes mais resistente à degradação por ácido, pelo menos 2 vezes mais resistente, ainda mais preferivelmente, pelo menos 5 vezes mais resistente, e de maior preferência pelo menos 10 vezes mais resistente que
 20 seu equivalente não modificado.

Os termos "oligonucleotídeo de PDE3A, PDE3B, PDE4A, PDE4B, PDE4C, PDE4D, PDE7A, PDE7B", como usados aqui, se referem, cada um, a um oligonucleotídeo que é alvejado, respectivamente, para as
 25 sequências que afetam a expressão ou a atividade de PDE3A, PDE3B, PDE4A, PDE4B, PDE4C, PDE4D, PDE7A, PDE7B. Essas incluem, mas sem limitação, sequências de codificação de DNA de PDE3A, PDE3B, PDE4A, PDE4B, PDE4C, PDE4D, PDE7A, PDE7B; sequências de promotores de DNA de PDE3A, PDE3B, PDE4A, PDE4B, PDE4C, PDE4D, PDE7A, PDE7B; sequências de intensificadores de DNA de PDE3A, PDE3B, PDE4A, PDE4B, PDE4C, PDE4D, PDE7A, PDE7B, mRNA codifica com PDE3A, PDE3B, PDE4A, PDE4B, PDE4C, PDE4D, PDE7A, PDE7B, e similares
 30

Como discutido acima, uma modalidade da presente invenção proporciona oligonucleotídeos anti-sentido alvejados para sequências que afetam a expressão ou a atividade de PDE3A, PDE3B, PDE4A, PDE4B, PDE4D, PDE7A. Em uma modalidade, os oligonucleotídeos anti-sentido podem ter uma das sequências identificadas nas Tabelas 1a-d ou Tabelas 2a-g. Em uma outra modalidade, o oligonucleotídeo anti-sentido pode compreender fragmentos ou variantes dessas sequências, como será entendido por aquele versado na técnica, que podem alterar a formação e/ou comprimento do oligonucleotídeo, mas que mantêm ou aumentam a atividade do oligonucleotídeo para infra-regular a expressão de gene. Em uma outra modalidade, a presente invenção proporciona combinações de pelo menos dois oligonucleotídeos anti-sentido que têm as sequências identificadas nas Tabelas 1a-d ou Tabelas 2a-g.

A comparação da eficácia de um oligonucleotídeo simples está ilustrada, mas sem limitação, na figura 1a, figura 1b e figura 5. Por exemplo, na figura 1a, TOP 1512 (SEQ ID N°:91), que é direcionado contra as PDE4A e PDE4B humanas, inibe ambos estes alvos *in vitro*. Similarmente, a figura 1b mostra TOP 1545 (SEQ ID N°:14) e TOP 1556 (SEQ ID N°:24), que reconhecem as sequências compartilhadas por PDE4B e PDE4D, demonstram a inibição de ambas as sequências alvo. TOP 1507 (SEQ ID N°:10) e TOP 1508 (SEQ ID N°:11), que reconhecem as sequências compartilhadas por PDE4A e PDE4D funcionam para inibirem ambos os genes alvo.

A comparação de eficácia das combinações de pelo menos 2 compostos de oligonucleotídeo é ilustrada, mas sem limitação, nas figuras 6a e 12. Por exemplo, na figura 6 a combinação de TOP 1545-F3 (SEQ ID N°:85) e TOP-1731-F2 (SEQ ID N°:53) mostram um efeito maior na expressão decrescente de PDE4B, PDE4D e PDE7A que o mostrado por qualquer um dos oligonucleotídeo em seus alvos respectivos, quando usados sozinhos. Na figura 6b a combinação de TOP-1545-F3 (SEQ ID N°:85) e TOP-1731-F2 (SEQ ID N°:53) mostram um efeito maior da inibição de secreção de IL-2 que quando usados sozinhos.

Muitas combinações de compostos de oligonucleotídeo anti-

sentido podem ser usadas de acordo com a presente invenção, em que a combinações levam ao nocaute de genes múltiplos conforme descrição acima. Exemplos de combinações de oligonucleotídeos anti-sentido podem incluir, mas sem limitação, pelo menos um composto de oligonucleotídeo dire-
5 cionado contra PDE3 com pelo menos um composto de oligonucleotídeo direcionado contra PDE7. Um exemplo alternativo de uma combinação pode incluir pelo menos um oligonucleotídeo direcionado contra PDE4 e pelo me-
nos um oligonucleotídeo direcionado contra PDE7. Um exemplo alternativo de uma combinação pode incluir pelo menos um oligonucleotídeo direciona-
10 do contra PDE3, pelo menos um oligonucleotídeo direcionado contra PDE4 e pelo menos um oligonucleotídeo direcionado contra PDE7. Tais compostos de oligonucleotídeo anti-sentido podem ser selecionados de, mas sem limi-
tação, os oligonucleotídeos fornecidos nas Tabelas 1a-d e nas Tabelas 2a-2g.

15 Os termos "tratamento", "tratar", "terapia" e similares são usados aqui geralmente com o significado de obter um efeito farmacológico e/ou fisiológico. O efeito pode ser profilático em termos de prevenir completa ou parcialmente uma doença ou sintoma e/ou pode ser terapêutico em termos de uma cura parcial ou completa de uma doença e/ou atenuação de um efei-
20 to adverso atribuível à doença. "Tratamento" como usado aqui engloba qualquer tratamento de uma doença em um paciente conforme previamente definido, particularmente um humano, e inclui:

- (a) prevenir que uma doença ocorra em um paciente que pode estar predisposto à doença, mas ainda não foi diagnosticado como tendo a mesma;
- 25 (b) inibir uma doença, isto é, impedir o seu desenvolvimento; ou
- (c) aliviar uma doença, isto é, fazer com que a doença regreda.

O termo "farmaceuticamente aceitável", como usado aqui com
30 respeito a veículos, tensoativos e composições, refere-se a substâncias que são aceitáveis para uso no tratamento de um paciente, que são atóxicas ou de outro modo aceitáveis para administração por quaisquer das vias aqui

descritas.

A invenção é geralmente direcionada ao tratamento de pacientes pela administração de quantidades terapeuticamente eficazes de compostos de oligonucleotídeo anti-sentido de acordo com a presente invenção, incluindo
 5 do siRNA, ribozima, sequências de nucleotídeos curtas como de fita simples ou dupla incluindo RNA e/ou DNA que podem ser complementares a um ácido nucléico alvo, ou podem ser opcionalmente modificadas conforme descrição acima, um oligonucleotídeo de RNA tendo uma parte do dito oligonucleotídeo de RNA capaz de hibridizar com RNA para formar um duplex de
 10 oligonucleotídeo-RNA, ou um oligonucleotídeo quimérico, que infra-regulará ou inibirá a expressão de um gene endógeno *in vivo*.

Por quantidade "terapeuticamente eficaz" deve-se entender uma quantidade atóxica, mas suficiente, de um composto de oligonucleotídeo anti-sentido para proporcionar o efeito terapêutico desejado. No presente
 15 caso, aquela dose do composto de oligonucleotídeo anti-sentido eficaz para aliviar, atenuar, ou prevenir os sintomas da condição ou da doença que está sendo tratada, por exemplo, doença associada à cAMP celular reduzida, doença relacionada à PDE, doença inflamatória tal como doença respiratória inflamatória.

20 As composições farmacêuticas proporcionadas aqui compreendem compostos de oligonucleotídeo anti-sentido, conforme descrição acima, e um ou mais tensoativos farmacêuticamente aceitáveis. Tensoativos e componentes de tensoativo adequados para intensificar a absorção dos oligonucleotídeos da invenção foram previamente descritos na Publicação de
 25 Pedido de Patente US 2003/0087845, cujo conteúdo é aqui incorporado com respeito aos tensoativos. Esse pedido estabelece que tensoativos adequados "... incluem formas sintéticas ou naturais bem como inteiras e truncadas de tensoativo proteína A, tensoativo proteína B, tensoativo proteína C, tensoativo proteína D e tensoativo proteína E, fosfatidilcolina dissaturada (diferente de dipalmitoila), dipalmitoilfosfatidilcolina, fosfatidilcolina, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina; ácido fosfatídico,
 30 ubiquinonas, lisofosfatidiletanolamina, lisofosfatidilcolina, palmitoil-lisofosfati-

dilcolina, desidroepiandrosterona, dolicois, ácido sulfatídico, glicerol-3-fosfato, fosfato de diidroxiacetona, glicerol, glicero-3-fosfocolina, disidroxiaacetona, palmitato, citidina difosfato (CDP) diacilglicerol, CDP colina, colina, fosfato de colina; bem como corpos lamelares naturais e artificiais, que são os veículos carreadores naturais para os componentes de tensoativo, ácidos graxos ômega-3, ácido poliênico, ácido polienóico, lecitina, ácido palmitínico, copolímeros em bloco não iônicos de óxidos de etileno ou de propileno, polioxipropileno, monomérico e polimérico, polioxietileno, monomérico e polimérico, poli(vinil amina) com dextrana, e/ou cadeias laterais de alcanoíla, Brij 35, Triton X-100 e tensoativos sintéticos ALEC, Exosurf, Survan e Atovaquona, entre outros. Esses tensoativos podem ser usados como o único ou parte de um tensoativo de componentes múltiplos em uma formulação, ou adições covalentemente ligadas às extremidades 5' e/ou 3' dos oligonucleotídeos anti-sentido (oligos)."

O componente anti-sentido das presentes composições, que inclui a combinação de pelo menos dois compostos de oligonucleotídeos, pode estar contido em uma composição farmacêutica dentro de uma partícula ou vesícula lipídica, tal como lipossomo ou microcristal. Conforme descrição na Patente US 6.025.339, as partículas lipídicas podem ser de qualquer estrutura adequada, tal como unilamelar ou plurilamelar, desde que o oligonucleotídeo anti-sentido esteja contido aí. Lipídios carregados positivamente carregados tal como metilsulfato de N-[1-(2,3-dioleoilóxi)propil]-N,N,N-timetilamônio, ou "DOTAP", são particularmente preferidos para tais partículas e vesículas. A preparação de tais partículas de lipídios é bem conhecida. Vide, por exemplo, as Patentes US 4.880.635 de Janoff e et al.; US 4.906.477 de Kurono et al.; US 4.911.928 de Wallach; US 4.917.951 de Wallach; US 4.920.016 de Allen et al.; US 4.921.757 de Wheatley et al.; etc.

A composição da invenção pode ser administrada por qualquer meio que transporte o composto de oligonucleotídeo anti-sentido para o sítio desejado, tal como o pulmão. Os compostos anti-sentido descritos aqui podem ser administrados aos pulmões de um paciente por qualquer meio adequado, mas são preferivelmente administrados por inalação de um aerosol

compreendido de partículas respiráveis que compreendem o composto anti-sentido.

A composição da presente invenção pode ser administrada ao sistema respiratório como uma formulação que inclui partículas de tamanho respirável, por exemplo, partículas de um tamanho suficientemente pequeno para passarem através do nariz, boca e laringe mediante inalação e através dos brônquios e alvéolos dos pulmões. Em geral, as partículas respiráveis variam de cerca de 0,5 a 10 microns de tamanho. Partículas de tamanho não respirável que são incluídas no aerosol tendem a se depositar na garganta e serem engolidas, e a quantidade de partículas não respiráveis no aerosol é preferivelmente assim minimizada. Para administração nasal, um tamanho de partícula na faixa de 10-500 μm é preferido para assegurar a retenção na cavidade nasal.

Composições farmacêuticas líquidas do composto ativo o(s) composto(s) de oligonucleotídeo anti-sentido para produção de um aerosol podem ser preparadas por combinação do composto anti-sentido com um veículo adequado, tal como água estéril isenta de pirogênio ou solução salina tamponada com fosfato.

Uma composição sólida particulada, que compreende o composto anti-sentido pode conter opcionalmente um dispersante que serve para facilitar a formação de um aerosol, bem como de outros compostos terapêuticos. Um dispersante adequado é a lactose, que pode ser misturada com o composto anti-sentido em uma razão adequada, por exemplo, uma razão de 1 a 1 em peso.

As composições anti-sentido podem ser administradas em uma quantidade eficaz anti-broncoconstrição, anti-alergia(s) e/ou antiinflamatória, cuja quantidade depende do grau da doença que está sendo tratada, da condição do paciente, da formulação particular, da via de administração, do tempo de administração ao paciente, etc. Em geral, as concentrações intracelulares do oligonucleotídeo de 0,05 a 50 μM , ou mais particularmente 0,2 a 5 μM , são desejáveis. Para administração a um paciente mamífero tal como o homem, a dosagem de cerca de 0,001, 0,01, 0,1, ou 1 mg/kg até cerca de

50, ou 100 mg/kg ou mais é tipicamente empregada. Contudo, outras doses são também contempladas. Dependendo da solubilidade do composto ativo em qualquer formulação particular, a dose diária pode ser dividida entre uma ou várias administrações da dose unitária.

5 Os aerossóis de partículas líquidas que compreendem o composto anti-sentido podem ser produzidos por quaisquer meios adequados, tal como um nebulizador. Nebulizadores são dispositivos comercialmente disponíveis que transformam soluções ou suspensões do ingrediente ativo em uma névoa terapêutica de aerosol por meio da aceleração de um gás comprimido, tipicamente oxigênio ou ar, através de um orifício para tipo venturi
10 ou por meio de agitação ultra-sônica. Formulações adequadas para uso em nebulizadores compreendem o ingrediente ativo de oligonucleotídeo anti-sentido em um veículo líquido em uma quantidade de até 40% p/p, preferivelmente menos que 20% p/p da formulação. O veículo é tipicamente água
15 ou solução alcoólica aquosa diluída, preferivelmente tornada isotônica com fluidos corpóreos pela adição de, por exemplo, cloreto de sódio. Aditivos opcionais incluem conservantes se a formulação não é preparada estéril, por exemplo, hidroxibenzoato de metila, antioxidantes, antibacterianos, flavorizantes, óleos voláteis, agentes tampão e emulsificantes e outros tensoativos
20 de formulação.

Os aerossóis de partículas sólidas compreendendo o(s) composto(s) ativo(s) de oligonucleotídeo e um tensoativo farmacologicamente aceitável podem ser igualmente produzidos com qualquer gerador de aerosol de medicamento, particulado, sólido. Gerador de aerosol para administrar medicamentos particulados sólidos a um paciente produz partículas que são respiráveis, conforme explicação acima, e geram um volume de aerosol que contém uma dose medida predeterminada de um medicamento, em uma taxa adequada para administração a humanos. O ingrediente ativo de oligonucleotídeo compreende tipicamente de 0,1 a 100 p/p da formulação. Um
25 segundo tipo de gerador de aerosol ilustrativo compreende um inalador com dosador. Os inaladores com dosadores são dispensadores de aerosol pressurizados, contendo tipicamente uma formulação em suspensão ou solução
30

do ingrediente ativo em um propelente líquido. Durante o uso, esses dispositivos descarregam a formulação através de uma válvula adaptada para distribuir um volume dosado, tipicamente de 10 a 150 μ l, para produzir uma aspersão de partículas finas contendo o ingrediente ativo. Os propelentes adequados incluem certos compostos de clorofluorcarbonetos, por exemplo, diclorodifluormetano, triclorofluormetano, diclorotetrafluoretano ou hidrofluoralcenos e misturas destes. A formulação pode conter adicionalmente um ou mais co-solventes, por exemplo, etanol, emulsificantes e outros tensoativos de formulação, tal como ácido oléico ou trioleato de sorbitano, antioxidantes e agentes flavorizantes adequados. O aerosol, se formado de partículas sólidas ou líquidas, pode ser produzido pelo gerador de aerosol em uma taxa de cerca de 1 a 150 litros por minuto.

As formulações da presente invenção podem ser formulações orais, intrabucais, intrapulmonares, retais, intrauterinas, intratumorais, intracranianas, nasais, intramusculares, subcutâneas, intratecais, inaláveis, transdérmicas, intradérmicas, intracavitárias, implantáveis, iontoforéticas, oculares, vaginais, intraarticulares, óticas, intravenosas, intramusculares, intraglandulares, interórgão, intralinfáticas, de liberação lenta ou de revestimento entérico. Os veículos usados nas formulações podem ser, por exemplo, veículos sólidos e/ou líquidos.

Referência pode ser feita a "Remington's Pharmaceutical Sciences", 17ª Edição, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, para outros veículos que seriam adequados para combinação com os seguintes compostos de oligonucleotídeos presentes para renderem composições/formulações que são adequados para administração para tratar doença respiratória.

Em um outro aspecto da presente invenção, um artigo de fabricação é proporcionado, o qual inclui embalar o material contido dentro dele, que é uma composição de oligonucleotídeo anti-sentido, farmacologicamente aceitável, que é terapeuticamente eficaz para tratar condições associadas à cAMP celular reduzida, ou aos altos níveis de PDE, incluindo doença inflamatória. Em uma modalidade, a composição compreende um composto de oligonucleotídeo anti-sentido que é eficaz para inibir um gene de PDE, em

que o dito composto de oligonucleotídeo é pelo menos 50% complementar ao gene. Em um outro aspecto, a composição compreende pelo menos 2 compostos de oligonucleotídeo anti-sentido, em que cada composto de oligonucleotídeo anti-sentido é capaz de infra-regular um gene de PDE diferente, estando o composto de oligonucleotídeo anti-sentido em uma concentração na qual o composto de oligonucleotídeo anti-sentido é, por si mesmo, ineficaz para infra-regular o gene contra para o qual ele é direcionado, em que a combinação dos compostos de oligonucleotídeo anti-sentido são eficazes para infra-regular pelo menos um dos genes contra o qual os oligonucleotídeos anti-sentidos são direcionados.

Em uma modalidade, o material de embalagem do artigo compreende uma etiqueta que indica que a composição pode ser usada para tratar doença inflamatória e pode incluir adicionalmente uma indicação de que a doença é uma de esclerose múltipla, dermatite de contato, doenças oculares alérgicas e não alérgicas, artrite reumatóide, choque séptico, osteoporose e distúrbios cognitivos.

Em uma outra modalidade, o material de embalagem do artigo compreende uma etiqueta que indica que a composição pode ser usada para tratar doença respiratória inflamatória, e pode incluir adicionalmente uma indicação de que a doença é uma de COPD, asma, tosse eosinofílica, bronquite, rejeição aguda e crônica de aloenxerto no pulmão, sarcoidose, fibrose pulmonar, rinite ou sinusite.

Para os propósitos da presente invenção, o material de embalagem pode ser qualquer material adequado para embalar uma composição que contém nucleotídeos de acordo com a presente invenção, incluindo garrafa ou qualquer outro recipiente, (de plástico ou de vidro), uma caixa, um tubo, ou outro tipo de envoltório protetor. Como será apreciado, a embalagem pode variar com a natureza da composição de oligonucleotídeo, por exemplo, uma formulação líquida pode ser embalada de modo diferente de uma formulação de aerosol.

A presente invenção é ainda ilustrada em mais detalhes pelos seguintes exemplos não limitativos.

EXEMPLOS

Materiais e Reagentes

Meios AIM-V (Invitrogen, Cat#31035-025); Opti MEM I (Invitrogen, cat#31985-07, lote #1244206); FBS (Soro Bovino Fetal, Wisent, cat# 80150); Penicilina, Estreptomicina (GIBCO, cat# 15140-122); HEPES (Wisent, cat# 26060CI) e L-glutamina (Gibco, cat# 25030-081); DMEM/F12 (Wisent, cat# 10090CV); Piruvato de Sódio (Wisent, cat# 25000-Ci); PBS Estéril (GIBCO, cat# 25030-081); Tripsina a 0,25% e EDTA a 0,01% (Wisent, cat# 25-052-Ci); HBSS (solução salina balanceada de Hank, Wisent, Cat# 21-022CV); PHA (Fitoemaglutinina, Sigma, cat#L-9132, lot#: 015K88913); Ficoll paque (Amersham, Cat# 17-1440-03); Trizol (Invitrogen, cat#15596-018); Dnase I (Fermentas, cat#EN0521); Sistema de Síntese de Primeira Fita SuperScript para kit RT- PCR (Invitrogen, cat#11904-018); dNTPs (Invitrogen, cat# 10297-018); oligo (dT)₁₂₋₁₈ (Invitrogen, cat#11904-018); Minikit Qiagen RNAeasy (Qiagen, Cat#74106); Tubulação QiaVac 2 (Qiagen, Cat#19403); Vasoconectores Descartáveis (Qiagen, Cat#19407); Reagente de Quantificação RiboGreen (Invitrogen-Molecular Probes, Cat # R-11490); Instrumento de Ciclador de Luz da Roche versão 1.5 (Roche, Cat# 3531414); Capilares LC para reações de 20ml (Roche, cat# 1909339); LC FastStart DNA Master SYBR Green 1 PLUS (100ml) (Roche, Cat# 03752186001); tubos K3EDTA(Greiner Bio-one, cat#: 455036B1 10306); Kit para EIA de AMP cíclica (Cayman, cat.# 581001) Kit ELISA para TNF- α humano, (BioSource Cat#CHC-1754, lot# 041703); Kit Elisa para IL-8 humana/CXCL8 ELISA (Biosource, cat# CHC1303); Kit ELISA para MCP-1 humana/CCL2 (Biosource, cat# KHC1012); kit para cAMP (Cayman, cat# 581001); ELISA para GMCSF humano (Medicorp, cat#CHC0904); ELISA para IL-2 humana (BD Biosciences, cat#555190); leitora de placa de ELISA (filtro de 450 nm, filtro de referência de 650 nm, Biorad, model680); agente de transfecção Escort IV (Sigma-Aldrich, cat#3287, lote#094K0565); hIL-1 β (Peprotech, cat.#11195D195); Forskolin (Sigma-Aldrich cat#F3917); Rolipram (Sigma-Aldrich Cat # R6520, lot # 022K4604); AlamarBlue, (Biosource cat#DAL1100); ligação alta de placa de 12 poços (Costar, cat #665 102); reagente cromógeno TMB para ELI-

SA (MediCorp, cat # SB01); reagente de transfecção Lipofectamine® 2000 (Invitrogen, cat#1 1668-019); Kit de Seleção Quantigene® (Panomics, cat# QG- 000-050); 20XSSC (NaCl 3M, diidrato de citrato de sódio 0,3M, pH 7,0); Dodecil sulfato de lítio a 10% p/v (Sigma, cat# L9781); Incubadora ajustada a 53°C, 0% CO₂; Lavadora de Placas MW96 (Beckman Coulter); Thermo Luminoskan (LabSystem); EMEM (HyClone, cat#SH30024.01); aminoácidos não essenciais (HyClone, cat#30238.01); BEBM (Clonetics, cat#CC-3171); kit BEBM (Clonetics, cat#3170); TNF- α humano (Peprotech, cat.#300-01A); IFN γ (Peprotech, cat#315-05).

10 Cultura de Células

Células 293 (linhagem de célula embrionária de rim, transformada, humana; ATCCcat#: CRL-1573) foram cultivadas em DMEM contendo L-glutamina 2mM, aminoácidos não essenciais 0,1mM, 1,5 g/L de bicarbonato de sódio, piruvato de sódio 1mM, FBS a 10%, penicilina 100 U/mL e estreptomicina 100 μ g/mL. A549 (linhas de célula de carcinoma do pulmão humano; ATCC) foram cultivados em meios Ham-F12 contendo L-glutamina 2mM; 1,5 g/L de bicarbonato de sódio; FBS a 10%, Penicilina 100 U/mL, Estreptomicina 100 μ g/mL. Células mononucleares, sangüíneas periféricas, humanas (PBMC) (células mononucleares, sangüíneas, periféricas) foram obtidas de voluntários saudáveis. PBMC foram isoladas por centrifugação com gradiente de densidade Ficoll-Hypaque em 2x10⁶ células/mL/poço em placas de 12 poços em meios de cultura AIM-C suplementados com Penicilina 100 U/mL, Estreptomicina 100 μ g/mL. Células CYNOM-K1 foram cultivadas em EMEM contendo L-glutamina 2mM, aminoácidos não essenciais a 1%, FBS a 10%, penicilina 100 U/mL e estreptomicina 100 μ g. Células NHBE foram cultivadas em BEBM (500 mL suplementados com BPE, 2 mL; Hidrocortisona, 0,5 mL; hEGF, 0,5 mL; Epinefrina, 0,5 mL; Transferrina, 0,5 mL; Insulina, 0,5 mL; Ácido retinóico, 0,5 mL; Triiodotironina, 0,05 mL).

Viabilidade das Células

30 A viabilidade das células foi ensaiada sistematicamente usando o Teste de AlamarBlue, seguindo as instruções do fabricante.

Preparação de Anti-Sentido

Anti-sentidos de fosforotioato-DNA (Sigma Gensoys) e anti-sentidos de fosfotiorato-FANA (Topigen, Montreal ou UCDN, Calgary) foram re-suspensos em água estéril e diluídos em Opti-MEM para transfecção. Referências a oligonucleotídeos de DNA (não FANA) nos exemplos são oligonucleotídeos de fosforotioato-DNA.

Tratamento com Anti-Sentido de Células:

Linhagem de célula A549:

As células foram tripnizadas e re-suspensas em meio HAM-F12 ($0,5 \times 10^5$ células/poço em placas de 48 poços) suplementado com soro a 10% em condições privadas de antibiótico, então incubadas durante a noite a 37°C. No dia seguinte, as células aderentes foram transfectadas com complexos de anti-sentido/Lipofectamina (razão de 1 µg de oligonucleotídeo: 1 µL de Lipofectamina) nas concentrações indicadas na descrição das figuras, e incubadas a 37°C por um determinado período de tempo.

Linhagem de célula 293

As células foram tripsinizadas e re-suspensas (1×10^5 células/poço em placas de 48 poços) em meio de DMEM suplementado com soro a 10% em condições privadas de antibiótico, então incubadas durante a noite a 37°C. No dia seguinte, as células aderentes foram transfectadas com complexos de anti-sentido/Lipofectamina (razão de 1 µg de oligonucleotídeo: 1 µL de Lipofectamina) nas concentrações indicadas nas legendas das figuras e incubadas a 37°C, por um determinado período de tempo.

PBMC

No dia do isolamento, as PBMCs foram plaqueadas ($2,0 \times 10^6$ /mL em placas de 12 poços) em meios AIM-V. Os anti-sentidos foram complexados com o reagente Escort IV (Sigma) (razão de 1 µg de oligonucleotídeo: 0,5 µL de Escort IV) e foram adicionados nas concentrações indicadas nas figuras. As células foram cultivadas por 18 a 24 horas, a 37°C, CO₂ a 5%, umidade.

Linhagem de célula CYNOM-K1

As células foram tripnizadas em condições privadas de antibiótico e re-suspensas em meio EMEM suplementado com soro a 10% em condi-

- ções privadas de antibiótico ($0,5 \times 10^5$ células/poço em 200 μ L em placas de 48 poços) e então incubadas durante a noite, a 37°C. No dia seguinte, as células aderentes foram transferidas com complexos de anti-sentido/Lipofectamina 2000 (razão de 1 μ g de oligonucleotídeo: 2 μ L de Lipofectamina) nas concentrações indicadas nas descrições das figuras e incubadas a 37°C por um determinado período de tempo.

Células NHBE

- As células foram tripsinizadas e re-suspensas em meio completo de BEMB em condições privadas de antibiótico (1×10^5 células/poço em 200 μ L em placas de 48 poços) e então incubadas durante a noite a 37°C. No dia seguinte, as células aderentes foram transferidas com complexos de anti-sentido/Lipofectamina 2000 (razão de 1 μ g de oligonucleotídeo: 1 μ L de Lipofectamina) nas concentrações indicadas nas descrições das figuras e incubadas a 37°C por um determinado período de tempo.

15 Extração de RNA

- RNA foi extraído dos precipitados das células de acordo com o protocolo de minikit RNAeasy usando a tubulação QiaVac 24 da Qiagen e tratado com DNase-I de acordo com o procedimento Fermentas. O RNA foi quantificado usando o reagente RiboGreen de acordo com o protocolo do fabricante (Invitrogen-Molecular Probes).

Transcrição Reversa (RT)

- A preparação do cDNA de primeira fita foi realizada usando-se o Sistema de Síntese da Primeira Fita SuperScript para o kit RT-PCR, em um volume de reação total de 20 μ L. Um micrograma de RNA foi primeiramente desnaturado a 65°C, por 5 minutos, com 0,5mM de cada um de dNTPs, 0,5 μ g de oligo (dT)₁₂₋₁₈ e resfriado em gelo por pelo menos 1 minuto. A mistura foi incubada a 42°C, por 2 minutos, e uma segunda pré-mistura contendo 1X de Tampão de Primeira Fita, DTT 10mM, e 40 unidades de SuperScript II RT foi adicionada. As reações foram incubadas a 42°C, por 10 minutos, a 50°C, por 1 hora, e desativadas por aquecimento a 70°C, por 15 minutos.

PCR em tempo real

As misturas reacionais para PCR foram realizadas com 3 μ L de

reação de cDNA em um volume total de 20 µL em presença de 0,4mM de cada iniciador de PCR e 4 µL de LC FastStart DNA Master SYBR Green 1 PLUS. Etapa 1 (Desnaturação): 95°C, 10 minutos (inclinação 20°C/s); Etapa 2 (Ciclos x 40): 95°C, (inclinação 20°C/s); 57°C ou 59°C, 5 segundos, (inclinação 20°C/s) 72°C, 10 segundos (inclinação 20°C/s); Etapa 3 (Curva de fusão): 95°C, (inclinação 20°C/s); 70°C, 30 segundos (inclinação 20°C/s); 95°C, 0 segundo, (inclinação 0,1°C/s); Etapa 4 (Resfriar): 40°C, 30 segundos (inclinação 20°C/s). As sequências de iniciadores de PCR usadas para cada gene estão descritas na Tabela 3. A quantificação de produtos da PCR foi realizada usando o programa RelQuant(Roche).

Ensaio de Quantigene

As células foram colhidas e lisadas por 30 minutos a 53°C em 1X da mistura de lise do kit Quantigen®. Os lisados de células foram hibridizados durante a noite a 53°C em placas de captura Quantigene® na presença de conjuntos de sondas específicas e a expressão de mRNA foi quantificada linearmente usando sinal de luminescência Luminoskan.

Ensaio Celulares: (ELISAs, EIA)

Células 549

No final do período de transfecção, as células A549 foram incubadas por 4 horas com IL-1β, MCP-1 humano e GM-CSF humano. Os sobrenadantes foram colhidos e analisados usando ELISA quanto a IL-8, MPC-1 humana e GM-CSF humano.

PBMSC

Depois da transfecção, PHA (10 µg/mL) foi adicionada às células por 6 horas. Algumas células receberam tratamento com Rolipram (10 µg/mL) ou Forskolin (2µM) por 30 minutos antes da colheita das células. Os sobrenadantes foram coletados e congelados até o momento de realizar ELISA para IL-2 e TNF-α, seguindo as diretrizes do fabricante. A determinação dos níveis de cAMP intracelular foi realizada em precipitados de células que foram lisados e os lisados foram congelados até o momento de realização EIA para cAMP, de acordo com os protocolos do fabricante.

Células NHBE:

A células NHBE foram estimuladas por 4 horas com citomix (500 U/mL de TNF- α + 10 ng/mL de IL1- β + 10 ng/mL de IFN γ) no final do período de transfecção. A secreção da proteína MCP-1 foi medida no sobrenadante por ELISA, com normalização para a viabilidade celular conforme medida por ensaio AlamarBlue.

Exemplo 1: Composição do Anti-sentido e Potência *in vitro*

A sequência e a composição dos oligonucleotídeos anti-sentido preparadas neste estudo estão mostradas nas Tabelas 1a, 1b, 1c e 1d. Todos os oligonucleotídeos foram purificados por HPLC de troca iônica ou eletroforese em gel e dessalinizados via cromatografia de exclusão de tamanho usando contas de Sephadex G-25. As potências de algumas sequências selecionadas e listadas na Tabelas 1a-1d estão demonstradas nas figuras 1a e 1b, que mostram a redução de expressão do gene das isoformas de PDE específicas em células seguinte à transfecção com o AON indicado. A figura 1A mostra que linhagens de células, células A549 para PDE3A, PDE3B e PDE7A ou célula 293 para PDE4A, PDE4B e PDE4D tinham níveis decrescidos de isoformas alvo seguinte à transfecção durante a noite com o AON específico. O nível de expressão de mRNA de PDE foi quantificado usando o ensaio Quantigene® (Panomics) para PDE3A/B, PDE4D e PDE7A e PCR em tempo real foi usado para quantificar a expressão de PDE4A/4B. Os níveis de isoforma de PDE foram normalizados para a expressão de um gene de controle (β 2M, Ppib ou HPRT) e estes níveis foram comparados aos níveis de expressão das células não tratadas.

Embora a maioria dos oligonucleotídeos anti-sentido desenhados tenha sido específico para isoformas de PDE, alguns AON, em particular as isoformas para PDE4, demonstraram especificidade dual para nocaute alvo de mais que uma isoforma de PDE4. As sequências listadas na Tabela 1c descrevem os AON que demonstraram ter mais que um nocaute de gene alvo com o AON simples. A figura 1 demonstra a eficácia desses AON que foram desenhados para especificidade dual alvo. O AON TOP 1545 (SEQ ID N°:14) e TOP 1556 (SEQ ID N°:24) reconhecem, cada um, sequências de gene compartilhadas entre a isoforma de PDE4B e a isoforma de PDE4D

(Tabela 1c), e demonstram nocaute de gene alvo para PDE4B e PDE4D, enquanto os AON TOP 1507 (SEQ ID Nº:10) e 1508 (SEQ ID Nº:11) são eficazes na redução dos níveis de mRNA de PDE4A e PDE4D em células transfectadas e ambas as sequências de AON compartilhadas entre as isoformas de PDE4A e PDE4D (Tabela 1c). Os dados são expressos como % de inibição específica determinada por comparação dos níveis de inibição obtidos com as sequências de pareamento errôneo ou de AON de sentido com a % de inibição obtida com suas respectivas sequências de AON específicas de PDE.

Exemplo 2 Efeito da distribuição de AON nas funções biológicas das células

Este exemplo refere-se à eficácia do AON na função biológica de tipos de células diferentes, especificamente da secreção de citocinas e quimiocinas. As citocinas e quimiocinas são mediadores importantes da ativação e recrutamento celular. Células epiteliais pulmonares podem desempenhar um papel na patofisiologia das doenças respiratórias inflamatórias através da secreção das quimiocinas que levam ao recrutamento de células imunes, tais como neutrófilos e monócitos/macrófagos. Os níveis de interleucina-8 (IL-8/CXCL8) e proteína-1 quimioatrativa de monócito (MCP-1/CCL2) são aumentados em pacientes com COPD (Szilasi M et al. *Pathology Oncology Research*. 2006 12:52-60). Os níveis de IL-8 e MCP-1 podem estar envolvidos no recrutamento de neutrófilos e macrófagos, respectivamente. Ambas a IL-8 e a MCP-1 são secretadas pela linhagem de células epiteliais pulmonares. A549 em resposta ao estímulo com IL-1 β . As células A549 estimuladas também secretam fator estimulador de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), uma citocina conhecida por ativar neutrófilos e macrófagos para a função intensificada. A figura 2 demonstra a eficácia do AON TOP 1497 (SEQ ID Nº:90), que é específico para isoforma de PDE4D, para limitar a secreção de quimiocinas IL-8/CXCL-8 e MCP-1/CCL2 e a citocina GM-CSF nas células A549 seguinte à transfecção de AON, durante a noite, são então estimuladas com IL-1 β por 4 horas. O uso deste ensaio segue a verificação de isoformas de PDE envolvidas na liberação dos mediadores

inflamatórios pelas células epiteliais pulmonares. Na figura 2, a contribuição da PDE4D, através de sua inibição por TOP 1497 (SEQ ID Nº:90), nas células A549 está claramente demonstrada ao passo que não há contribuição da PDE5A nestas células para a liberação das quimiocinas e das citocinas embora a transfecção com AON TOP 1716 (SEQ ID Nº:92) tenha sido bem sucedida na redução dos níveis de mRNA deste gene. A figura 2 demonstra alterações funcionais, especificamente a redução do potencial inflamatório através do decréscimo da secreção dos mediadores inflamatório que pode ocorrer nas células epiteliais pulmonares seguinte à transfecção com AON.

A figura 3 demonstra a eficácia do AON para limitar a função biológica de tipos de células diferentes, especificamente as células mononucleares sangüíneas periféricas humanas (PBMCs). PBMCs referem-se a uma população mista de células imunes que secretam citocinas, especificamente TNF- α que é conhecida por ativar macrófagos e IL-2, que é conhecida por ativar e estimular células T e células NK. As PBMCs humanas transfectadas, durante a noite, com AON alvejando as isoformas de PDE, e então estimuladas no dia seguinte com fitoemaglutina (PHA) secretaram menos TNF- α e IL que as PBMCs transfectadas com sequências de AON de pareamento errôneo ou de sentido (Figura 3). A transfecção das PBMCs com o AON descrito levou a uma redução do potencial inflamatório destes tipos de células. Na COPD, a liberação dos mediadores pró-inflamatórios e quimioatrativos por células inflamatórias e células epiteliais ativadas contribui para ainda níveis aumentados de inflamação (Szilasi M et al. Pathology Oncology Research. 2006 12:52-60).

Espera-se que a inibição da expressão de gene de PDE levaria à atividade de PDE reduzida, que, por sua vez, resultaria em uma construção de células dentro de cAMP. A figura 3 demonstra que a transfecção com AON alvejando isoformas de PDE específicas levaram a níveis aumentados de cAMP intracelular nas PBMCs (eixo a direita). Os dados representam as alterações dos níveis tanto da citocina como da cAMP nas PBMCs seguinte à transfecção com AON específico para PDE em comparação com o níveis depois da transfecção com sequências de pareamento errôneo ou de senti-

do.

As citocinas desempenham um papel crítico na orquestração da inflamação crônica em todas as doenças, incluindo asma e COPD. TNF- α é uma das mais importantes citocinas pró-inflamatórias que é expressa em

5 várias doenças inflamatórias. Níveis de TNF- α são acentuadamente aumentados no esputo induzido dos pacientes com COPD (Keatings et al., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1996; 153; 530-534). Além disso, há evidência de que os pacientes com COPD com perda de peso mostram liberação aumentada de TNF- α a partir das células circulantes e que TNF- α pode induzir a-

10 poptose das células da musculatura esquelética, resultando em fadiga muscular e caquexia que são características encontradas em alguns pacientes com COPD grave (De Godoy et al., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1996, 153, 633-637). TNF- α induz a expressão de gene de várias citocinas pró-inflamatórias incluindo ele mesmo e a IL-8. As citocinas, especificamente

15 TNF- α , estão incluídas nos mediadores que mostraram terem aumentado e/ou desempenhado um papel na fisiologia das doenças respiratórias inflamatórias e estarem envolvidos na destruição de tecido.

Inibidores de PDE4 provocaram uma redução da liberação das citocinas e quimiocinas das células inflamatórias via um aumento da AMP

20 cíclica intracelular (Torphy, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1998, 157, 351-370). Em contraste com os corticosteróides, os inibidores de PDE4 têm um potente efeito inibidor sobre neutrófilos (Au et al., *Br. J. Pharmacol.* 1998, 123, 1260-1266) indicando que eles podem ser úteis nos tratamentos anti-inflamatórios para COPD. Há evidência preliminar de que um inibidor de PDE4

25 Cilomilast melhora a função do pulmão e os sintomas dos pacientes com COPD e isto pode ser devido à inibição da citocina (Compton et al., *Lancet.* 2001, 358, 265-270).

Como o TNF- α é considerado como um denominador comum nas doenças inflamatórias e respiratórias crônicas, esta invenção proporciona uma ampla aplicação terapêutica para tratar várias doenças inflamatórias.

30

Exemplo 3 AON modificado com a química de 2'-F-ANA demonstra eficácia aumentada e ação prolongada para o nocaute de gene alvo

Este exemplo refere-se à eficácia de AON específico para PDE quando as modificações com FANA são feitas na química do AON. As Tabelas 2a-2g descrevem a composição de AON modificada com resíduos de F-ANA. Na figura 4, as células A549 foram transfectadas por 24 horas com AON TOP 1497 (SEQ ID N°:90) específico para PDE4D tanto na composição de fosfotiorato (PS-DNA) ou contendo modificações ou contendo modificações da base FANA (PS-FANA; TOP 1497-F1 (SEQ ID N°:72), TOP-1497-F5 (SEQ ID N°:76), TOP 1497-F6 (SEQ ID N°:77) como indicado na legenda da figura 4. O nocaute de mRNA de PDE4D foi determinado usando o ensaio Quantigene® (Panomics) com níveis de PDE normalizados para a expressão de gene β 2M. A modificação da sequência de TOP 1497 com monômeros FANA, (TOP 1497-F1 (SEQ ID N°:72)) intensificou a eficácia do AON em inibir a expressão do gene alvo em doses entre 100-400 ng, mostrando, claramente, uma vantagem desta modificação quanto à atividade de AON (Figura 4a). Espera-se que as modificações de 2'-F-ANA intensifiquem a estabilidade do AON, tornando-o mais resistente à digestão por nucleosidase, que prolongaria sua atividade. Na figura 4b, a comparação das formulações diferentes de AON, específico para PDE4D, AON TOP 1497 em uma dose simples, com o tempo mostra claramente que o AON contendo 2'-F-ANA sustentou a atividade inibidora até 48 hp em comparação com PS-DINA AON. Nas 48 horas pós-transfecção, nenhuma inibição é observada com a formulação de PS-DNA de AON, contudo, mesmo modificando somente 5 das 19 bases AON TOP 1497-F6 (SEQ ID N°:77) com 2'-F-ANA, foi suficiente para sustentar um efeito inibidor para este período de tempo. A inibição sustentada foi aumentada por incorporação de mais resíduos de 2'-F-ANA na sequência original como mostrada seguinte à transfecção com TOP 1497-F5 (SEQ ID N°:76) e TOP 1497-F1 (SEQ ID N°:72). A maior quantidade da composição de 2'-F-ANA em AON produziu o efeito mais prolongado, embora por transfecção durante a noite (24 h), PS-FANA contendo 7 resíduos produziu um nível similar de inibição que PS-FANA contendo 11 resíduos.

Exemplo 4 AON modificado com química de 2'-F-ANA retém a

função biológica das células

Este exemplo refere-se à tolerância de modificação da química com 2-F-ANA do AON específico para PDE na redução das respostas inflamatórias das células. Na figura 2, foi demonstrada a eficácia do AON específico para PDE em reduzir a secreção de quimiocina por células epiteliais pulmonares. Na figura 5, o efeito de AON contendo 2'-F-ANA na função biológica de A5D9 foi estudado. As células A549 transfectadas com AON TOP (SEQ ID N°:14) específico para PDE4B/4D dual como PS-DNA ou com TOP 1545-F3 (SEQ ID N°:85) modificado com 2'-F-ANA demonstram níveis maiores de inibição de secreção de quimiocina quando AON contendo 2'-F-ANA foram transfectados nas células A549 em comparação com AON não modificado.

Essa retenção da eficácia biológica de AON contendo 2'-F-ANA foi demonstrada em células primárias, especificamente PBMCs humanas. Combinação de AON TOP 1545-F3 (SEQ ID N°:53) específico para PDE7A com AON TOP 1731-F2 (SEQ ID N°:53) específico para PDE7A aumentou a inibição de seus respectivos alvos de gene quando o segundo anti-sentido estava presente, embora a sequência de anti-sentido não apresentasse homologia com o outro gene alvo (Figura 6a). Na figura 6a as barras sólidas representam a % de inibição específica do mRNA do gene alvo ou de PDE4B, PDE4D ou PDE7A, quando ambos AON são usados em combinação com cada um em uma dose baixa (3,2nM) em comparação com o AON usado sozinho, em doses baixas e altas (6,3nM), demonstrando que AON contendo 2-F-ANA retém a função de nocaute de gene alvo nas células imunes primárias. Quanto à função biológica, a transfecção de PBMCs com combinação de TOP 1545-F3 (SEQ ID N°:85) específico, dual, para PDE4B/4D com AON TOP 1731-F2 (SEQ ID N°:53) específico para PDE7A acarretou a inibição da secreção de ambos os TNF- α e a IL-2. AON contendo 2'-F-ANA retém sua funcionalidade para reduzir o potencial inflamatório das células imunes.

Os resultados na figura 6a mostram também o efeito intensificado que ocorre quando as combinações de AON específico para dois genes

alvo diferentes são administradas às células ao mesmo tempo. Embora os AON tenham sido administrados em uma concentração que teve pouco a nenhum efeito sobre seus genes alvo quando empregados sozinhos, quando combinados, os AON induziram uma inibição significativa da expressão de gene de seus respectivos alvos (PDE4B e PDE4D para TOP 154-F3 (SEQ ID Nº:85), e PDE7A para TOP 1731-F2 (SEQ ID Nº:53)).

Exemplo 5: Efeito do PDE4B/4D AON nos Genes Reguladores Mitogênicos

A Tabela 1c descreve a sequência de AON TOP 1545 que tem especificidade dual também tanto para PDE4B quanto para PDE4D. A sequência do AON TOP 1549 (SEQ ID Nº:17) tem 100% de homologia com a sequência de gene da timidilato sintase (TYMS) e 5 pareamentos errôneos de pares de base com PDE4B e PDE4D. O AON TOP 1549 (SEQ ID Nº:17) inibe sua expressão de gene alvo (TYMS) em um modo de resposta de dose (200, 400 e 800 ng) depois de 6 horas de transfecção. Apesar de ter 5 pareamentos errôneos de pares de base com a sequência de gene de TYMS, o AON TOP 1545 (SEQ ID Nº:14) contendo 2'-F-ANA é também eficaz na inibição da expressão de gene de TYMS nas células 293 depois de 6 horas de transfecção. TYMS é uma enzima limitativa de taxa chave da síntese de DNA e é supra-regulada em alguns cânceres. O AON TOP 1545 (SEQ ID Nº:14) tem o potencial não somente de inibir a função do PDE através do decréscimo dos níveis de mRNA de PDE4B e PDE4D, mas podem funcionar para inibir a proliferação de células através de seus efeitos sobre a expressão de gene de TYMS. Essa figura demonstra que TOP 1545 (SEQ ID Nº:14) é uma nova molécula de anti-sentido que tem especificidade dual para fosfodiesterase 4 (PDE4) e timidilato sintase (TS).

Os inibidores de PDE4 estão também descritos na literatura como agentes elevadores de cAMP. A inibição de PDE4 bloqueia a ruptura de cAMP em AMP, resultando no acúmulo de cAMP. É bem sabido que altos níveis intracelulares de cAMP podem matar de modo eficaz as células cancerosas *in vitro*.

Timidilato sintase (TYMS) é a fonte de monofosfato de timidina

para a maior parte dos organismos, que é necessária para síntese de DNA e divisão celular, e é, portanto, um alvo anticâncer óbvio. TYMS não está estruturalmente relacionada às PDEs, exceto por uma pequena extensão de 17 nucleotídeos consecutivos em sua região de codificação. TOP 1545 (SEQ ID N°:14) alveja esta região de homologia entre TYMS e PDE4B e PDE4D, fazendo com que o TOP 1545 (SEQ ID N°:14) seja um composto anticâncer único.

Exemplo 6: Potência do AON *in vitro*

Este exemplo mostra a redução da expressão de gene nas células de macaco CYNOM-K1 transfectadas com o AON TOP1572-F2 (SEQ ID N°:122; figura 8A) específico para PDE4D/4B ou 8a) ou AON TOP1731-F3 (SEQ ID N°:54, figura 8B) específico para PDE7A. Níveis de mRNA de PDE4D e PDE4B foram respectivamente reduzidos em 53% e 66% (Figura 8A) e a expressão de gene de PDE7A foi reduzida em 70% (Figura 8B) em comparação com as células não transfectadas.

Exemplo 7: Efeito da distribuição de AON sob as funções biológicas das células

Este exemplo relata a eficácia do AON TOP1572-F2 (SEQ ID N°:122) específico para PDE4D/4D e TOP1545 (SEQ ID N°:14) na redução do nível de expressão de mRNA de PDE4D (Figura 9 A) e a secreção de citocina MCP-1 estimulada nas células NHBE em resposta a uma estimulação de 4 horas com citomix (500 U/mL de TNF- α + 10 ng/mL IL1- β + 10 ng/mL de IFN γ) (Figura 9 B). TOP1572-F2 (SEQ ID N°:122) reduz o nível de expressão de mRNA de PDE4D em 71% em correlação com 34% de inibição da secreção de MCP-1. Similarmente, TOP1545 (SEQ ID N°:14) reduz os níveis de expressão de mRNA de PDE4D em 36% em correlação com 46% de inibição da secreção de MPC-1 com relação às células transfectadas com os controles correspondentes.

Exemplo 8: Efeito da distribuição de AON sobre o efeito biológico nas células

Este exemplo refere-se à eficácia de AON específico para PDE em inibir a secreção de citocinas pró-inflamatórias por células mononuclea-

res sangüíneas periféricas humanas (PBMCs). As PBMCs são uma população mista de leucócitos incluindo linfócitos T, linfócitos B e monócitos/macrófagos, todos os quais podem ser estimulados para liberar citocinas pró-inflamatórias. As PBMCs humanas transfectadas durante a noite com TOP 1572 específico para PDE4B/4D (Figura 10) e então estimuladas no dia seguinte com fitoemaglutina mitogênica (PHA, 10 µg/mL) por 6 horas, secretaram 51% menos da citocina pró-inflamatória IL-2 (Figura 10 A) e 42% menos de TNF- α (Figura 10 B) em comparação com aquelas estimuladas com PHA, mas não transfectadas. Similarmente, as PBMCs transfectadas com o AON TOP 1731 específico para PDE7A (Figura 11) secretaram 48% menos IL-2 e 60% menos TNF- α que aquelas PBMCs que não foram transfectadas, mas estimuladas com PHA.

Exemplo 9: Eficácia aumentada da inibição de imunorrespostas quando TOP 1572 e TOP 1731 são combinados

Este exemplo refere-se ao efeito na redução da secreção de IL-2 por PBMCs estimuladas com PHA quando os AON são combinados. As PBMCs transfectadas com 3,1nM de cada um de TOP 1572-F2 (SEQ ID N°:122) e TOP 1731-F3 (SEQ ID N°:54) resultaram em um nível de inibição de IL-2 (33%), que foi maior que os níveis de inibição observados seguinte à transfecção com cada AON sozinho em ambas as doses de 3,1nM e 6,3nM (Figura 12). Neste exemplo, uma dose baixa de TOP 1572-F2 rendeu menos que 10% de inibição de IL-2, ao passo que uma dose maior (6,3nM) rendeu 24% de inibição de IL-12 (Figura 12). Com respeito ao TOP 1731-F3, uma dose baixa (3,1nM) produziu 20% de inibição de IL-2 e este nível não foi estatisticamente aumentado quando a dose foi aumentada para 6,3nM (22% inibição) (Figura 12). A combinação de TOP 1572-F2 com TOP 1731-F3 para resultar em 33% de inibição de secreção de IL-2 pode ter sido devida ao alvejamento das diferentes isoformas de PDE4B, PDE4D e PDE7A, simultaneamente (Figura 12).

Exemplo 10: Comparação das químicas de PS-DNA e PS-FANA nas linhagens das células.

Este exemplo compara a eficácia de PS-DNA AON à eficácia de

PS-FANA AON na redução da expressão de mRNA alvo. A versão de TOP1572-F2 (SEQ ID Nº:122) apresenta uma duração de ação mais longa que PS-DNA padrão versão TOP1572 (SEQ ID Nº:40) na redução da expressão de mRNA de ambas as PDE4D (Figura 13A) e PDE4B (Figura 13B).

- 5 Depois de 72 horas de transfecção nas células 293, o TOP1572-F3 ainda reduz 72% de expressão de mRNA de PDE4B e 55% de mRNA de PDE4D ao passo que a eficácia do TOP 1572 é reduzida em 18% para mRNA de PDE4B e 55% de mRNA de PDE4D. Aumento da atividade de FANA AON é também observada em doses mais baixas. A versão TOP1731-F3 (SEQ ID
- 10 Nº:54) é melhor que a versão PS-DNA TOP1731 (SEQ ID Nº:2) no bloqueio da expressão de mRNA de PDE7A em células A549 transfectadas por 48 horas em doses de 125nM e 75nM (Figura 14).

Embora as modalidades preferidas da invenção tenham sido descritas aqui, será entendido por aqueles versados na técnica que varia-

15 ções podem ser feitas nestas sem se desviar do espírito da invenção ou do escopo das reivindicações apensas. Todos os documentos citados são aqui incorporados a título de referência.

Tabela 1a.

Gene Alvo	Número de Acesso	Anti-sentido ID	Sequência de Anti-sentido (5'-3')	SEQ ID Nº:
		TOP1730	TCATGAGTGGCAGCTGCAA	1
		TOP1731	TCATGAGTGGCAGCTGCAATT	2
PDE7A	NM_002603	TOP1732	CATGAGTGGCAGCTGCAATTAA	3
		TOP1733	GAGTGGCAGCTGCAATTAAGC	4
		TOP1734	ATGAGTGGCAGCTGCAATTAA	5
		TOP1735	AGATCATGAGTGGCAGCTGCA	6
		TOP1736	GAGTGGCAGCTGCAATTAA	7
		TOP1737	GATCATGAGTGGCAGCTGCAA	8

Tabela 1b.

Gene Alvo	Número de Acesso	Anti-sentido ID	Sequência de Anti-sentido (5'-3')	SEQ ID Nº:
PDE3A	NM_000921	TOP1313	CCTCAGCACCCAGCCATGTCG	9

Tabela 1c.

PDE4A+4D	NM_006202	TOP1507	GTGCTTGTCACACATGG	10
	NM_006203	TOP1508	GTCCTCCAAAGTGTCC	11
PDE4B+4D	NM_002600 NM_006203	TOP1511	GGTCTCTAGCTGGTC	12
		TOP1544	ATGGTAATGGTCTTC	13
		TOP1545	TCTGCCCCATGTCTCCCA	14
		TOP1546	AAGACCCCATTTGTTCA	15
		TOP1547	TCTGCCCAGGTCTCCCA	16
		TOP1549	GAGGCCCATGTCTCCCG	17
		TOP1550	TCTGCCCATGTCTCCCAGA	18
		TOP1551	TCTGCCCATGTCTCCCACA	19
		TOP1552	TCTGCCCATGTCTCCCAGAG	20
		TOP1553	TCTGCCCATGTCTCCCACAA	21
		TOP1554	GGTTGCTCAGGTCTGCACAGT	22
		TOP1555	GGTTGCTCAGATCTGCACAGT	23
		TOP1556	GGTTGCTCAGITCTGCACAGT	24
		TOP1557	TCAGCATGGTAATGGTCTT	25
		TOP1558	GCCACITCAGCATGGTAAT	26
		TOP1559	TACATCAAIGCAAGTTC	27
		TOP1560	ATGTCACAGTITTCCTC	28
		TOP1561	TGTCAATACCATITTCCT	29
		TOP1562	GTTTCIACCATIGTCTTCA	30
		TOP1563	CTTCTTAGTTTCIACCAT	31
		TOP1564	TCTGCACAGTGCACCAT	32
		TOP1565	GTCTGTAIGGTCTCTAGCT	33
		TOP1566	TGTAIGGTCTCTAGCTGGT	34
		TOP1567	TTCTTGACTCCACTIATCT	35
		TOP1568	AATCAAGTCATCICCGTGT	36
		TOP1569	GTTGTGATAIGCCACITCA	37
		TOP1570	ATTITACATCAAIGCAAGT	38
		TOP1571	TGTTTIGACATATCIGTT	39
		TOP1572	GGTTGCTCAGITCTGCACA	40
		TOP1573	GGTTGCTCAGATCTGCACA	113
		TOP1574	TTGCTCAGATCTGCA	114

Tabela 1d

Gene Alvo	Número de Acesso	Anti-sentido ID	Sequência de Anti-sentido (5'-3')	SEQ ID Nº:
PDE3B		TOP1360	TCAGCAGCGTCCGCAGCCAG	89
PDE4D	NM_006203	TOP1497	CTGCCTCCTCTTCAACCTG	90
PDE4A+4B	NM_006202	TOP1512	CCATGATGCGGTCTGTCCA	91
	NM_002600			
PDE7A	NM_002603	TOP1716	TCATGAGTGGCAGCTGC	92

Tabela 2a

Gene Alvo	Número de Acesso	Anti-sentido ID	Sequência de Anti-sentido (5'-3')	SEQ ID Nº:
PDE7A	TOP1716	TOP1716-F1	PS-TCA TGA gtg gca GCT GC	41
		TOP1716-F2	PS-TCA tGA GTg gCA gcT GC	42
		TOP1716-F3	PS-tCa TgA gTg GcA gCt gC	43
		TOP1716-F4	PS-TCA tGA gtg gca GCT GC	44
		TOP1716-F5	PS-TCA tga gtg gca GCT GC	45
	TOP1714	TOP1714-F1	PS-GCT TAg gtt cct TTA AGT	46
	TOP1729	TOP1729-F1	PS-CAG ATc atg agt ccC AGC TG	47
	TOP1730	TOP1730-F1	PS-TCA TGa gtg gca gCT GCA A	48
		TOP1730-F2	PS-TCA Tga gtg gca gct GCA A	49
		TOP1730-F3	PS-TCa tga gtg gca gct GCA A	50
		TOP1730-F4	PS-TCa tga gtg gcA GCT GCA A	51
	TOIP1731	TOP1731-F1	PS-TCA TGa gtg gca gct GCA ATT	52
		TOP1731-F2	PS-TCA Tga gtg gca gct gcA ATT	53
		TOP1731-F3	PS-TCa tga gtg gca gct gcA ATT	54
		TOP1731-F4	PS-TCa tga gtg gcA GCT GCA ATT	55
		TOP1731-F5	PS-TCA Tga gtg GCa gct gcA ATT	115
		TOP1731-F6	PS-TCa tGA gtg GCA gct gcA ATT	116
	TOP1733	TOP1733-F1	PS-GAG TGg cag ctg caa TTA AGC	56
	TOP1734	TOP1734-F1	PS-ATG AGt ggc agc tgc AAT TAA	57
	TOP1736	TOP1736-F1	PS-GAG TGg cag ctg cAA TTA A	58
	TOP1737	TOP1737-F1	PS-GAT CAt gag tgg cag CTG CAA	59

Tabela 2b

Gene Alvo	Número de Acesso	Anti-sentido ID	Sequência de Anti-sentido (5'-3')	SEQ ID Nº:
PDE3A	TOP1311	TOP1311-F1	PS-CGG CCA AGC agc tga gCA CC	60
		TOP1311-F2	PS-CGG CCA Agc agc tGA GCA CC	61
		TOP1311-F3	PS-CGG CCA agc agc TGA GCA CC	62

Tabela 2c.

Gene Alvo	Número de Acesso	Anti-sentido ID	Sequência de Anti-sentido (5'-3')	SEQ ID Nº:
PDE3B	TOP1360	TOP1360-F1	PS-TCA GCA Gcg tcc g CA GCC AG	63
		TOP1360-F2	PS-TCA gca g CG Tcc g CA gcc AG	64
		TOP1360-F3	PS-TCA gCa g Cg TCC gCa g CC ag	65

Tabela 2d.

Gene Alvo	Número de Acesso	Anti-sentido ID	Sequência de Anti-sentido (5'-3')	SEQ ID Nº:
PDE4A	TOP1413	TOP1413-F1	PS- GCC ACG ctc gcg CTC TC	66
		TOP1413-F2	PS- GCC acg CTC gcg ct C TC	67
		TOP1413-F3	PS-gcc ACG ctc GCG CT c tc	68

Tabela 2e.

Gene Alvo	Número de Acesso	Anti-sentido ID	Sequência de Anti-sentido (5'-3')	SEQ ID Nº:
PDE4D	TOP1498	TOP1498-F1	PS- CTT CAg gct gg C TTT CCT C	69
		TOP1498-F2	PS-ct T Cag g CT gg C Ttt CCt c	70
		TOP1498-F3	PS-ctt cag gct g GC TTT CCT C	71
	TOP1497	TOP1497-F1	PS- CTG CCT cct ctt ca A CCT G	72
		TOP1497-F2	PS-ctg c CT CCt ct T CAA cct g	73
		TOP1497-F3	PS-ctg c CT CCt Bt T CAA cct g	74
		TOP1497-F4	PS- CTg cCT cct ctt ca A CCT G	75
		TOP1497-F5	PS- CTg cct cct ctt ca A CCT G	76
		TOP1497-F6	PS-ctg cct cct ctt ca A CCT G	77

5 Tabela 2f.

Gene Alvo	Número de Acesso	Anti-sentido ID	Sequência de Anti-sentido (5'-3')	SEQ ID Nº:
PDE4B	TOP1432	TOP1432-F1	PS- GAC CGG Tag gtc tg T ATG GT	78
		TOP1432-F2	PS- GAC CGG Tag gtc tg T BTG GT	79
		TOP1432-F3	PS- GAC Cgg tag gt C TGT BTG GT	80

Tabela 2g.

Gene Alvo	Número de Acesso	Anti-sentido ID	Sequência de Anti-sentido (5'-3')	SEQ ID Nº:
PDE4A+ 4D	TOP1505	TOP1505-F1	PS-GTC CAC tgg cgG TAC AG	81
PDE4A+ 4B	TOP1512	TOP1512-F1	PS-CCA TGA tgc ggt cTG TCC A	82
PDE4B+ 4D	TOP1545	TOP1545-F1	PS-TCT GCc cat gtc TCC CA	83
		TOP1545-F2	PS-Tct gcc cat gtc TCC CA	84
		TOP1545-F3	PS-Tct gcc cat gtc tCC CA	85
		TOP1545-F4	PS-Tct gcc cat gTC tcC CA	86
		TOP1545-F5	PS-TcT gCc CaT gTc TcC cA	87
		TOP1545-F6	PS-Tct gcc CAT gtc tCC CA	88
	TOP1556	TOP1556-F1	PS-GGT TGc tca git ctg CAC AGT	117
		TOP1556-F2	PS-GGt tgc tca git ctg cAC AGT	118
		TOP1556-F3	PS-GGt tgc TCA git ctG CAC A	123
	TOP1570	TOP1570-F1	PS-ATt ita cat caa igC AAG T	119
		TOP1570-F2	PS-ATt ita CAT caa igC AAG T	120
	TOP1572	TOP1572-F1	PS-GGT TGc tca git cTG CAC A	121
		TOP1572-F2	PS-GGt tgc tca git ctG CAC A	122
		TOP1572-F3	PS-GGt tgc TCA git ctG CAC A	124
		TOP1572-F4	PS-GGt tgc tca git ctg CAC A	125
	TOP1573	TOP1573-F2	PS-GGt tgc tca gat ctg CAC A	126
	TOP1574	TOP1574-F2	PS-TTG ctc aga tct GCA	

Tabela 3.

Gene alvo	Iniciador de sentido (5'-3')	SEQ ID Nº:	Tamanho do Produto (bp)
PDE7A	TCAGGCCATGCACTGTTACT	93	229
PDE3A	CAACAGTGACAGCAGTGACATT	95	166
PDE3B	GATTCTTTGGGATTGGGACT	97	212
PDE4A	ATCAACACCAATTCGGAGCT	99	199
PDE4B	TGGCAGACCTGAAGACAATG	101	181
PDE4D	CAGAATATGGTGCACTGTGC	103	192
HPRT	ATCAGACTGAAGAGCTTTGTAATGACCA	105	230
B2M	CAAGGACTGGTCTTTCTATCTCTTGT	107	338
PPIB	AGAGCATCTACGGTGAGCG	109	196
TYMS	AAGAATCATCATGTGCGCTT	111	226

Gene alvo	Iniciador de sentido (5'-3')	SEQ ID N°:	Tamanho do Produto (bp)
PDE7A	CCTGATTCTCTCAATAAGCCC	94	229
PDE3A	TTGAGTCCAGGTTATCCATGAC	96	166
PDE3B	ATCTTTGGCCTACAGGAACC	98	212
PDE4A	CCAGCACCATGTCGATGAC	100	199
PDE4B	AAATTCCTCCATGATGCGG	102	181
PDE4D	AGTCTATGAAGCCCACCTGTG	104	192
HPRT	TGGCTTATATCCAACACTTCGTG	106	230
B2M	GTGGAGCAACCTGCTCAGATAC	108	338
PPIB	CTTCCGCACCACCTCCA	110	196
TYMS	GTGTGTATAAAGTCACCTGGCTT	112	226

Listagem de Sequências

<110> Topigen Pharmaceuticals Inc.
 <120> Oligonucleotídeos que Afetam a Expressão de Fosfodiesterases
 <170> PatentIn versão 3.4
 <213> Humano
 <221> Miscelâneas
 <223> Inosina
 <223> Nucleotídeos nas posições 1, 2, 3, 4, 5, 6, 13, 14, 15, e 17 são
 2'-desóxi-2'-fluorabinonucleotídeos
 <223> Todos os nucleotídeos estão ligados por ligações de fosforotioa-
 to
 <223> Ligante de butanodiol

SEQUENCE LISTING

<110> Topigen Pharmaceuticals Inc.
 <120> Oligonucleotídeos que Afetam a Expressão de Fosfodiesterases
 <130> 13424-15PCT
 <150> US 60/801,384
 <151> 2006-05-19
 <160> 126
 <170> PatentIn versão 3.4
 <210> 1
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Humano
 <400> 1
 tcatgagtgg cagctgcaa 19
 <210> 2
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Humano
 <400> 2
 tcatgagtgg cagctgcaat t 21
 <210> 3
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Humano
 <400> 3
 catgagtggc agctgcaatt aa 22
 <210> 4
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Humano
 <400> 4
 gagtggcagc tgcaattaag c 21

<210>	5	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Humano	
<400>	5	
atgagtggca gctgcaatta a		21
<210>	6	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Humano	
<400>	6	
agatcatgag tggcagctgc a		21
<210>	7	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Humano	
<400>	7	
gagtggcagc tgcaattaa		19
<210>	8	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Humano	
<400>	8	
gatcatgagt ggcagctgca a		21
<210>	9	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Humano	
<400>	9	
cctcagcacc agccatgtcg		20
<210>	10	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	10	
gtgcttgtca cacatgg		17
<210>	11	
<211>	16	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	11	
gtcctccaaa gtgtcc		16
<210>	12	
<211>	15	
<212>	DNA	

<213>	Homo sapiens	
<400>	12	
	ggtctctagc tggtc	15
<210>	13	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	13	
	atggtaatgg tcttc	15
<210>	14	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	14	
	tctgcccattg tctccca	17
<210>	15	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	15	
	aagaccccat ttgttca	17
<210>	16	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	16	
	tctgcccagg tctccca	17
<210>	17	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	17	
	gaggcccatg tctcccg	17
<210>	18	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	18	
	tctgcccattg tctccaga	19
<210>	19	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	19	

tctgcccacg tctcccaca	19
<210> 20	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 20	
tctgcccacg tctcccagag	20
<210> 21	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 21	
tctgcccacg tctcccacaa	20
<210> 22	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 22	
ggttgctcag gtctgcacag t	21
<210> 23	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 23	
ggttgctcag atctgcacag t	21
<210> 24	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<220>	
<221> Região de interesse biológico	
<222> (11)..(11)	
<223> Inosina	
<400> 24	
ggttgctcag ntctgcacag t	21
<210> 25	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 25	
tcagcatggg aatggtctt	19
<210> 26	
<211> 19	
<212> DNA	

<213> Homo sapiens

<220>

<221> Região de interesse biológico

<222> (6)..(6)

<223> Inosina

<400> 26

gccacntcag catgtaat

19

<210> 27

<211> 17

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> Região de interesse biológico

<222> (9)..(9)

<223> Inosina

<400> 27

tacatcaang caagttc

17

<210> 28

<211> 17

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> Região de interesse biológico

<222> (11)..(11)

<223> Inosina

<400> 28

atgtcacagt nttcttc

17

<210> 29

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> Região de interesse biológico

<222> (8)..(8)

<223> Inosina

<400> 29

tgtcaatnac cattttcct

19

<210> 30

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> Região de interesse biológico

<222> (6)..(6)

<223> Inosina
 <220>
 <221> Região de interesse biológico
 <222> (12)..(12)
 <223> Inosina
 <400> 30
 gtttcnacca tngtcttca 19
 <210> 31
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> Região de interesse biológico
 <222> (14)..(14)
 <223> Inosina
 <400> 31
 ctttccttagt ttcnaccat 19
 <210> 32
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 32
 tctgcacagt gcaccat 17
 <210> 33
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> Região de interesse biológico
 <222> (8)..(8)
 <223> Inosina
 <400> 33
 gtctgtangg tctctagct 19
 <210> 34
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> Região de interesse biológico
 <222> (5)..(5)
 <223> Inosina
 <400> 34
 tgtanggtct ctagctggt 19
 <210> 35

<211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <222> (15)..(15)
 <223> Inosina

<400> 35
 ttcttgactc cactnatct

19

<210> 36
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <222> (13)..(13)
 <223> Inosina

<400> 36
 aatcaagtca tcncctgt

19

<210> 37
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <222> (10)..(10)
 <223> Inosina

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <222> (16)..(16)
 <223> Inosina

<400> 37
 gttgtgatan gccacntca

19

<210> 38
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <222> (4)..(4)
 <223> Inosina

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <222> (13)..(13)
 <223> Inosina

<400> 38

attntacatc aangcaagt

19

<210> 39
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <222> (6)..(6)
 <223> Inosina

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <222> (15)..(15)
 <223> Inosina

<400> 39
 tgtttngaca tatkngtt

18

<210> 40
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <222> (11)..(11)
 <223> Inosina

<400> 40
 gggttgctcag ntctgcaca

19

<210> 41
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Humano

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Nucleotídeos nas posições 1, 2, 3, 4, 5, 6, 13, 14, 15, 16, 17
 são 2'-deóxi-2'-fluoroarabinonucleotídeos.

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Todos os nucleotídeos estão ligados por ligações de fosforotio-
 ato.

<400> 41
 tcatgagtgg cagctgc

17

<210> 42
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Humano

<220>
 <221> Região de interesse biológico

<223> Nucleotídeos nas posições 1, 2, 3, 6, 7, 8, 11, 12, 15, 16, 17
são 2'-deóxi-2'-fluoroarabinonucleotídeos.

<220>
<221> Região de interesse biológico
<223> Todos os nucleotídeos estão ligados por ligações de fosforotio-
ato.

<400> 42
tcatgagtgg cagctgc 17

<210> 43
<211> 17
<212> DNA
<213> Humano

<220>
<221> Região de interesse biológico
<223> Nucleotídeos nas posições 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 17 são 2'-
deóxi-2'-fluoroarabinonucleotídeos.

<220>
<221> Região de interesse biológico
<223> Todos os nucleotídeos estão ligados por ligações de fosforotio-
ato.

<400> 43
tcatgagtgg cagctgc 17

<210> 44
<211> 17
<212> DNA
<213> Humano

<220>
<221> Região de interesse biológico
<223> Nucleotídeos nas posições 1, 2, 3, 5, 6, 13, 14, 15, 16, 17 são
2'-deóxi-2'-fluoroarabinonucleotídeos.

<220>
<221> Região de interesse biológico
<223> Todos os nucleotídeos estão ligados por ligações de fosforotio-
ato.

<400> 44
tcatgagtgg cagctgc 17

<210> 45
<211> 17
<212> DNA
<213> Humano

<220>
<221> Região de interesse biológico
<223> Nucleotídeos nas posições 1, 2, 3, 13, 14, 15, 16, 17 são 2'-
deóxi-2'-fluoroarabinonucleotídeos.

<220>
<221> Região de interesse biológico
<223> Todos os nucleotídeos estão ligados por ligações de fosforo-

tioato.

<400> 45
 tcatgagtg cagctgc 17

<210> 46
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Humano

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Nucleotídeos nas posições 1, 2, 3, 4, 5, 13, 14, 15, 16, 17, 18
 são 2'-deóxi-2'-fluoroarabinonucleotídeos.

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Todos os nucleotídeos estão ligados por ligações de fosforotio-
 ato.

<400> 46
 gcttaggttc ctttaagt 18

<210> 47
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Humano

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Nucleotídeos nas posições 1, 2, 3, 4, 5, 15, 16, 17, 18, 19, 20
 são 2'-deóxi-2'-fluoroarabinonucleotídeos.

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Todos os nucleotídeos estão ligados por ligações de fosforotio-
 ato.

<400> 47
 cagatcatga gtcccagctg 20

<210> 48
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Humano

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Nucleotídeos nas posições 1, 2, 3, 4, 5, 14, 15, 16, 17, 18, 19
 são 2'-deóxi-2'-fluoroarabinonucleotídeos.

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Todos os nucleotídeos estão ligados por ligações de fosforotio-
 ato.

<400> 48
 tcatgagtg cagctgcaa 19

<210> 49
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Humano

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Nucleotídeos nas posições 1, 2, 3, 4, 16, 17, 18, 19 são 2'-deóxi-2'-fluoroarabinonucleotídeos.

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Todos os nucleotídeos estão ligados por ligações de fosforotioato.

<400> 49
 tcatgagtgg cagctgcaa 19

<210> 50
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Humano

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Nucleotídeos nas posições 1, 2, 16, 17, 18, 19 são 2'-deóxi-2'-fluoroarabinonucleotídeos.

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Todos os nucleotídeos estão ligados por ligações de fosforotioato.

<400> 50
 tcatgagtgg cagctgcaa 19

<210> 51
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Humano

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Nucleotídeos nas posições 1, 2, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 são 2'-deóxi-2'-fluoroarabinonucleotídeos.

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Todos os nucleotídeos estão ligados por ligações de fosforotioato.

<400> 51
 tcatgagtgg cagctgcaa 19

<210> 52
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Humano

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Nucleotídeos nas posições 1, 2, 3, 4, 5, 16, 17, 18, 19, 20, 21
 são 2'-deóxi-2'-fluoroarabinonucleotídeos.

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Todos os nucleotídeos estão ligados por ligações de fosforotio-
 ato.

<400> 52
 tcatgagtgg cagctgcaat t 21

<210> 53
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Humano

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Nucleotídeos nas posições 1, 2, 3, 4, 18, 19, 20, 21 são 2'-
 deóxi-2'-fluoroarabinonucleotídeos.

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Todos os nucleotídeos estão ligados por ligações de fosforotio-
 ato.

<400> 53
 tcatgagtgg cagctgcaat t 21

<210> 54
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Humano

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Nucleotídeos nas posições 1, 2, 18, 19, 20, 21 são 2'-deóxi-2'-
 fluoroarabinonucleotídeos.

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Todos os nucleotídeos estão ligados por ligações de fosforotio-
 ato.

<400> 54
 tcatgagtgg cagctgcaat t 21

<210> 55
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Humano

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Nucleotídeos nas posições 1, 2, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19,
 20, 21 são 2'-deóxi-2'-fluoroarabinonucleotídeos.

<220>

<221> Região de interesse biológico
 <223> Todos os nucleotídeos estão ligados por ligações de fosforotioato.

<400> 55
 tcatgagtg cagctgcaat t 21

<210> 56
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Humano

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Nucleotídeos nas posições 1, 2, 3, 4, 5, 16, 17, 18, 19, 20, 21 são 2'-deóxi-2'-fluoroarabinonucleotídeos.

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Todos os nucleotídeos estão ligados por ligações de fosforotioato.

<400> 56
 gagtggcagc tgcaattaag c 21

<210> 57
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Humano

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Nucleotídeos nas posições 1, 2, 3, 4, 5, 16, 17, 18, 19, 20, 21 são 2'-deóxi-2'-fluoroarabinonucleotídeos.

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Todos os nucleotídeos estão ligados por ligações de fosforotioato.

<400> 57
 atgagtgga gctgcaatta a 21

<210> 58
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Humano

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Nucleotídeos nas posições 1, 2, 3, 4, 5, 14, 15, 16, 17, 18, 19 são 2'-deóxi-2'-fluoroarabinonucleotídeos.

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Todos os nucleotídeos estão ligados por ligações de fosforotioato.

<400> 58
 gagtggcagc tgcaattaa 19

<210> 59
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Humano

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Nucleotídeos nas posições 1, 2, 3, 4, 5, 16, 17, 18, 19, 20, 21
 são 2'-deóxi-2'-fluoroarabinonucleotídeos.

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Todos os nucleotídeos estão ligados por ligações de fosforotio-
 ato.

<400> 59
 gatcatgagt ggcagctgca a 21

<210> 60
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Humano

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Nucleotídeos nas posições 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 17, 18, 19,
 20 são 2'-deóxi-2'-fluoroarabinonucleotídeos.

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Todos os nucleotídeos estão ligados por ligações de fosforotio-
 ato.

<400> 60
 cggccaagca gctgagcacc 20

<210> 61
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Humano

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Nucleotídeos nas posições 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 15, 16, 17, 18,
 19, 20 são 2'-deóxi-2'-fluoroarabinonucleotídeos.

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Todos os nucleotídeos estão ligados por ligações de fosforotio-
 ato.

<400> 61
 cggccaagca gctgagcacc 20

<210> 62
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Humano

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Nucleotídeos nas posições 1, 2, 3, 4, 5, 6, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 são 2'-deóxi-2'-fluoroarabinonucleotídeos.

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Todos os nucleotídeos estão ligados por ligações de fosforotioato.

<400> 62
 cgccaagca gctgagcacc 20

<210> 63
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Humano

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Nucleotídeos nas posições 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 são 2'-deóxi-2'-fluoroarabinonucleotídeos.

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Todos os nucleotídeos estão ligados por ligações de fosforotioato.

<400> 63
 tcagcagcgt ccgcagccag 20

<210> 64
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Humano

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Nucleotídeos nas posições 1, 2, 3, 8, 9, 10, 14, 15, 19, 20 são 2'-deóxi-2'-fluoroarabinonucleotídeos.

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Todos os nucleotídeos estão ligados por ligações de fosforotioato.

<400> 64
 tcagcagcgt ccgcagccag 20

<210> 65
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Humano

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Nucleotídeos nas posições 1, 2, 3, 5, 8, 10, 11, 12, 14, 17, 18 são 2'-deóxi-2'-fluoroarabinonucleotídeos.

<220>

<221> Região de interesse biológico
 <223> Todos os nucleotídeos estão ligados por ligações de fosforotio-
 ato.

<400> 65
 tcagcagcgt ccgcagccag 20

<210> 66
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Humano

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Nucleotídeos nas posições 1, 2, 3, 4, 5, 6, 13, 14, 15, 16, 17
 são 2'-deóxi-2'-fluoroarabinonucleotídeos.

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Todos os nucleotídeos estão ligados por ligações de fosforotio-
 ato.

<400> 66
 gccacgctcg cgctctc 17

<210> 67
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Humano

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Nucleotídeos nas posições 1, 2, 3, 7, 8, 9, 15, 16, 17 são 2'-
 deóxi-2'-fluoroarabinonucleotídeos.

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Todos os nucleotídeos estão ligados por ligações de fosforotio-
 ato.

<400> 67
 gccacgctcg cgctctc 17

<210> 68
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Humano

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Nucleotídeos nas posições 4, 5, 6, 10, 11, 12, 13, 14 são 2'-
 deóxi-2'-fluoroarabinonucleotídeos.

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Todos os nucleotídeos estão ligados por ligações de fosforotio-
 ato.

<400> 68
 gccacgctcg cgctctc 17

<210> 69
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Humano

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Nucleotídeos nas posições 1, 2, 3, 4, 5, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 são 2'-deóxi-2'-fluoroarabinonucleotídeos.

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Todos os nucleotídeos estão ligados por ligações de fosforotioato.

<400> 69
 cttcaggctg gctttcctc 19

<210> 70
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Humano

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Nucleotídeos nas posições 3, 4, 8, 9, 12, 13, 16, 17 são 2'-deóxi-2'-fluoroarabinonucleotídeos.

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Todos os nucleotídeos estão ligados por ligações de fosforotioato.

<400> 70
 cttcaggctg gctttcctc 19

<210> 71
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Humano

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Nucleotídeos nas posições 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 são 2'-deóxi-2'-fluoroarabinonucleotídeos.

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Todos os nucleotídeos estão ligados por ligações de fosforotioato.

<400> 71
 cttcaggctg gctttcctc 19

<210> 72
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Humano

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Nucleotídeos nas posições 1, 2, 3, 4, 5, 6, 15, 16, 17, 18, 19
 são 2'-deóxi-2'-fluoroarabinonucleotídeos.

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Todos os nucleotídeos estão ligados por ligações de fosforotio-
 ato.

<400> 72
 ctgcctcctc ttcaacctg 19

<210> 73
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Humano

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Nucleotídeos nas posições 5, 6, 7, 8, 12, 13, 14, 15 são 2'-
 deóxi-2'-fluoroarabinonucleotídeos.

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Todos os nucleotídeos estão ligados por ligações de fosforotio-
 ato.

<400> 73
 ctgcctcctc ttcaacctg 19

<210> 74
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Humano

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Nucleotídeos nas posições 5, 6, 7, 8, 12, 13, 14, 15 são 2'-
 deóxi-2'-fluoroarabinonucleotídeos.

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Todos os nucleotídeos estão ligados por ligações de fosforotio-
 ato.

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <222> (10)..(10)
 <223> Ligante butanodiol

<400> 74
 ctgcctcctn ttcaacctg 19

<210> 75
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Humano

<220>

<221> Região de interesse biológico
 <223> Nucleotídeos nas posições 1, 2, 5, 6, 15, 16, 17, 18, 19 são 2'-deóxi-2'-fluoroarabinonucleotídeos.

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Todos os nucleotídeos estão ligados por ligações de fosforotioato.

<400> 75
 ctgcctcctc ttcaacctg 19

<210> 76
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Humano

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Nucleotídeos nas posições 1, 2, 15, 16, 17, 18, 19 são 2'-deóxi-2'-fluoroarabinonucleotídeos.

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Todos os nucleotídeos estão ligados por ligações de fosforotioato.

<400> 76
 ctgcctcctc ttcaacctg 19

<210> 77
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Humano

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Nucleotídeos nas posições 15, 16, 17, 18, 19 são 2'-deóxi-2'-fluoroarabinonucleotídeos.

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Todos os nucleotídeos estão ligados por ligações de fosforotioato.

<400> 77
 ctgcctcctc ttcaacctg 19

<210> 78
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Humano

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Nucleotídeos nas posições 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 15, 16, 17, 18, 19, 20 são 2'-deóxi-2'-fluoroarabinonucleotídeos.

<220>
 <221> Região de interesse biológico

<223> Todos os nucleotídeos estão ligados por ligações de fosforotioato.

<400> 78
gaccggtagg tctgtatggt 20

<210> 79
<211> 20
<212> DNA
<213> Humano

<220>
<221> Região de interesse biológico
<223> Nucleotídeos nas posições 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 15, 16, 17, 18, 19, 20 são 2'-deóxi-2'-fluoroarabinonucleotídeos.

<220>
<221> Região de interesse biológico
<223> Todos os nucleotídeos estão ligados por ligações de fosforotioato.

<220>
<221> Região de interesse biológico
<222> (16)..(16)
<223> Ligante butanodiol

<400> 79
gaccggtagg tctgtntggt 20

<210> 80
<211> 20
<212> DNA
<213> Humano

<220>
<221> Região de interesse biológico
<223> Nucleotídeos nas posições 1, 2, 3, 4, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 são 2'-deóxi-2'-fluoroarabinonucleotídeos.

<220>
<221> Região de interesse biológico
<223> Todos os nucleotídeos estão ligados por ligações de fosforotioato.

<220>
<221> Região de interesse biológico
<222> (16)..(16)
<223> Ligante butanodiol

<400> 80
gaccggtagg tctgtntggt 20

<210> 81
<211> 17
<212> DNA
<213> Humano

<220>
<221> Região de interesse biológico
<223> Nucleotídeos nas posições 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 13, 14, 15, 16,

17 são 2'-deóxi-2'-fluoroarabinonucleotídeos.

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Todos os nucleotídeos estão ligados por ligações de fosforotio-
 ato.

<400> 81
 gtccactggc ggtacag 17

<210> 82
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Humano

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Nucleotídeos nas posições 1, 2, 3, 4, 5, 6, 14, 15, 16, 17, 18,
 19 são 2'-deóxi-2'-fluoroarabinonucleotídeos.

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Todos os nucleotídeos estão ligados por ligações de fosforotio-
 ato.

<400> 82
 ccatgatgcg gtctgtcca 19

<210> 83
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Humano

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Nucleotídeos nas posições 1, 2, 3, 4, 5, 12, 13, 14, 15, 16, 17
 são 2'-deóxi-2'-fluoroarabinonucleotídeos.

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Todos os nucleotídeos estão ligados por ligações de fosforotio-
 ato.

<400> 83
 tctgcccattg tctccca 17

<210> 84
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Humano

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Nucleotídeos nas posições 1, 2, 13, 14, 15, 16, 17 são 2'-deóxi-
 2'-fluoroarabinonucleotídeos.

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Todos os nucleotídeos estão ligados por ligações de fosforotio-
 ato.

<400> 84
 tctgcccattg tctccca 17

<210> 85
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Humano

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Nucleotídeos nas posições 1, 2, 14, 15, 16, 17 são 2'-deóxi-2'-fluoroarabinonucleotídeos.

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Todos os nucleotídeos estão ligados por ligações de fosforotioato.

<400> 85
 tctgcccattg tctccca 17

<210> 86
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Humano

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Nucleotídeos nas posições 1, 2, 11, 12, 15, 16, 17 são 2'-deóxi-2'-fluoroarabinonucleotídeos.

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Todos os nucleotídeos estão ligados por ligações de fosforotioato.

<400> 86
 tctgcccattg tctccca 17

<210> 87
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Humano

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Nucleotídeos nas posições 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 são 2'-deóxi-2'-fluoroarabinonucleotídeos.

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Todos os nucleotídeos estão ligados por ligações de fosforotioato.

<400> 87
 tctgcccattg tctccca 17

<210> 88
 <211> 17

<212>	DNA	
<213>	Humano	
<220>		
<221>	Região de interesse biológico	
<223>	Nucleotídeos nas posições 1, 2, 7, 8, 9, 14, 15, 16, 17 são 2'-deóxi-2'-fluoroarabinonucleotídeos.	
<220>		
<221>	Região de interesse biológico	
<223>	Todos os nucleotídeos estão ligados por ligações de fosforotioato.	
<400>	88	
	tctgcccattg tctccca	17
<210>	89	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	89	
	tcagcagcgt ccgagccag	20
<210>	90	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	90	
	ctgcctcctc ttcaacctg	19
<210>	91	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	91	
	ccatgatgcg gtctgtcca	19
<210>	92	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	92	
	tcatgagtgg cagctgc	17
<210>	93	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Humano	
<400>	93	
	tcaggccattg cactgttact	20
<210>	94	
<211>	21	
<212>	DNA	

<213>	Humano	
<400>	94	
cctgattctc	tcaataagcc	c
		21
<210>	95	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Humano	
<400>	95	
caacagtgac	agcagtgaca	tt
		22
<210>	96	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Humano	
<400>	96	
ttgagtccag	gttatccatg	ac
		22
<210>	97	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Humano	
<400>	97	
gattcctttgg	gattgggact	
		20
<210>	98	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Humano	
<400>	98	
atcctttggcc	tacaggaacc	
		20
<210>	99	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Humano	
<400>	99	
atcaacacca	attcggagct	
		20
<210>	100	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Humano	
<400>	100	
ccagcaccat	gtc gatgac	
		19
<210>	101	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Humano	
<400>	101	

tggcagacct gaagacaatg		20
<210>	102	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Humano	
<400>	102	
aaattcctcc atgatgcgg		19
<210>	103	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Humano	
<400>	103	
cagaatatgg tgcactgtgc		20
<210>	104	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Humano	
<400>	104	
agtctatgaa gccacactgt g		21
<210>	105	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	Humano	
<400>	105	
atcagactga agagctttgt aatgacca		28
<210>	106	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Humano	
<400>	106	
tggttatat ccaacacttc gtg		23
<210>	107	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	Humano	
<400>	107	
caaggactgg tctttctatc tcttgt		26
<210>	108	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Humano	
<400>	108	
gtggagcaac ctgctcagat ac		22

<210>	109	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Humano	
<400>	109	
	agagcatcta cggtgagcg	19
<210>	110	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	Humano	
<400>	110	
	cttccgcacc acctcca	17
<210>	111	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Humano	
<400>	111	
	aagaatcatc atgtgcgctt	20
<210>	112	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Humano	
<400>	112	
	gtgtgtataa agtcacctgg ctt	23
<210>	113	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	113	
	ggttgctcag atctgcaca	19
<210>	114	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	114	
	ttgctcagat ctgca	15
<210>	115	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Humano	
<220>		
<221>	Região de interesse biológico	
<223>	Nucleotídeos nas posições 1, 2, 3, 4, 10, 11, 18, 19, 20, 21 são 2'-deóxi-2'-fluoroarabinonucleotídeos.	
<220>		

<221> Região de interesse biológico
 <223> Todos os nucleotídeos estão ligados por ligações de fosforotio-
 ato.

<400> 115
 tcatgagtgg cagctgcaat t 21

<210> 116
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Humano

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Nucleotídeos nas posições 1, 2, 5, 6, 10, 11, 12, 18, 19, 20, 21
 são 2'-deóxi-2'-fluoroarabinonucleotídeos.

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Todos os nucleotídeos estão ligados por ligações de fosforotio-
 ato.

<400> 116
 tcatgagtgg cagctgcaat t 21

<210> 117
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Humano

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Todos os nucleotídeos estão ligados por ligações de fosforotio-
 ato.

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Nucleotídeos nas posições 1, 2, 3, 4, 5, 16, 17, 18, 19, 20, 21
 são 2'-deóxi-2'-fluoroarabinonucleotídeos.

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <222> (11)..(11)
 <223> Inosina

<400> 117
 gggtgctcag ntctgcacag t 21

<210> 118
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Humano

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Todos os nucleotídeos estão ligados por ligações de fosforotio-
 ato.

<220>
 <221> Região de interesse biológico

<223> Nucleotídeos nas posições 1, 2, 17, 18, 19, 20, 21 são 2'-deóxi-2'-fluoroarabinonucleotídeos.

<220>

<221> Região de interesse biológico

<222> (11)..(11)

<223> Inosina

<400> 118

ggttgctcag ntctgcacag t

21

<210> 119

<211> 19

<212> DNA

<213> Humano

<220>

<221> Região de interesse biológico

<223> Todos os nucleotídeos estão ligados por ligações de fosforotioato.

<220>

<221> Região de interesse biológico

<223> Nucleotídeos nas posições 1, 2, 15, 16, 17, 18, 19 são 2'-deóxi-2'-fluoroarabinonucleotídeos.

<220>

<221> Região de interesse biológico

<222> (4)..(4)

<223> Inosina

<220>

<221> Região de interesse biológico

<222> (13)..(13)

<223> Inosina

<400> 119

attntacatc aangcaagt

19

<210> 120

<211> 19

<212> DNA

<213> Humano

<220>

<221> Região de interesse biológico

<223> Todos os nucleotídeos estão ligados por ligações de fosforotioato.

<220>

<221> Região de interesse biológico

<223> Nucleotídeos nas posições 1, 2, 7, 8, 9, 15, 16, 17, 18, 19 são 2'-deóxi-2'-fluoroarabinonucleotídeos.

<220>

<221> Região de interesse biológico

<222> (4)..(4)

<223> Inosina

<220>

<221> Região de interesse biológico

<222> (13)..(13)

<223> Inosina

<400> 120
attntacatc aangcaagt

19

<210> 121

<211> 19

<212> DNA

<213> Humano

<220>

<221> Região de interesse biológico

<223> Todos os nucleotídeos estão ligados por ligações de fosforotio-
ato.

<220>

<221> Região de interesse biológico

<223> Nucleotídeos nas posições 1, 2, 3, 4, 5, 14, 15, 16, 17, 18, 19
são 2'-deóxi-2'-fluoroarabinonucleotídeos.

<220>

<221> Região de interesse biológico

<222> (11)..(11)

<223> Inosina

<400> 121
ggttgctcag ntctgcaca

19

<210> 122

<211> 19

<212> DNA

<213> Humano

<220>

<221> Região de interesse biológico

<223> Todos os nucleotídeos estão ligados por ligações de fosforotio-
ato.

<220>

<221> Região de interesse biológico

<223> Nucleotídeos nas posições 1, 2, 15, 16, 17, 18, 19 são 2'-deóxi-
2'-fluoroarabinonucleotídeos.

<220>

<221> Região de interesse biológico

<222> (11)..(11)

<223> Inosina

<400> 122
ggttgctcag ntctgcaca

19

<210> 123

<211> 19

<212> DNA

<213> Humano

<220>

<221> Região de interesse biológico

<223> Todos os nucleotídeos estão ligados por ligações de fosforotio-
ato.

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Nucleotídeos nas posições 1, 2, 7, 8, 9, 15, 16, 17, 18, 19 são 2'-deóxi-2'-fluoroarabinonucleotídeos.

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <222> (11)..(11)
 <223> Inosina

<400> 123
 gggtgctcag ntctgcaca 19

<210> 124
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Humano

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Todos os nucleotídeos estão ligados por ligações de fosforotio-ato.

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Nucleotídeos nas posições 1, 2, 16, 17, 18, 19 são 2'-deóxi-2'-fluoroarabinonucleotídeos.

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <222> (11)..(11)
 <223> Inosina

<400> 124
 gggtgctcag ntctgcaca 19

<210> 125
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Humano

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Todos os nucleotídeos estão ligados por ligações de fosforotio-ato.

<220>
 <221> Região de interesse biológico
 <223> Nucleotídeos nas posições 1, 2, 16, 17, 18, 19 são 2'-deóxi-2'-fluoroarabinonucleotídeos.

<400> 125
 gggtgctcag atctgcaca 19

<210> 126
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Humano

<220>
<221> Região de interesse biológico
<223> Todos os nucleotídeos estão ligados por ligações de fosforotio-
ato.

<220>
<221> Região de interesse biológico
<223> Nucleotídeos nas posições 1, 2, 3, 13, 14, 15 são 2'-deóxi-2'-
fluoroarabinonucleotídeos.

<400> 126
ttgctcagat ctgca 15

REIVINDICAÇÕES

1. Oligonucleotídeo que tem uma sequência de bases selecionada do grupo que consiste em (i) SEQ ID N^{os}: 1-92 e 113-126 e (ii) SEQ ID N^{os}: 1-92 e 113-126 contendo uma inserção, deleção ou substituição de base.

2. Oligonucleotídeo de acordo com a reivindicação 1, tendo uma sequência de bases selecionadas de SEQ ID N^{os}: 1-92 e 113-126.

3. Oligonucleotídeo de acordo com a reivindicação 1, tendo uma cadeia principal de fosfodiéster.

4. Oligonucleotídeo de acordo com a reivindicação 1, tendo uma cadeia principal de fosforotioato.

5. Oligonucleotídeo de acordo com a reivindicação 4, em que pelo menos um nucleotídeo do oligonucleotídeo é um 2'-desóxi-2'-fluorarabinonucleotídeo.

6. Oligonucleotídeo de acordo com a reivindicação 5, selecionado do grupo que consiste nas SEQ ID N^{os}: 41-88 e 115-126.

7. Composição farmacêutica que compreende pelo menos um oligonucleotídeo conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 6, em combinação com um veículo farmacêuticamente aceitável.

8. Composição farmacêutica que compreende pelo menos dois oligonucleotídeos conforme definidos em qualquer uma das reivindicações 1 a 6 em combinação com um veículo farmacêuticamente aceitável.

9. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 8, em que um primeiro oligonucleotídeo dos pelo menos dois oligonucleotídeos é direcionado contra PDE7A.

10. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 9, em que um segundo oligonucleotídeo dos pelo menos dois oligonucleotídeos é direcionado contra PDE4B e PDE4D.

11. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 10, em que os pelo menos dois oligonucleotídeos são selecionados do grupo que consiste nas SEQ ID N^{os}: 41-88 e 115-126.

12. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 11,

em que os pelo menos dois oligonucleotídeos são SEQ ID Nº: 2 e SEQ ID Nº: 14.

13. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 11, em que os pelo menos dois oligonucleotídeos são SEQ ID Nº: 2 e SEQ ID Nº: 24.

14. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 11, em que os pelo menos dois oligonucleotídeos são SEQ ID Nº: 2 e SEQ ID Nº: 37.

15. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 11, em que os pelo menos dois oligonucleotídeos são SEQ ID Nº: 2 e SEQ ID Nº: 40.

16. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 11, em que os pelo menos dois oligonucleotídeos são SEQ ID Nº: 2 e SEQ ID Nº: 85.

17. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 11, em que os pelo menos dois oligonucleotídeos são SEQ ID Nº: 2 e SEQ ID Nº: 122.

18. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 11, em que os pelo menos dois oligonucleotídeos são SEQ ID Nº: 53 e SEQ ID Nº: 14.

19. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 11, em que os pelo menos dois oligonucleotídeos são SEQ ID Nº: 53 e SEQ ID Nº: 24.

20. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 11, em que os pelo menos dois oligonucleotídeos são SEQ ID Nº: 53 e SEQ ID Nº: 37.

21. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 11, em que os pelo menos dois oligonucleotídeos são SEQ ID Nº: 53 e SEQ ID Nº: 40.

22. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 11, em que os pelo menos dois oligonucleotídeos são SEQ ID Nº: 53 e SEQ ID Nº: 85.

23. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 11, em que os pelo menos dois oligonucleotídeos são SEQ ID Nº: 53 e SEQ ID Nº: 122.

5 24. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 11, em que os pelo menos dois oligonucleotídeos são SEQ ID Nº: 54 e SEQ ID Nº: 14.

25. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 11, em que os pelo menos dois oligonucleotídeos são SEQ ID Nº: 54 e SEQ ID Nº: 24.

10 26. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 11, em que os pelo menos dois oligonucleotídeos são SEQ ID Nº: 54 e SEQ ID Nº: 37.

15 27. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 11, em que os pelo menos dois oligonucleotídeos são SEQ ID Nº: 54 e SEQ ID Nº: 40.

28. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 11, em que os pelo menos dois oligonucleotídeos são SEQ ID Nº: 54 e SEQ ID Nº: 85.

20 29. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 11, em que os pelo menos dois oligonucleotídeos são SEQ ID Nº: 54 e SEQ ID Nº: 122.

30. Método para tratar um paciente tendo uma doença associada ao cAMP reduzido, que compreende administrar uma composição farmacêutica conforme definida em qualquer uma das reivindicações 7 a 29.

25 31. Método para tratar inflamação respiratória em um paciente, que compreende administrar uma composição farmacêutica conforme definida em qualquer uma das reivindicações 7 a 29.

30 32. Método de acordo com a reivindicação 31, em que a inflamação respiratória é causada por qualquer uma de doença pulmonar obstrutiva crônica, asma, tosse eosinofílica, bronquite, rejeição aguda e crônica de aloenxerto pulmonar, sarcoidose, fibrose pulmonar, rinite, sinusite, infecção viral ou uma doença neoplásica.

33. Método de acordo com a reivindicação 32, em que a doença é a doença pulmonar crônica obstrutiva.

34. Uso de uma composição farmacêutica conforme definida em qualquer uma das reivindicações 7 a 29, na preparação de um medicamento para o tratamento de uma doença associada ao cAMP reduzido.

35. Uso de uma composição farmacêutica conforme definida em qualquer uma das reivindicações 7 a 29, na preparação de um medicamento para o tratamento de inflamação respiratória.

36. Uso de acordo com a reivindicação 35, em que a inflamação respiratória é causada por qualquer uma de doença pulmonar obstrutiva crônica, asma, tosse eosinofílica, bronquite, rejeição aguda e crônica de aloenxerto pulmonar, sarcoidose, fibrose pulmonar, rinite, sinusite, infecção viral ou uma doença neoplásica.

37. Uso de acordo com a reivindicação 36, em que a doença é doença pulmonar crônica obstrutiva.

38. Uso de uma composição farmacêutica conforme definida em qualquer uma das reivindicações 7 a 29, no tratamento de uma doença associada ao cAMP reduzido.

39. Uso de uma composição farmacêutica conforme definida em qualquer uma das reivindicações 7 a 29, no tratamento de inflamação respiratória.

40. Uso de acordo com a reivindicação 39, em que a inflamação respiratória é causada por qualquer uma de doença pulmonar obstrutiva crônica, asma, tosse eosinofílica, bronquite, rejeição aguda e crônica de aloenxerto pulmonar, sarcoidose, fibrose pulmonar, rinite, sinusite, infecção viral ou uma doença neoplásica.

41. Uso de acordo com a reivindicação 40, em que a doença é doença pulmonar crônica obstrutiva.

42. Composição farmacêutica que compreende dois oligonucleotídeos tendo SEQ ID N°: 54 e SEQ ID N°: 122 juntos com um veículo farmacêuticamente aceitável.

43. Oligonucleotídeos que é pelo menos 80% complementar a

um mRNA de pelo menos um de PDE3A, PDE3B, PDE4A, PDE4B, PDE4C, PDE4D, PDE7A1, PDE7A2, PDE7A3 e PDE7B, em que pelo menos um nucleotídeo do oligonucleotídeo é um 2'-desóxi-2'-fluorarabinonucleotídeo.

5 44. Oligonucleotídeo de acordo com a reivindicação 43, que é pelo menos 85% complementar ao mRNA.

45. Oligonucleotídeo de acordo com a reivindicação 43, que é pelo menos 90% complementar ao mRNA.

46. Oligonucleotídeo de acordo com a reivindicação 43, que é pelo menos 95% complementar ao mRNA.

10 47. Oligonucleotídeo de acordo com a reivindicação 43, que é pelo menos 100% complementar ao mRNA.

48. Oligonucleotídeo de acordo com a reivindicação 43, que tem uma sequência de bases selecionada do grupo que consiste em (i) SEQ ID N^os: 1-92 e 113-126 e (ii) SEQ ID N^os: 1-92 e 113-126 contendo uma inser-
15 ção, deleção ou substituição de base.

49. Composição farmacêutica que compreende pelo menos um oligonucleotídeo, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 43 a 48, em combinação com um veículo farmaceuticamente aceitável.

20 50. Composição farmacêutica que compreende pelo menos dois oligonucleotídeos, conforme definidos em qualquer uma das reivindicações 43 a 48, em combinação com um veículo farmaceuticamente aceitável.

51. Método para tratar um paciente tendo uma doença associada ao cAMP reduzido, que compreende administrar uma composição farmacêutica conforme definida em qualquer uma das reivindicações 49 e 50.

25 52. Método para tratar um paciente tendo inflamação respiratória, que compreende administrar uma composição farmacêutica conforme definida em qualquer uma das reivindicações 49 e 50.

30 53. Uso de uma composição farmacêutica, conforme definida em qualquer uma das reivindicações 49 e 50, na preparação de um medicamento para o tratamento de uma doença associada ao cAMP reduzido.

54. Uso de uma composição farmacêutica, conforme definida em qualquer uma das reivindicações 49 e 50, na preparação de um medicamen-

to para o tratamento de inflamação respiratória.

55. Uso de uma composição farmacêutica, conforme definida em qualquer uma das reivindicações 49 e 50, no tratamento de uma doença associada ao cAMP reduzido.

- 5 56. Uso de uma composição farmacêutica, conforme definida em qualquer uma das reivindicações 49 e 50, no tratamento de inflamação respiratória.

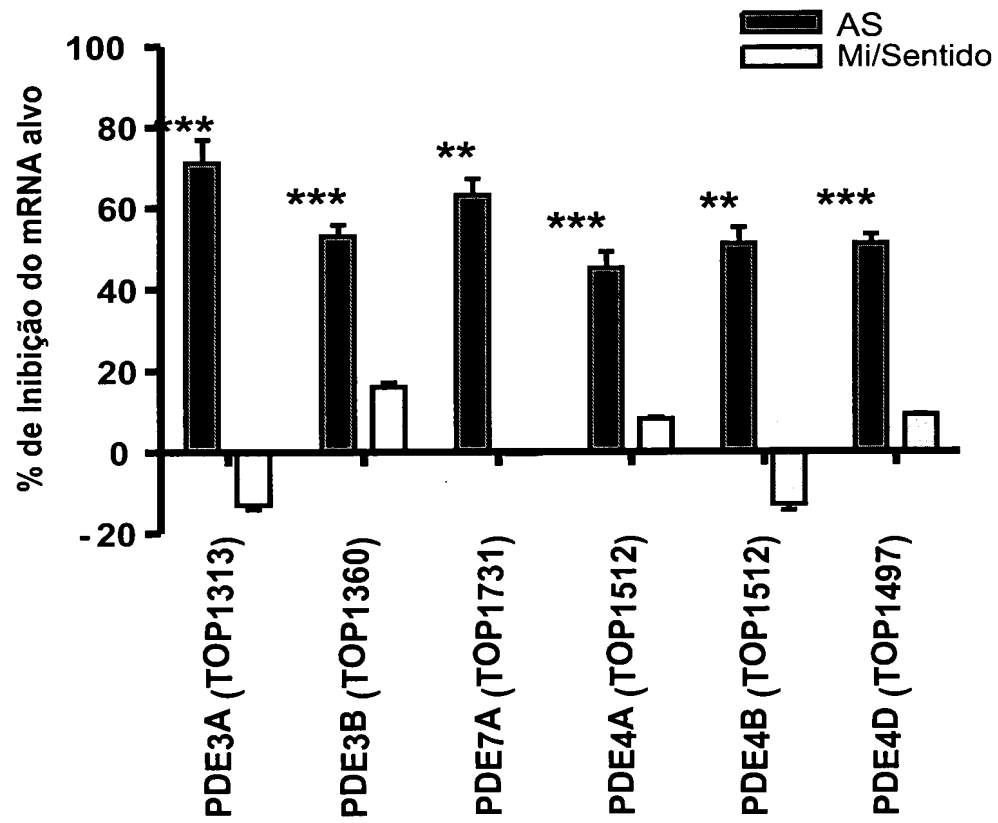
Fig.1a

Fig.1b

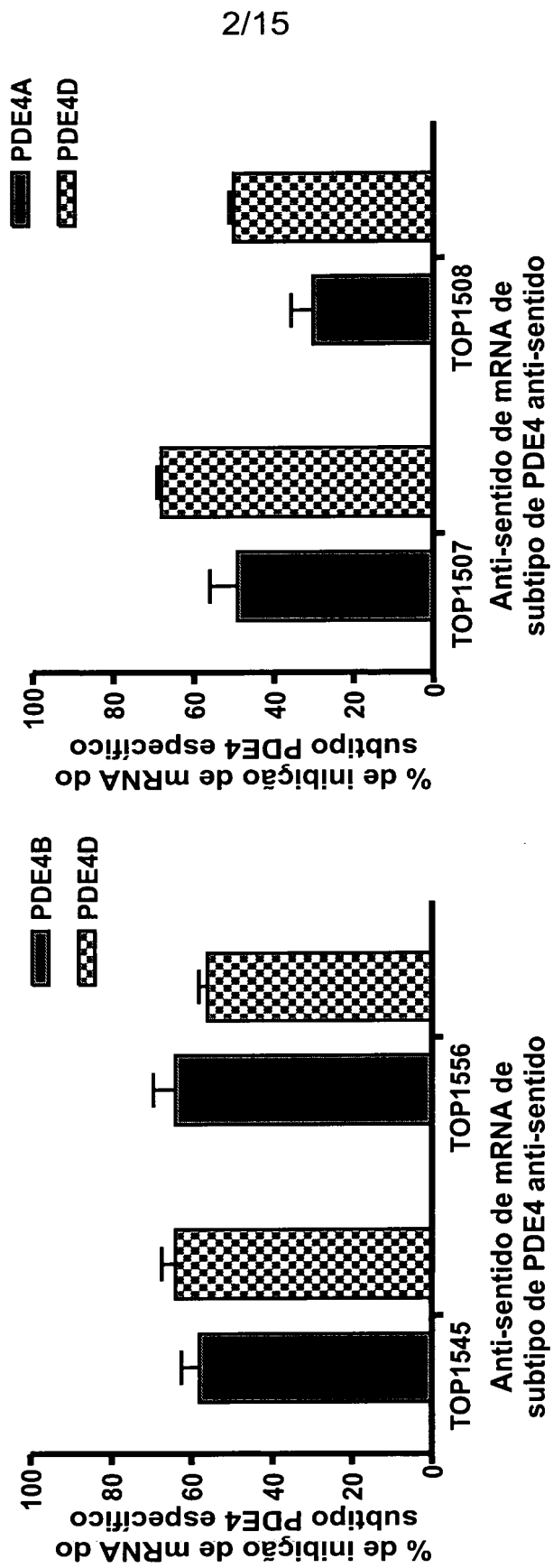


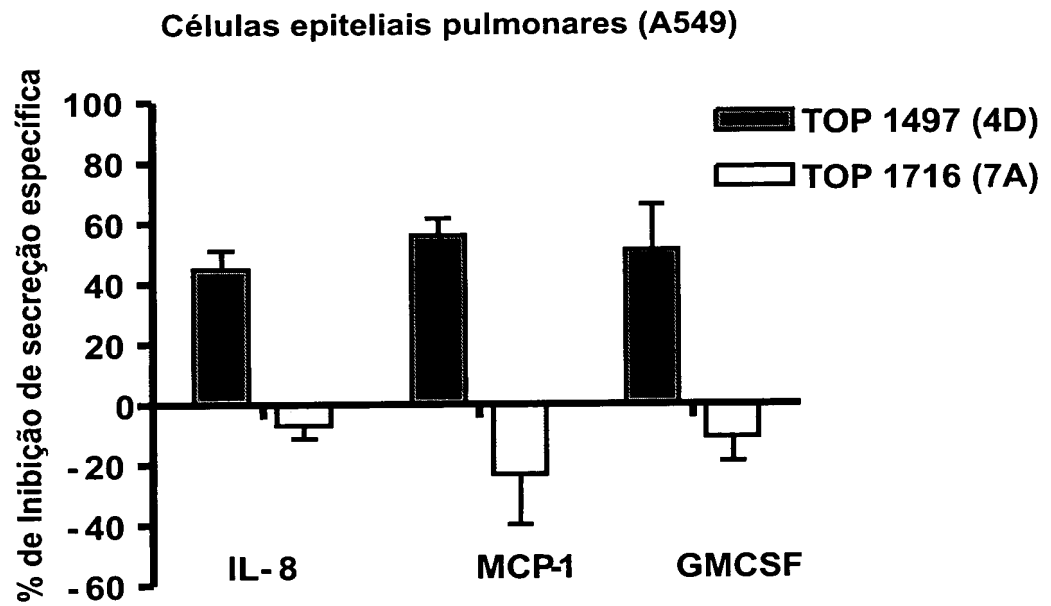
Fig.2

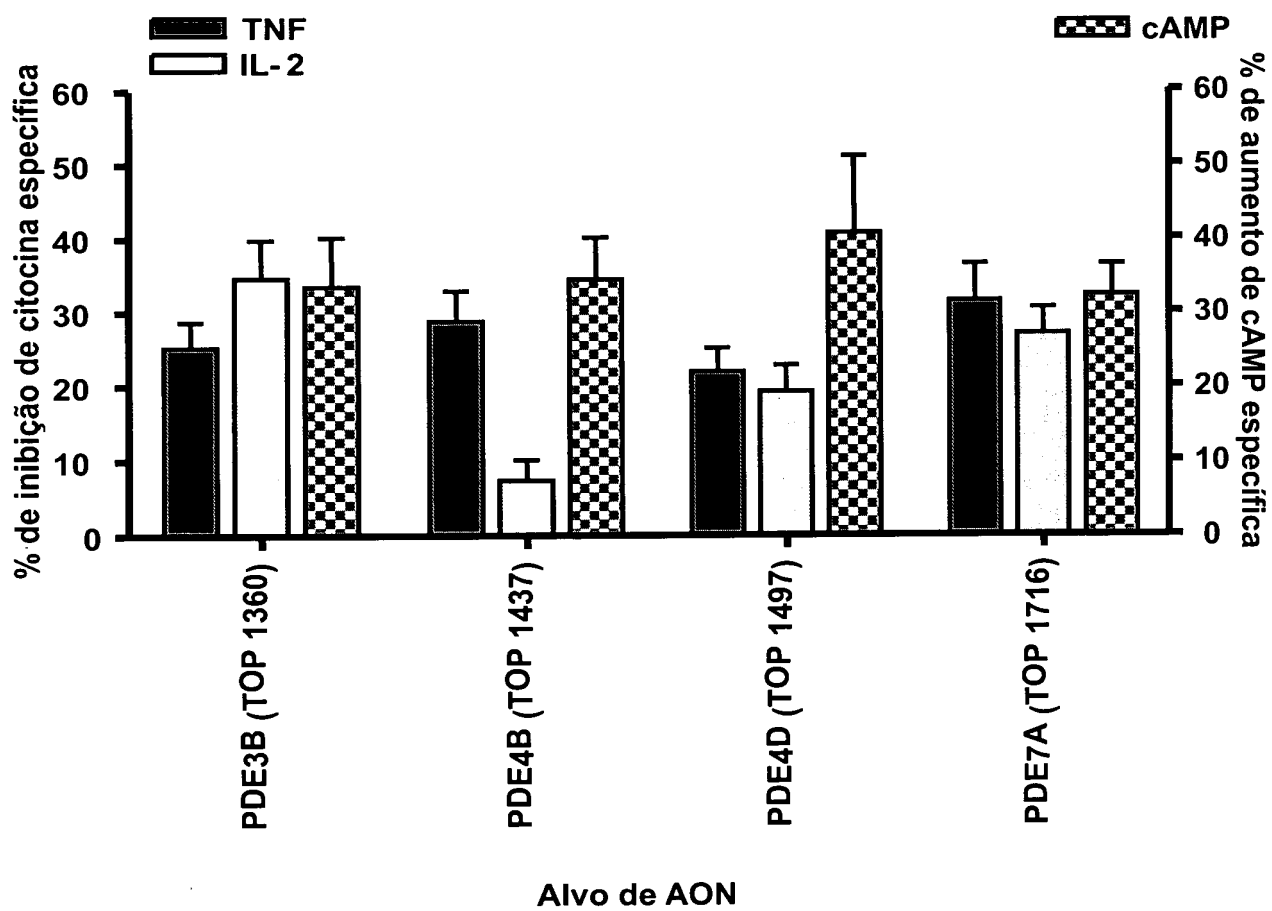
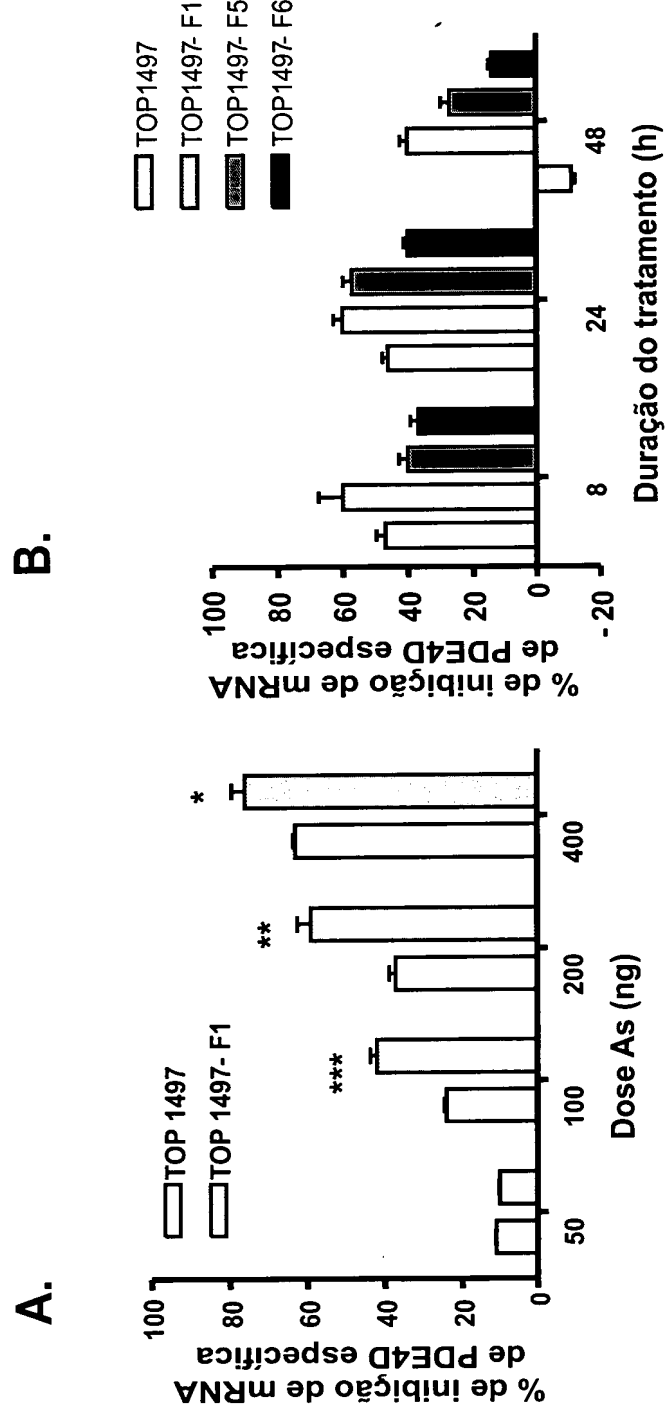
Fig.3

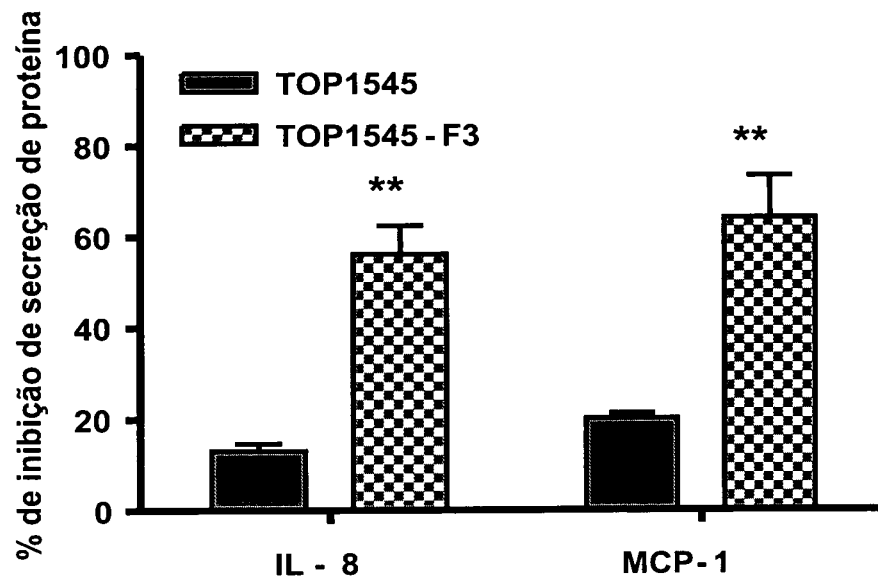
Fig.4



TOP1497	ctgcctccctcttttcaacctg
TOP1497-F1	CTGCCCT cctcttttca ACCTG
TOP1497-F5	CTgcctccctcttttca ACCTG
TOP1497-F6	ctgcctccctcttttca ACCTG

Letra minúscula = PS-DNA

LETRA MAIÚSCULA = PS-FANA

Fig.5

tctgccccatgtctccca

TOP 1545

TCtgccccatgtctCCCA

TOP 1545- F3

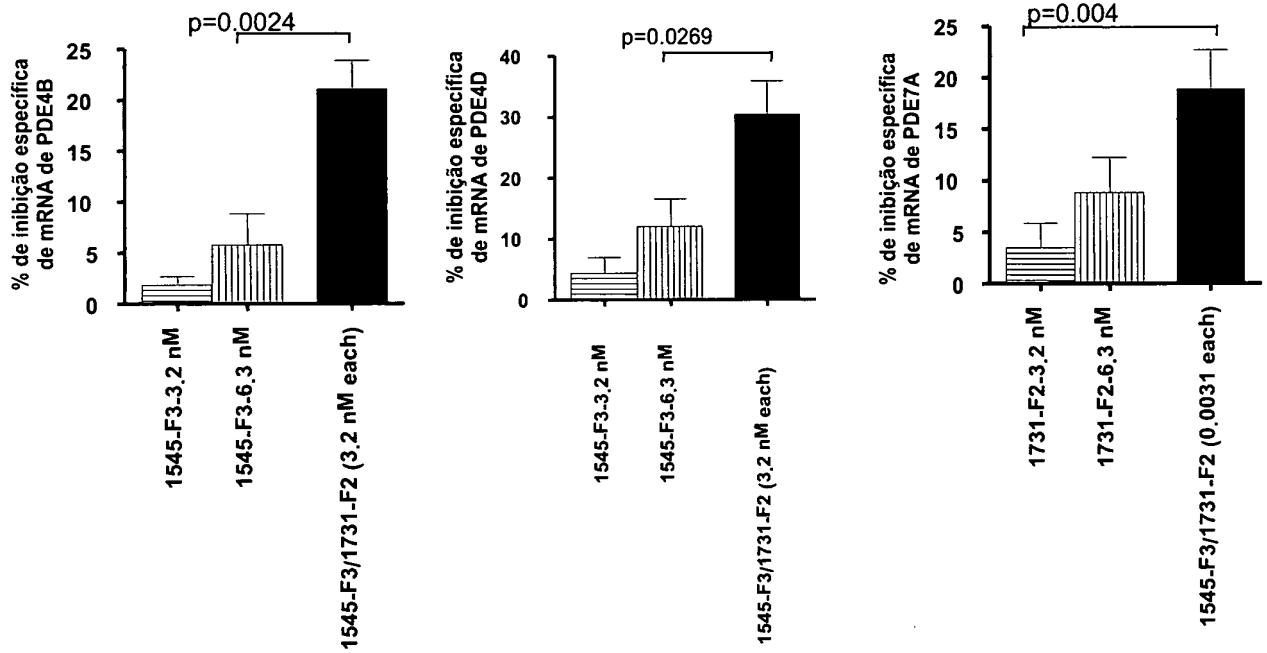
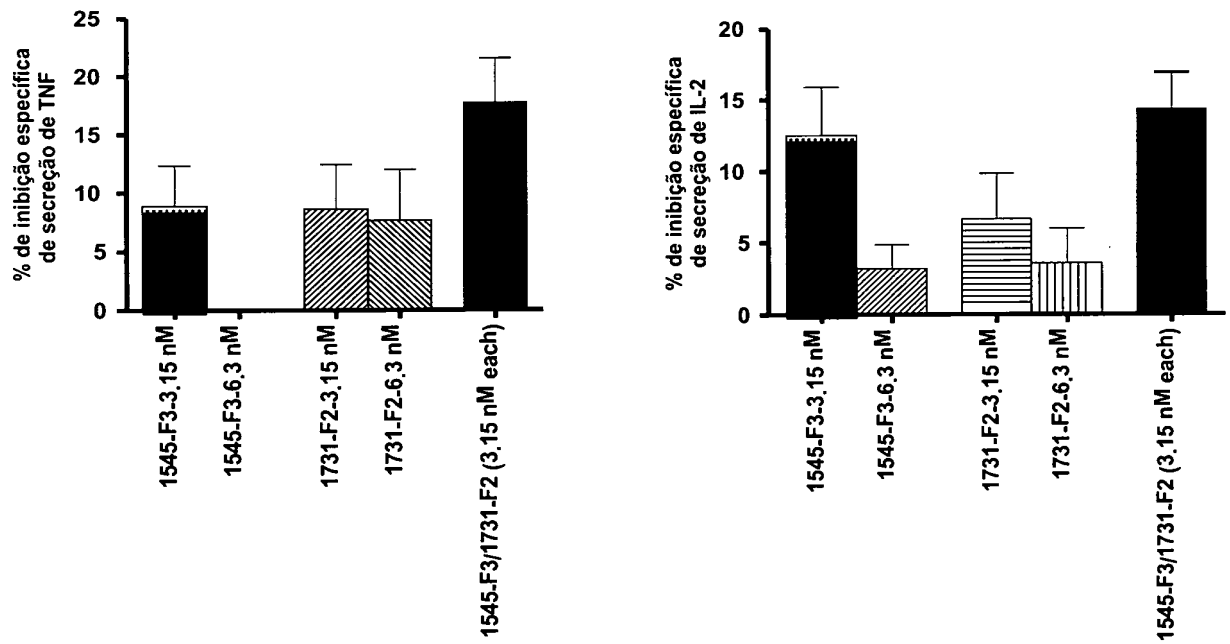
Fig.6**A.****B.**

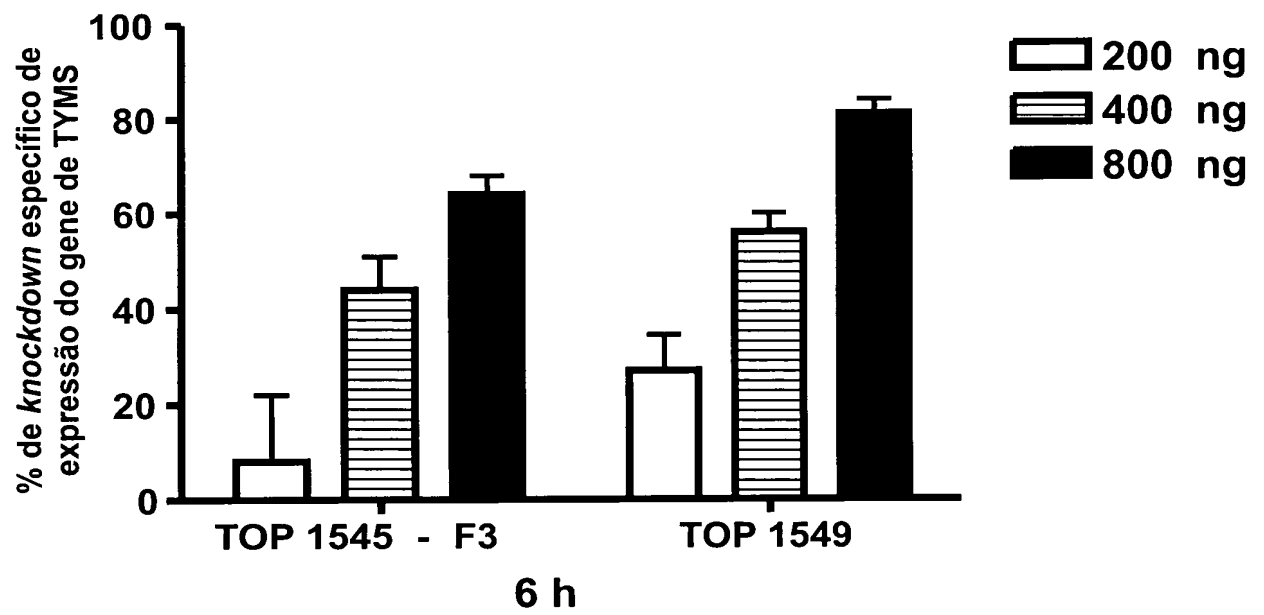
Fig.7

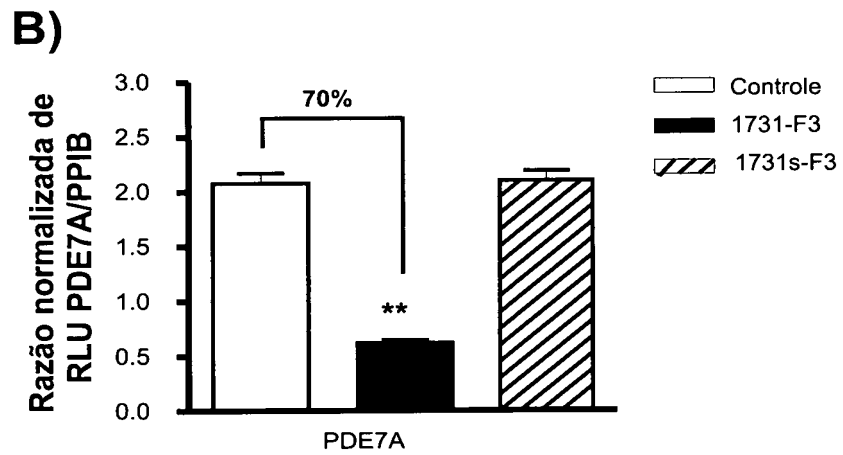
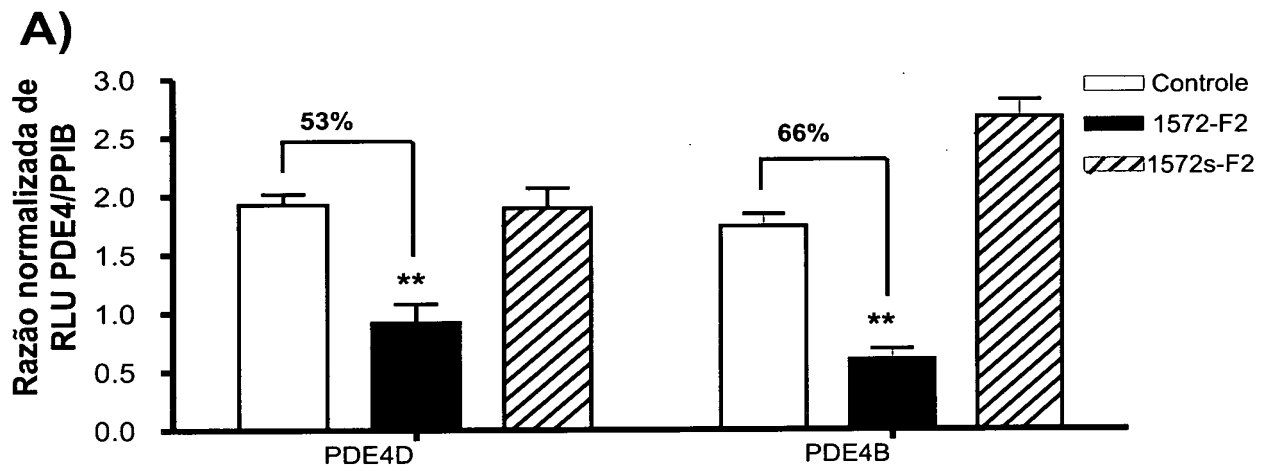
Fig.8

Fig. 9

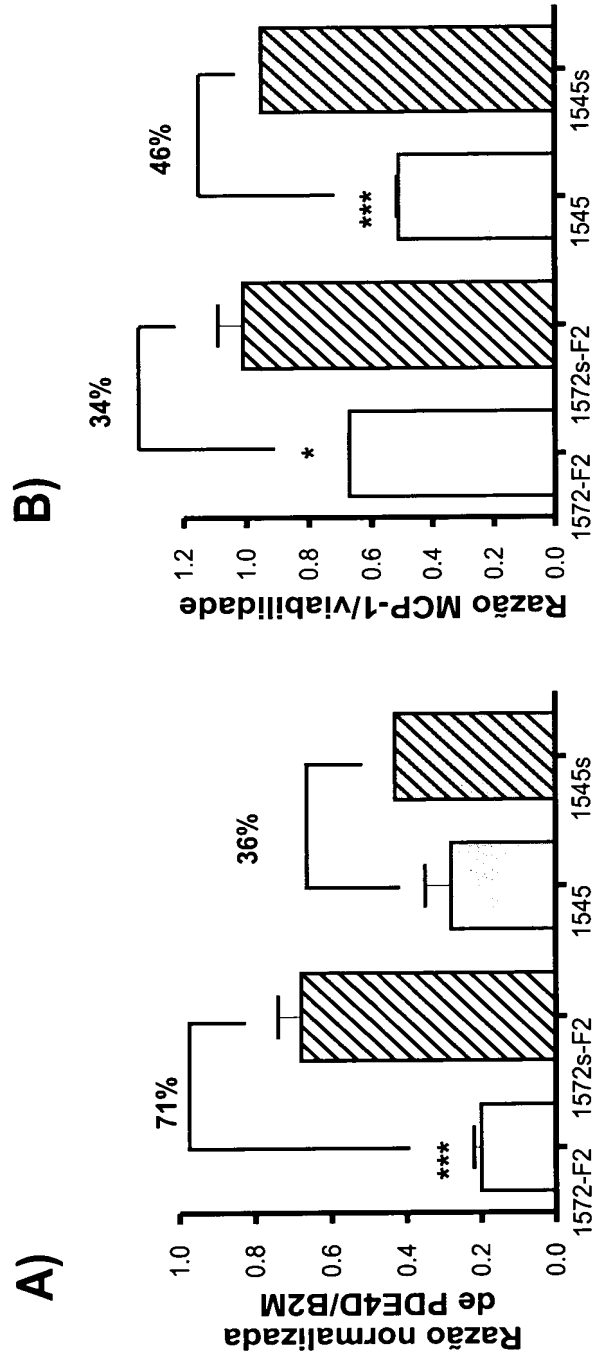


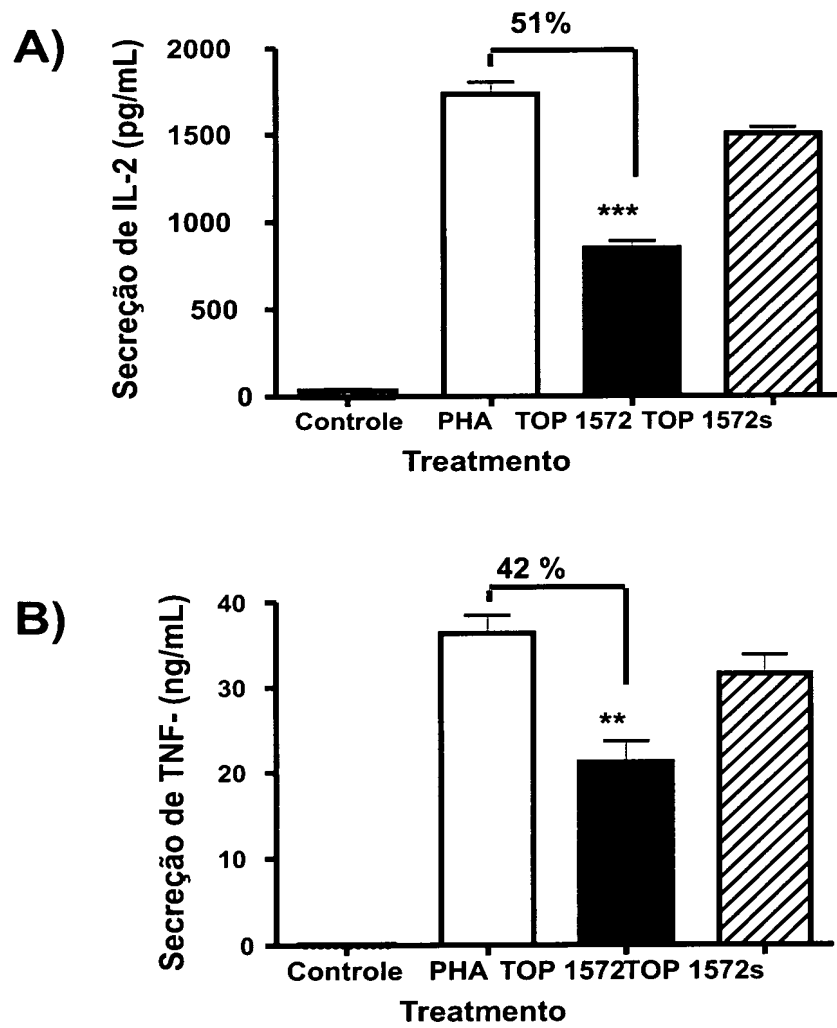
Fig. 10

Fig. 11

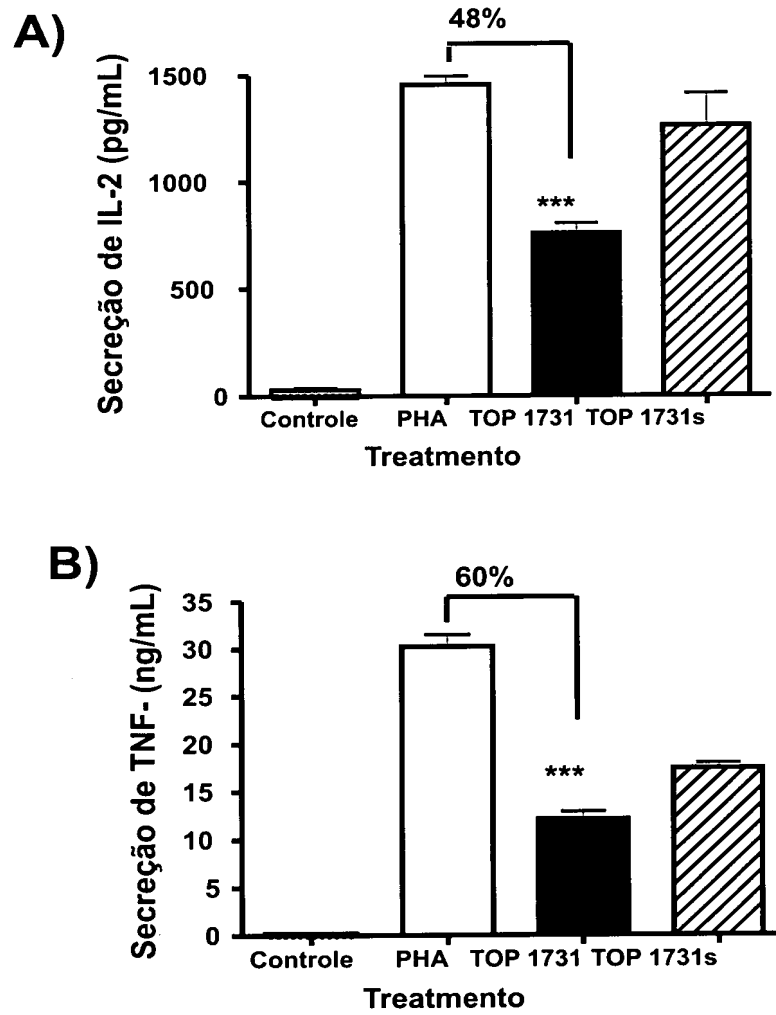


Fig. 12

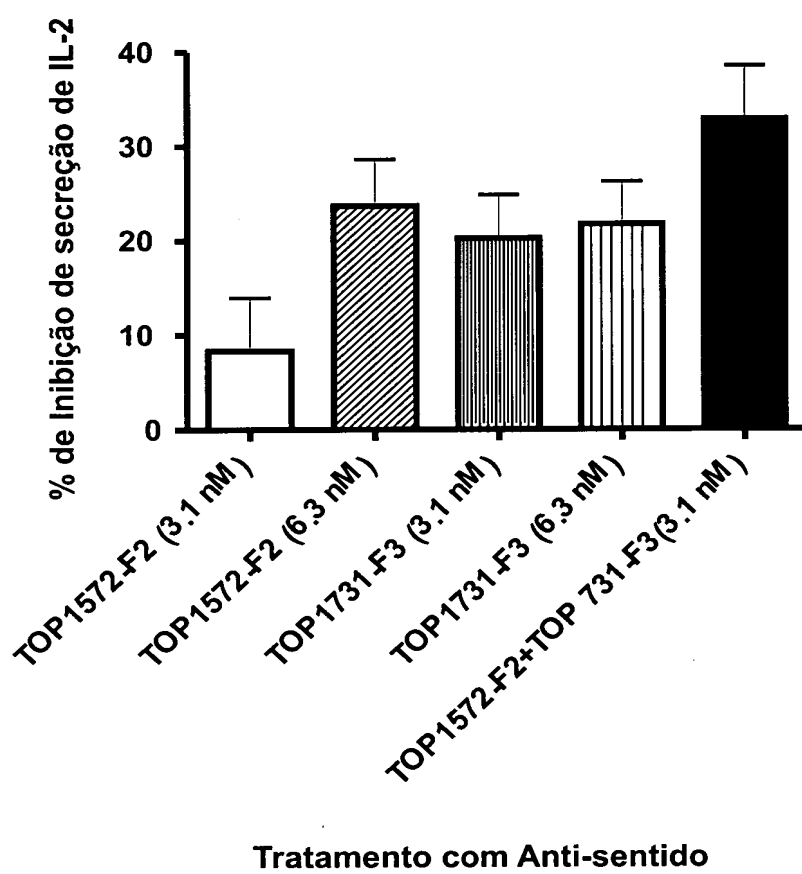
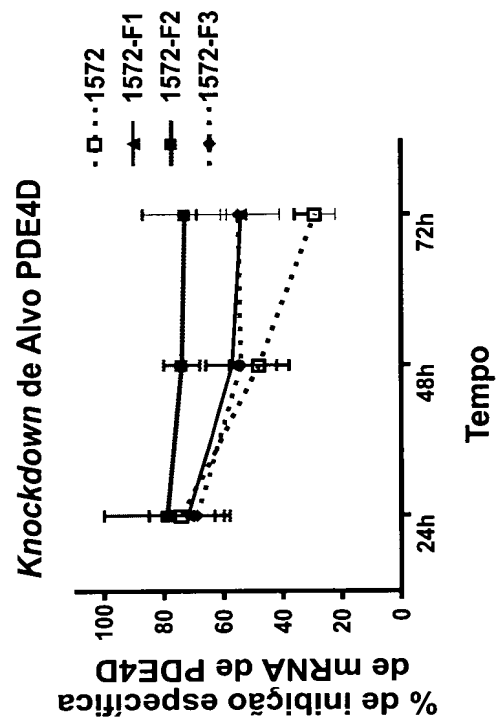


Fig. 13

A)



B)

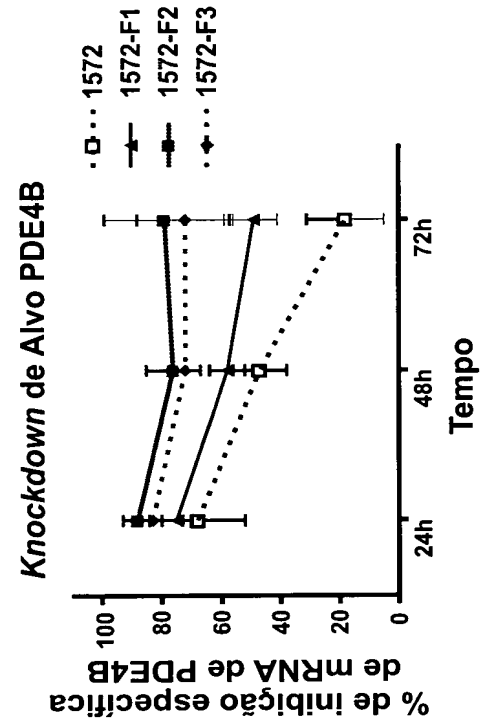
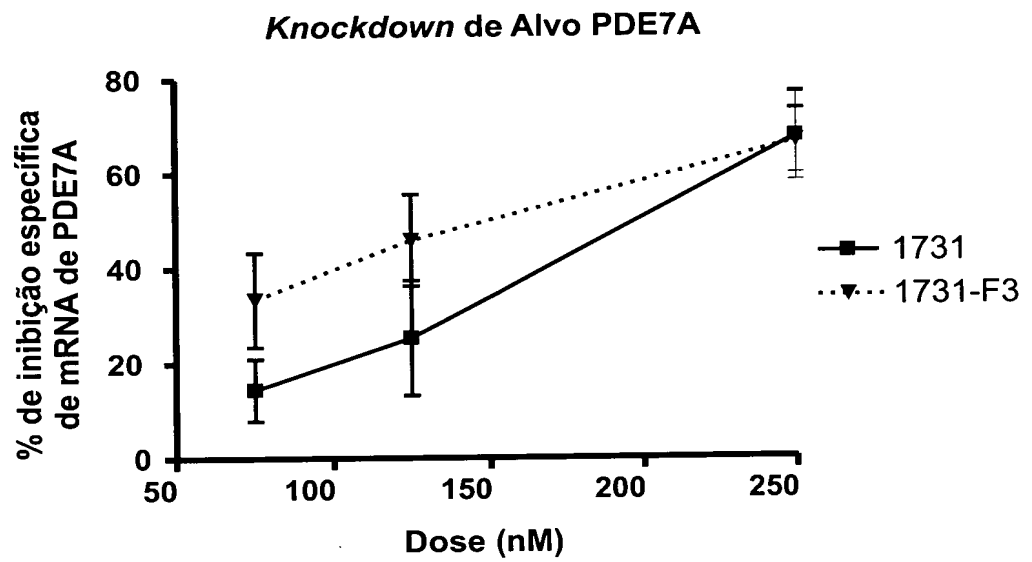


Fig. 14

RESUMO

Patente de Invenção: "**OLIGONUCLEOTÍDEOS QUE AFETAM A EXPRESSÃO DAS FOSFODIESTERASES**".

5 A presente invenção refere-se a oligonucleotídeos anti-sentido, terapêuticos, direcionados contra genes que codificam fosfodiesterases (PDE) e o uso destes oligonucleotídeos anti-sentido em combinação. Esses oligonucleotídeos anti-sentido podem ser usados como ferramentas analíticas e/ou como agentes terapêuticos no tratamento de doença associada ao cAMP celular reduzido em um paciente, tais como doenças inflamatórias do

10 aparelho respiratório incluindo, por exemplo, asma, doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD), síndrome de angústia respiratória aguda, bronquite, bronquite crônica, silicose, fibrose pulmonar, rejeição a aloenxerto pulmonar, rinite alergia e sinusite crônica, bem como outras condições onde um aumento no AMP cíclico ou uma redução nos níveis da PDE é benéfico.