



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

(21) PI 1106312-2 A2



* B R P I 1 1 0 6 3 1 2 A 2 *

(22) Data de Depósito: 05/07/2011

(43) Data da Publicação: 11/02/2014

(RPI 2249)

(51) Int.Cl.:

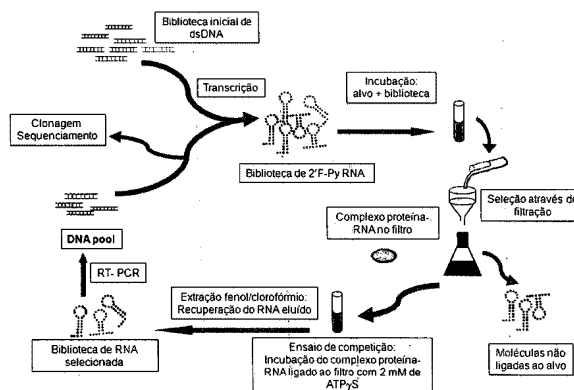
C12N 15/115

(54) Título: SEQUENCIAS DE RIBONUCLEOTÍDEOS QUIMICAMENTE MODIFICADAS COMO MODULADORES DA ATIVIDADE DE RECEPTORES PURINÉRGICOS P2Y2 E APTÂMERO B7

(73) Titular(es): FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO - FAPESP, UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SÃO PAULO USP, UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI

(72) Inventor(es): ALEXANDER HENNING ULRICH, KATIA DAS NEVES GOMES, RODRIGO RIBEIRO RESENDE

(57) Resumo: SEQUÊNCIAS DE RIBONUCLEOTÍDEOS QUIMICAMENTE MODIFICADAS COMO MODULADORES DA ATIVIDADE DE RECEPTORES PURINÉRGICOS P2Y2 E APTÂMERO B7. A presente invenção refere-se a uma família de 21 sequências de ribonucleotídeos modificadas quimicamente pela substituição do grupo 2'-OH dos nucleotídeos de pirimidina por um átomo de Flúor: 2'-F-dCTP e 2'-F-dCUTP com alta afinidade de ligação ao receptor purinérgico P2Y2, sendo relevantes em qualquer processo que envolva a sinalização purinérgica via o receptor P2Y2, incluindo, mas não limitando, o seu uso como reagente em ensaios farmacológicos (in vivo e in vitro, de citômica, em testes de diagnóstico e como antagonista em aplicações terapêuticos como, por exemplo, fibrose cística, lesão e enfisema de pulmão em fumantes e neoplasias, cardio e neuroproteção e neurodegeneração como, por exemplo, na glicose reativa causada por neuroinflamação. Particularmente, a presente invenção descreve o aptâmero B7, apresentando uma considerável afinidade e especificidade de ligação ao receptor purinérgico P2Y2, mostrando uma atividade biológica inibitória sobre mesmo.



**SEQUÊNCIAS DE RIBONUCLEOTÍDEOS QUIMICAMENTE MODIFICADAS COMO
MODULADORES DA ATIVIDADE DE RECEPTORES PURINÉRGICOS P2Y2 E
APTÂMERO B7**

Campo de Aplicação da Invenção

5 A presente invenção é aplicada para direcionar a
identificação de ligantes de ácidos nucléicos para os demais
subtipos dos receptores purinérgicos, sendo que as moléculas
de ribonucleotídeos apresentadas são relevantes em qualquer
processo que envolva a sinalização purinérgica via o
10 receptor P2Y2, incluindo, o seu uso como reagente em ensaios
farmacológicos (*in vivo* e *in vitro*) e de citômica, em testes
para diagnósticos e na forma de antagonista em aplicações
terapêuticas como, por exemplo, lesão e enfisema de pulmão
em fumantes e neoplasias, cardio e neuroproteção e
15 neurodegeneração, como na glicose reativa causada por
neuroinflamação.

Fundamentos da Invenção

**SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential
enrichment)**

20 Para a obtenção dos produtos alvos desta patente, foi
utilizada uma técnica de química combinatória descrita a
seguir.

A química combinatória é uma importante tecnologia para
a indústria, bem como para pesquisas biotecnológicas e
25 farmacêuticas, e tem sido utilizada para a identificação de
novos materiais com propriedades desejadas. Esta ferramenta
é caracterizada pela síntese e análise simultânea de grandes
bibliotecas constituídas de compostos relacionados, mas
estruturalmente distintos, sendo que a probabilidade de
30 sucesso na identificação de moléculas funcionais cresce com

a diversidade da biblioteca (Stoltenburg et al., 2007, Ulrich and Trujillo, 2008).

Os ácidos nucleicos são compostos atrativos para a química combinatória, já que eles se dobram em estruturas secundárias e terciárias definidas e podem ser amplificados por síntese enzimática. Bibliotecas complexas de oligonucleotídeos, com aproximadamente 10^{15} moléculas diferentes, podem ser obtidas por síntese química e então utilizadas para a identificação de compostos com uma função particular, tal como alta afinidade de ligação a um determinado alvo (aptâmeros) ou atividade catalítica (ribozimas e DNAzimas) (Stoltenburg et al., 2007, Ulrich and Trujillo, 2008).

Em 1990, um novo método foi descrito para selecionar, a partir de bibliotecas combinatórias de ácidos nucleicos (DNA ou RNA), oligonucleotídeos que se ligam com alta afinidade e especificidade a alvos moleculares determinados. Esta técnica, denominada SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment) foi desenvolvida simultaneamente e independentemente por Tuerk e Gold e por Ellington and Szostak (Tuerk e Gold., 1990 Ellington and Szostak., 1990) (U.S. Pat. No. 5,475,096 Gold and Tuerk, 1995; U.S. Pat. No 5,270,163 Gold and Tuerk, 1993)). Os oligonucleotídeos funcionais identificados nesse procedimento são denominados aptâmeros (do latim, *aptus* significa ligar/encaixar, e do grego, *meros* significa partícula) (Ellington and Szostak, em 1990).

Desde a sua primeira descrição, a técnica SELEX tem sido usada para selecionar, de bibliotecas combinatórias complexas de oligonucleotídeos (aproximadamente 10^{15}

sequências diferentes), moléculas de RNA e DNA com alta afinidade e especificidade (aptâmeros) contra uma ampla variedade de alvos, que incluem: íons (Ciesiolka et al., 1995), nucleotídeos (Sassanfar and Szostak, 1993), ácidos
5 nucléicos (Ko et al., 1999), carboidratos (Yang et al., 1998), aminoácidos (Geiger et al., 1996), peptídeos (Bock et al., 1992), antibióticos (Berens et al., 2001), alvos complexos como receptores de membrana (Ulrich et al., 1998, 2002) e células inteiras (Wang et al., 2003, Homann and
10 Göringer, 1999), entre outros.

Uma expressiva parcela dos aptâmeros identificados se liga aos seus alvos com afinidade e especificidade semelhante à dos anticorpos monoclonais, sendo capazes, por exemplo, de diferenciar o ATP do dATP (Sassanfar and
15 Szostak, 1993) ou ainda discriminar células PC12 diferenciadas em neurônios de célula PC12 parentais (Wang et al., 2003).

A utilização de oligonucleotídeos como ligantes ou inibidores de proteínas baseia-se na propriedade das
20 moléculas de DNA e RNA de reconhecer epítomos protéicos específicos, semelhante à interação RNA-proteína e DNA-proteína existentes na célula. As estruturas tridimensionais de alguns aptâmeros complexados aos seus ligantes foram determinadas e revelaram que a especificidade e afinidade da
25 ligação deles aos seus alvos são conferidas pela combinação das seguintes propriedades: compatibilidade estrutural, preciso empilhamento de anéis aromáticos, interações de van der Waals e eletrostáticas e pontes de hidrogênio. Na presença do alvo, com a formação do complexo de ligação, o
30 aptâmero sofre mudanças conformacionais adaptativas. O

dobramento em uma estrutura tridimensional definida permite ao aptâmero encapsular completamente substâncias pequenas pela geração de um bolso de ligação específica. Para as moléculas com alta massa molecular, como proteínas, diferentes estruturas da superfície do alvo são envolvidas pela interação com o aptâmero (Hermann and Patel, 2000).

Procedimento de seleção *in vitro*

Os passos fundamentais para a seleção de ligantes, utilizando a técnica de SELEX, correspondem basicamente ao: desenho da biblioteca, interação entre a coleção de candidatos e a molécula alvo, separação dos oligonucleotídeos livres dos que interagem com o alvo, amplificação das moléculas selecionadas, clonagem, sequenciamento e caracterização dos aptâmeros.

O ponto básico da técnica de SELEX é a síntese de uma biblioteca de ssDNA contendo aproximadamente 10^{15} moléculas diferentes, que a princípio, podem adotar estruturas tridimensionais únicas. As sequências geradas possuem basicamente três regiões: uma randômica com 16 a 75 posições, nas quais os quatro nucleotídeos são incorporados com igual probabilidade. As regiões aleatórias são sintetizadas pela adição de uma mistura definida dos quatro nucleotídeos durante a síntese química em fase sólida do DNA. Flanqueando a sequência randômica, há duas regiões constantes, necessárias para o anelamento dos iniciadores, para a digestão com enzimas de restrição e, no caso dos aptâmeros de RNA, para a transcrição *in vitro* com a T7 RNA polimerase (Ulrich et al., 2006).

A coleção de oligonucleotídeos pode ser usada diretamente para a seleção dos aptâmeros de DNA. Para os

aptâmeros de RNA, a fita complementar do ssDNA é obtida por síntese enzimática com a Taq DNA polimerase e a biblioteca de RNA é gerada por transcrição *in vitro* (Ulrich et al., 2005, 2006, Stoltenburg et al., 2007).

5 A etapa de seleção, no procedimento de SELEX, destina-se a encontrar as moléculas com maior afinidade pelo alvo de interesse. A biblioteca de oligonucleotídeos é incubada com o alvo por um período determinado. As sequências com baixa ou nenhuma afinidade tendem a permanecer livres na solução, enquanto que as demais se associam ao alvo. O complexo aptâmero-alvo é separado das moléculas livres por um dos vários métodos disponíveis, que incluem: adsorção em filtro de nitrocelulose, separação por *gel-shift*, eletroforese capilar, entre outros (Chandra and Gopinath, 2006).

15 As moléculas de RNA ou DNA são eluídas dos seus sítios de ligação, coletadas e amplificadas por RT-PCR ou por PCR, respectivamente. A coleção de dsDNA resultante, enriquecida com sequências com afinidade pelo alvo, é preparada para um novo ciclo de SELEX. Para os aptâmeros de DNA, o dsDNA é desnaturado para a purificação da fita sense, utilizada no procedimento, e no caso dos de RNA, a biblioteca é gerada por transcrição *in vitro* (Ulrich et al., 2005, 2006).

Uma sequência de eventos de ligação ao alvo, seleção e amplificação é chamada de ciclo de SELEX. Estes passos são repetidos várias vezes até estabilizar a afinidade da biblioteca pelo seu alvo. Então, no caso de aptâmeros de RNA, a coleção final de oligonucleotídeos é reversamente transcrita em cDNA, o qual é amplificado por PCR e clonado em vetor bacteriano. Clones são isolados e aptâmeros individuais são identificados por sequenciamento e

posteriormente caracterizados quanto à afinidade e especificidade de ligação ao alvo (Ulrich et al., 2005). Adicionalmente, experimentos de mutação e truncamento podem ser realizados para definir as regiões mínimas necessárias para o reconhecimento do alvo (Ulrich et al., 2005, Bunka and Stockley, 2006, Stoltenburg et al., 2007)

Os aptâmeros então identificados pelo procedimento de SELEX ainda podem ter sua biodisponibilidade implementada em fluidos biológicos. A biodisponibilidade dos aptâmeros em fluidos biológicos é direcionada principalmente por duas propriedades: a estabilidade em fluidos biológicos e a depuração sistêmica (Dua et al., 2008). Os oligonucleotídeos são excelentes substratos para endo e exonucleases do soro, assim, para torná-los resistentes à ação destas enzimas várias modificações na cadeia dos oligonucleotídeos têm sido sugeridas. Uma delas, patente US5660985 (Pieken et al., 1997), descreveu a substituição do grupo 2'-OH da ribose de nucleotídeos de pirimidina por um grupo NH₂ ou por um átomo de Flúor. Como os nucleosídeos trifosfato modificados 2'-NH₂ e 2'-F são substrato da T7 RNA polimerase, os nucleotídeos de pirimidina com estas modificações podem ser prontamente incorporados ao RNA em uma transcrição *in vitro* (Aurup et al., 1992). Ligantes de RNA contendo nucleotídeos com estas modificações apresentam o tempo de meia vida elevado de 8 segundos para até 48 a 72 horas (de Smidt et al., 1991, Pieken et al., 1991, Ulrich et al., 2004).

A biodisponibilidade dos aptâmeros também tem sido implementada pelo acoplamento de grupos volumosos, como o polietilenoglicol, colesterol ou biotina-estreptavidina, à

calda 5' ou 3' da sequência de RNA. Este procedimento tem reduzido a depuração renal e, portanto, aumentado o tempo de meia vida dos aptâmeros no plasma (Dougan et al., 2000, Ruckman et al., 1998, Boomer et al., 2005, de Smidt et al., 1991).

5 **Aptâmeros como agentes terapêuticos**

Ao longo dos últimos 20 anos, a investigação e o desenvolvimento dos aptâmeros demonstraram o seu potencial como uma nova e efetiva classe de moléculas terapêuticas. A sequência destes ligantes, especialmente dos com potencial em aplicações biomédicas, otimizações em seus protocolos de seleção, assim como modificações químicas que melhoram sua estabilidade e farmacocinética, tem sido protegidos por patentes. Um destes aptâmeros, o produto farmacêutico MacugenTM (pegaptanib sodium injection da Pfizer-Eyetech Pharmaceuticals), o qual antagoniza de forma eficiente e seletiva a ação da isoforma 165 do fator de crescimento endotelial-vascular (VEGF), foi o primeiro aptâmero a ser aprovado, em 2004, pelo FDA (US Food and Drug Administration), para o tratamento da degeneração macular relacionada ao envelhecimento (Bell et al., 1999, Eyetech Study Group, 2002, Ishida et al., 2003). Na tabela c.1 podem ser visualizados algumas patentes que descrevem aptâmeros que serão ou que já estão sendo avaliados em testes clínicos.

25 Abaixo estão resumidas algumas características que fazem dos aptâmeros atrativos agentes terapêuticos:

- O processo de SELEX é aplicável a diferentes classes de alvos. Moléculas com estrutura simples, complexa ou uma mistura de compostos sem a composição previamente definida, podem ser utilizados como alvos para a

seleção de aptâmeros com sucesso.

- Os aptâmeros podem ser selecionados com alta afinidade e especificidade pelos seus alvos, semelhante aos anticorpos monoclonais. A maioria dos valores de K_d calculados estão na faixa de nanomolar a picomolar.

- Em contraste aos anticorpos, os aptâmeros são selecionados por um processo *in vitro* independente de animais ou linhagens celulares. Assim, o processo de SELEX é também aplicável em uma variedade de condições não fisiológicas para diagnóstico *in vitro*.

- A seleção pode ser realizada para moléculas tóxicas ou para não imunogênicas.

- Várias modificações podem ser introduzidas nas etapas básicas de SELEX para direcionar a seleção de aptâmeros com características desejadas e aplicáveis aos processos de interesse.

- Aptâmeros podem readquirir a sua conformação original após a exposição a altas temperaturas.

- Não há evidências da imunogenicidade destas moléculas (Bouchard et al., 2010).

- Antídotos específicos para os aptâmeros podem ser desenvolvidos para reverter a sua atividade.

- Vários métodos podem ser empregados para modificar os aptâmeros após o processo de seleção, a fim de melhorar a afinidade, a potência e a estabilidade metabólica destas moléculas.

Tabela 1 - Aptâmeros patenteados para terapia e diagnóstico
(adaptada de Majunder et al., 2009)

Número da Patente	Inventor/ Applicant	Descrição	Droga
----------------------	------------------------	-----------	-------

US20040224915	Janjic N, Gold L <i>Gilead Sciences, Inc.</i>	Molécula de ácido nucleico que se liga ao receptor VEGF com alta afinidade e inibe a função do VEGF (Janjic and Gold, 2004)	Macugen
WO07103549	Epstein D, Kurz JC <i>Archemix Corp.</i>	Aptâmero que se liga ao complemento e agentes anti-C5 úteis para o tratamento de desordens oculares (Epstein and Kurz, 2007)	ARC1905 ou ARC187
US20060105980	Benedict C, Diener J, Epstein D, Grate D, Keene SC, Kurz J, Kurz M, McCauley TG, Rottman J, Thompson K, Wilson C, Zoltoski AJ <i>Archemix Corp.</i>	Aptâmero terapêutico para o tratamento de desordens relacionadas ao complemento (Benedict et al., 2006)	ARC1905 ou ARC187
US20090131351	Green C, Jones D <i>Antisoma Research Ltd</i>	Métodos, composições e quites para modular a proliferação celular (Green and Jones, 2009)	Agro100/AS1411
US20090149643	Diener JL, Lagasse HAD, Benedict C <i>Archemix Corp.</i>	Aptâmero que se liga ao fator de von Willebrand e seu uso terapêutico em desordens trombóticas (Diener et al., 2009)	ARC1779

WO08150495	Gilbert J, Hutabarat R, Schaub RG <i>Archemix Corp.</i>	Formulações e métodos de uso do aptâmero para o fator de von Willebrand (Gilbert et al., 2004)	ARC1779
US20090048193	Rusconi CP, Tonkens RM <i>Regado Biosciences, Inc.</i>	Administração do sistema anticoagulante Regl (Rusconi and Tonkes, 2009)	Regl
US20080153769	Rusconi CP <i>Regado Biosciences, Inc.</i>	Moduladores de fatores da coagulação (Rusconi, 2008)	Regl
US20050158780	Lupold SE, Lin Y, Hicke BJ, Coffey D <i>Gilead Sciences, Inc.</i>	Ligantes de ácidos nucléicos dirigidos contra o PSMA (Lupold et al., 2005)	Aptâmero anti-PSMA
US6569630	Vivekananda J, Kiel JL <i>Conceptual MindWors, Inc.</i>	Métodos e composições para aptâmeros contra antrax (Vivekananda and Kiel, 2003)	Aptâmero anti-antrax
US20060105378	Hicke B, Warren S, Parma D, Gold L <i>Gilead Sciences, Inc.</i>	Ácidos nucleicos como ligantes de Tenascin- C (Hicke et al., 2006)	Aptamero anti- Tenascin
WO07025049	Diener JL, Wagner- Whyte J, Fontana D <i>Archemix Corp.</i>	Aptâmeros que se ligam a trombina com alta afinidade (Diener et al., 2007)	NU172

Receptores Purinérgicos

O subtipo de receptores para o qual foram obtidos os aptâmeros, alvos desta patente, é o dos receptores purinérgicos P2Y2, cujos ligantes endógenos são nucleotídeos

e nucleosídeos de purina e pirimidina.

Os nucleotídeos são compostos de ocorrência natural, encontrados em todas as células vivas, nas quais eles exercem funções bioquímicas e fisiológicas bem definidas. No meio intracelular, o nucleotídeo ATP representa a principal "moeda energética" para o metabolismo bioquímico, enquanto no espaço extracelular, o ATP e demais análogos, atuam como potentes moléculas sinalizadoras.

Como sinalizadores, os nucleotídeos e seus metabólitos exercem suas funções via uma variedade de receptores, denominados receptores purinérgicos, os quais são divididos em duas classes distintas: os receptores P1, ativados por adenosina, e os receptores P2, subdivididos em P2X e P2Y, sensíveis ao ATP e a seus análogos (Abbracchio et al., 2008).

Os receptores P2X estão distribuídos no sistema nervoso (autônomo, central, neurônios entéricos e sensoriais e células coclear e da retina), vascular (cardiomiócitos, músculo liso e endotélio) pulmonar e digestivo (músculo liso visceral e endotélio), além do músculo esquelético, osso e células hematopoiéticas (Jacobson, 2010). Estes receptores constituem canais iônicos operados por ligante, sendo que sete subunidades destes já foram identificadas (P2X1-P2X7), e podem formar receptores homodiméricos e/ou heterodiméricos, agrupando três subunidades. A ligação do ATP aos receptores P2X desencadeia uma mudança conformacional e um poro transmembranar é revelado, permitindo o influxo de cátions como o Na^+ e o Ca^{+2} , os quais despolarizam células excitáveis e ativa enzimas citosólicas, respectivamente (Abbracchio et al., 2008, Dale and Frenguelli, 2009). O conhecimento da estrutura dos

receptores P2X foi melhorado com a determinação da estrutura do subtipo P2X4 por cristalografia de raio-X (Kawate et al., 2009 Young, 2009). Contudo, estes dados estruturais ainda não foram suficientes para estabelecer o preciso sítio de
5 interação do ligante com o receptor.

Os receptores P2Y pertencem à superfamília de receptores de membrana acoplados à proteína G, apresentando a topologia típica desta família (sete α -hélices transmembrana, um domínio N-terminal extracelular e um
10 domínio C-terminal intracelular). Até o momento foram clonados e caracterizados oito subtipos em mamíferos: P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13 e P2Y14, sendo que estes apresentam uma diversidade relativamente alta na composição de aminoácidos (19-55% de similaridade),
15 mostrando diferenças significativas em seus perfis farmacológicos e operacionais. (Abbracchio et al., 2006, Abbracchio et al., 2008).

Ao contrário dos receptores P2X que, em ambiente fisiológico, são ativados por ATP, os subtipos de receptores
20 P2Y possuem farmacologia diferenciada: os receptores purinérgicos de humano P2Y1 (ADP), P2Y6 (UDP), P2Y12 (ADP) e o P2Y13 (ADP) são ativados principalmente por nucleosídeos difosfato, o P2Y14 por UDP glicose, enquanto os receptores P2Y2 (ATP, UTP), P2Y4 (UTP) e P2Y11 (ATP) são ativados por
25 nucleosídeos trifosfato. (Abbracchio et al., 2006, Abbracchio et al., 2008).

Com base na similaridade filogenética, na presença de aminoácidos importantes para a ligação dos ligantes e na seletividade de acoplamento a subtipos da proteína G, os
30 membros da família de receptores P2Y foram divididos em dois

subgrupos: o composto por P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6 e P2Y11 e o subgrupo formado por P2Y12, P2Y13 e P2Y14. O primeiro subgrupo usa principalmente G_q/G_{11} para ativar a PLC (fosfolipase C), levando à formação de IP3 (inositol 1,4,5-trifosfato) e à mobilização de cálcio a partir de estoques intracelulares, enquanto os receptores do segundo subgrupo se acoplam quase exclusivamente a membros da família de proteínas $G_{i/o}$, levando à inibição da adenilato ciclase e à inibição de canais iônicos. Também é possível o acoplamento do mesmo receptor P2Y a diferentes proteínas G, indicando que a sinalização desencadeada por um agonista específico envolva distintas conformações ativas do receptor (Abbracchio et al., 2006, Abbracchio et al., 2008). Como exemplo há o receptor P2Y11, sua ativação pelo ATP leva à elevação dos níveis de cAMP, de IP3 e do cálcio citosólico, enquanto sua ativação pelo UTP desencadeia a mobilização de cálcio para o citosol sem o aumento da concentração de cAMP e de IP3 (White et al., 2003).

Várias descrições da literatura têm apontado a sinalização e os receptores purinérgicos como um sistema primitivo, envolvido em processos como a sinalização neuronal, resposta imune, inflamação, dor, agregação plaquetária e em eventos como a diferenciação, proliferação e morte celular, que ocorrem no desenvolvimento e na regeneração tecidual (para revisão Burnstock 2006a, 2007a, Burnstock and Knight, 2004, Abbracchio and Burnstock, 1998).

Contudo, em muitos casos, a caracterização farmacológica dos subtipos de receptores purinérgicos envolvidos em cada processo e, portanto, a identificação de prováveis alvos terapêuticos, tem sido dificultada pela

reduzida disponibilidade de ligantes específicos para cada subtipo destes receptores (von Kügelgen, 2006). Neste contexto se enquadra o subtipo purinérgico P2Y2.

Receptor Purinérgico P2Y2

5 Os aptâmeros identificados, alvos desta patente, são ligantes do receptor purinérgico P2Y2.

O receptor purinérgico P2Y2 já foi clonado e caracterizado farmacologicamente em várias espécies incluindo: humanos, ratos e camundongos (Parr et al., 1994, 10 Chen et al., 1996, Lustig et al., 1993). Este receptor é amplamente distribuído no corpo humano, sendo que o seu mRNA já foi detectado em tecidos do músculo esquelético, coração, sistema nervoso, baço, pulmão, medula óssea, linfócitos, macrófagos e com um nível menor de expressão no fígado, 15 estômago e pâncreas (Moore et al., 2001).

Trabalhos da literatura têm descrito a relevância destes receptores em diversos processos biológicos: a ativação do receptor P2Y2 no epitélio das vias aéreas promove a absorção de Na^+ , a secreção de Cl^- dependente e 20 independente de CFTR (Regulador de Condutância transmembranar da fibrose cística), bem como o batimento ciliar e a secreção de muco, processos que estão alterados em determinadas patologias que acometem as vias respiratórias, como a fibrose cística e a bronquite crônica 25 (Kellerman et al., 2002, Yerxa et al., 2002; Novak, 2003, Lazarowski and Boucher, 2009). Na conjuntiva, seus agonistas estimulam a secreção de lágrimas, sendo alvos para terapia de pacientes com síndrome dos olhos secos (Yerxa, 2001).

A estimulação do receptor P2Y2 também está associada ao 30 aumento da síntese e/ou liberação de ácido araquidônico,

prostaglandinas e óxido nítrico (Weick et al., 2003, Xu et al., 2003) e a elevação da sua expressão em células musculares é regulada por agentes que medeiam a inflamação, incluindo, interleucina (IL)- 1β , interferon (IFN)- γ e fator de necrose tumoral (TNF)- α (Hou et al., 2000). Como exemplo de aplicação terapêutica, a inibição do receptor P2Y2 protege contra lesões e enfisemas em fumantes (Cicko et al. 2008).

Em astrócitos, Camden et al. demonstraram que a ativação de P2Y2R estimula o processamento da proteína precursora do amilóide (APP) dependente da α -secretase, gerando o peptídeo não amiloidogênico e neuroprotetor sAPP α . Esta descoberta sugere o papel neuroprotetor do P2Y2R em desordens neurodegenerativas, como na doença de Alzheimer (Camden et al., 2005). Contudo, ao contrario do seu papel neuroprotetor, as ações do receptor P2Y2 podem ser neuroinflamatórias e promovendo condições patofisiológicas como a astrogliose reativa (Weisman et al., 2005). Evidências experimentais indicam também a participação de receptores P2Y2 em processos de neoplasia incluindo proliferação de células de carcinoma de mama e de cólon (Bilbao et al., 2010; Nylund et al., 2007).

Resumindo, relevância destes receptores foi demonstrada em mecanismos de sobrevivência celular, neuroproteção (Chorna et al., 2004, Franke et al., 2006, Burgos et al., 2007), na cardioproteção, inflamação na proliferação e diferenciação (Arthur et al., 2005, Coutinho-Silva et al., 2005, Resende et al., 2007, 2008), e regulação do ciclo celular (Miyagi et al., 2006, Malam-Souley et al., 2006).

A diversidade de respostas celulares mediadas pelo P2Y2R é devida, em parte, às suas características

estruturais, as quais os capacitam a estimular diferentes vias de transdução de sinal. Em adição à via clássica, que ativa a $PLC\beta_1$, via $G\alpha_{q/11}$, levando à hidrólise do fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato em IP3 e diacilglicerol, segundos mensageiros para a liberação de cálcio de estoques intracelulares e para a ativação da PKC, respectivamente; o receptor P2Y2 contém em sua calda C-terminal dois sítios de ligação a SH3 (PXXP, em que P é uma prolina e X é qualquer aminoácido) que interagem diretamente com a tirosina quinase Src para transativar os receptores do fator de crescimento epidermal (EGF), do fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF) e o receptor 2 do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (Liu et al 2004, Seye et al., 2004 McGarrigle and Huang, 2007). O P2Y2R também contém, na primeira alça extracelular, uma sequência Arg-Gly-Asp que o acopla às integrinas $\alpha_v\beta_3/\beta_5$, sendo que esta interação é necessária para ativar as proteínas G_0 e G_{12} e iniciar os eventos que culminam com a migração celular (Bagchi et al., 2005, Liao 2007).

Devido a essas características, o receptor P2Y2 é um intrigante alvo para o desenvolvimento de novas drogas. Contudo, as moléculas até então descritas possuem limitações quanto à seletividade, potência e resistência às nucleotidases (Brookings et al., 2007; Davenport et al., 2007; Sauer et al., 2009).

Os ligantes fisiológicos de P2Y2, ATP e UTP, além de serem prontamente degradados em fluidos biológicos, possuem uma baixa especificidade pelo P2Y2, atuando como ligante de muitos outros subtipos purinérgicos (Parr et al., 1994, Lustig et al., 1993, Jacobson, 2010). Os nucleotídeos

modificados UTPyS e ATPyS (Lazarowski et al., 1995a, Lazarowski et al., 1995b), apesar de possuírem uma estabilidade superior frente à ação de nucleotidases do que os nucleotídeos fisiológicos, estão sujeitos a oxidação química (Jacobson, 2010). Outros análogos do UTP, descritos como agonistas seletivos do receptor P2Y2: 2-thio-2'-amino-2'-deoxy-UTP e 2-thio-UTP (El-Tayeb et al., 2006, Ivanov et al., 2007), dificilmente se tornarão drogas devido as suas presumíveis instabilidades fisiológicas a ação de fosfatases (Hillmann et al., 2009).

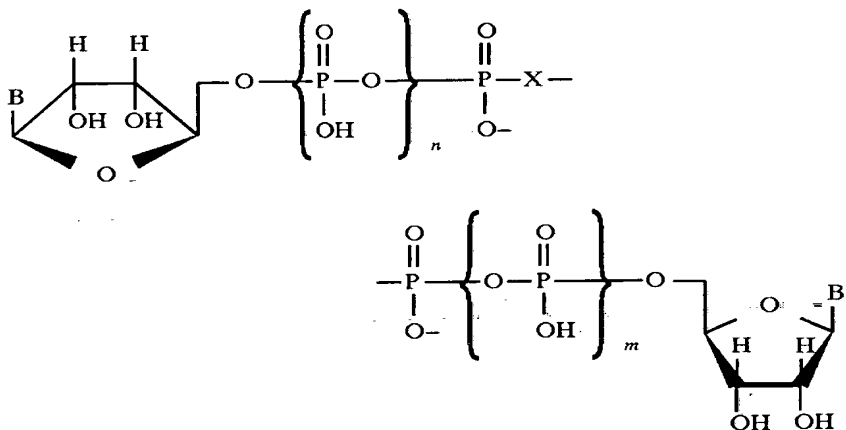
Os agonistas com estrutura de dinucleotídeos, Up4U e Up4dC, submetidos a testes clínicos como novos tratamentos para a síndrome dos olhos secos e fibrose cística, respectivamente, (Nichols, 2004, Deterding et al., 2005) possuem potência, eficácia e seletividade apenas moderadas (Brookings et al., 2007; Davenport et al., 2007; Sauer et al., 2009, Hillmann et al., 2009). Embora essas moléculas sejam metabolicamente mais estáveis do que os mononucleotídeos ATP e UTP, elas geralmente possuem uma curta meia-vida devido à hidrólise enzimática, especialmente por pirofosfatases (NPPs) (Vollmayer et al., 2003).

Apesar do relativo progresso em relação ao desenvolvimento de agonista específicos contra o receptor P2Y2, o fato é que ainda não há antagonistas definitivos disponíveis (Jacobson, 2010). O AR-C 126313 e seu análogo de alto peso molecular AR-C 118925 foram descritos como antagonistas seletivos de P2Y2, contudo parece que a afinidade destes compostos é de micromolar (Kindon et al., 1998). As grandes moléculas polianiónicas Reactive Blue e Suramina, antagonistas clássicos do receptor P2Y2, não são

seletivos e possuem potência apenas moderada (Brown and Brown, 2002, Charlton et al., 1996). Alguns flavonóides e seus derivados, como a tangeretina, também foram avaliados como antagonistas de P2Y2, estas moléculas reduziram a amplitude da resposta do receptor P2Y2 ao UTP, mas não o valor do EC₅₀, indicando um antagonismo alostérico (Kaulich et al., 2003).

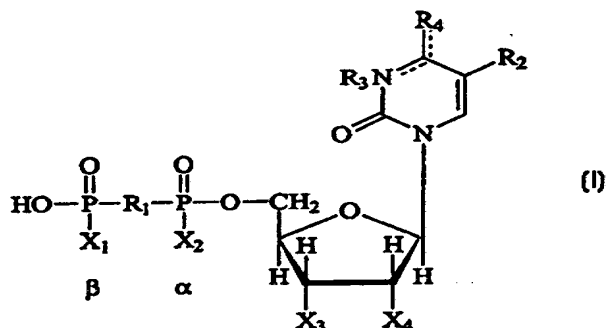
Estado da técnica:

O documento **US 5,837,861** refere-se a estruturas da forma:



Em que X é oxigênio, metileno ou difluormetileno, n é 0 ou 1, m é 0 ou 1, n+m é 0, 1 ou 2 e B e B' são independentemente resíduos de purina ou pirimidina ligados pela posição 9 ou 1, respectivamente. Os compostos da presente invenção são agonistas altamente seletivos do receptor purinérgico P2Y2 e, portanto, são úteis no tratamento de doenças pulmonares obstrutivas crônicas tais como bronquite crônica, PCD, fibrose cística e na prevenção da pneumonia.

O documento **WO 99/09998** refere-se a compostos de fórmula I:



onde X_1 e X_2 são cada um independentemente O^- ou S; X_3 e X_4 são cada um independentemente -H ou -OH, com a ressalva de que o X_3 e X_4 não sejam simultaneamente -H, R_1 é selecionado do grupo consistindo de O, imido, metileno e dihalometileno; R_2 é selecionado do grupo consistindo em H, halo, alquila, alquila substituída, nitro, alcóxil e azido; R_3 é selecionado a partir do grupo consistindo em H, alquila, acila, aril e arilalquil e R_4 é selecionado do grupo que consiste de -OR', -SR', -NR', e -NR'R'', onde R' e R'' são independentemente selecionados do grupo consistindo de H, alquila, arila substituída, alquila, arila substituída, arilalquil, alcóxil e ariloxil, com a ressalva de que "R" está ausente quando R_4 é ligada duas vezes a um átomo de oxigênio ou de enxofre ao carbono na posição 4 do anel de pirimidina, são utilizados em métodos de hidratação das secreções muco do pulmão e tratar doenças pulmonares como a fibrose cística, pneumonia associada à ventilação mecânica, bronquite crônica, doença pulmonar obstrutiva crônica e discinesia ciliar primária.

O documento **US 5,763,447** refere-se a um método para promover a drenagem de secreções nas vias aéreas

congestionadas de um paciente acamado ou imobilizado ou em um paciente entubado/mecanicamente ventilado.

O documento **WO 01/45691** apresenta um processo para regular as secreções de água e mucina e o transporte de fluido no trato gastrointestinal. a invenção também apresenta um processo para o tratamento de uma doença gastrointestinal, em que a barreira mucosa do sistema gastrointestinal esteja prejudicada. A invenção também apresenta um processo para corrigir distúrbios de secreção ou absorção de fluidos no sistema gastrointestinal. o processo compreende a administração a um paciente de uma composição farmacêutica compreendendo um agonista de receptor p2y purinérgico, em uma quantidade eficaz para regular as secreções de água e mucina ou para corrigir o transporte anormal de fluido no trato gastrointestinal. a composição farmacêutica usada nesta invenção compreende um agonista de receptor purinérgico p2y, como 5'-difosfato de uridina (udp), 5'-trifosfato de uridina (utp), 5'-difosfato de citidina (cdp), 5'-trifosfato de citidina (ctp), 5'-difosfato de adenosina (adp), 5'-trifosfato de adenosina (atp), e seus análogos; e compostos de polifosfato de dinucleotídeo de fórmula genérica (iv). O composto é preparado em uma forma oral, uma forma injetável ou uma forma de supositório, e é administrado a um paciente.

O documento **WO 98/34593** trata de um processo e preparação para a estimulação de secreção de lágrima em um sujeito em necessidade de tal tratamento. O processo compreende administração às superfícies oculares do sujeito de um agonista de receptor purinérgico tal como uridina 5'-trifosfato [utp], dinucleotídeos, citidina 5'-trifosfato

[ctp]; adenosina 5'-trifosfato [atp], ou seus análogos e derivados terapeuticamente úteis, em uma quantidade efetiva para estimular secreção de fluido lágrima e aperfeiçoar drenagem do sistema lacrimal. Formulações farmacêuticas e processos de fabricação das mesmas também são mostrados. 5 Processos de administração das mesmas podem incluir: administração tópica via um líquido, gel, creme ou com parte de uma lente de contato ou membrana de liberação seletiva; ou administração sistêmica via gotas nasais ou spray, 10 inalação por nebulizador ou outro dispositivo, forma oral (líquido ou pílula), injetável, instilação intra-operativa ou forma de supositório.

O documento **WO 00/30629** refere-se a um método de estimular secreções cervicais e vaginais em um mamífero por 15 tratamento com agonistas purinérgicos $p2y^{\sim 2}$ e/ou $p2y^{\sim 4}$. É discutido o tratamento de secura vaginal associada com menopausa, quimioterapia, e vários estados de doença bem como o tratamento de dor vulvar. Agonistas receptores purinérgicos adequados incluem trifosfato de nucleotídeos 20 tais como 5-trifosfato de uridina, 5'-trifosfato de citidina e 5'-trifosfato de adenosina, polifosfatos de nucleotídeo, tais como tetrafosfato de p^1 , p^4 -di(uridina-5') e seus análogos. Esses agonistas receptores purinérgicos são úteis para estimular secreções cervicais e vaginais e no 25 tratamento de secura vaginal em mamíferos.

O documento **WO 01/87913** providencia um método de prevenção ou tratamento da degeneração retiniana oriunda de condições patofisiológicas ou físicas. O método compreende a administração a um paciente de uma composição farmacêutica 30 compreendendo um ligante ao receptor $p2y$ purinérgico numa

quantidade eficaz para elevar sua concentração extracelular para ativar os receptores p2y superficiais celulares da glia e neuronais retinianos e produzir uma resposta neuroprotetora. Métodos de administração incluem bolus
5 intra-vítreo e administração prolongada, liberação transescleral e administração sistêmica e tópica. A composição farmacêutica útil nesta invenção compreende um agonista do receptor purinérgico p2y incluindo uridina 5'-di'- e trifosfato (udp, utp) e seus análogos, adenosina 5'-
10 difosfato (adp) e seus análogos, citidina 5'-di'- e trifosfato (cdp, ctp) e seus análogos e compostos polifosfato de dinucleosídeo.

Nenhum dos documentos mencionados acima se refere a aptâmeros ou sequências de DNA/RNA com sequências
15 específicas. Nota-se também que nenhum destes compostos foi descrito como antagonista como na presente invenção.

Além disso, existem empresas principalmente no exterior, mas também recentemente no Brasil com a finalidade de comercialização de aptâmeros. Os aptâmeros são produzidos
20 em larga escala por síntese química (os custos de síntese de oligonucleotídeos diminuíram muito ao longo dos últimos anos). Exemplos de empresas que comercializam aptâmeros para fins terapêuticos, diagnósticos e biotecnológicos são Noxxon Pharma, Alemanha, Archemix EUA, NascaCell, Alemanha, Clave
25 Biotecnologia Brasil. Não há impedimentos na comercialização de aptâmeros quimicamente modificados.

Portanto, diante do que foi apresentado, a descrição de novos ligantes contra o receptor P2Y2, alvos da presente invenção, surge como uma nova perspectiva no estudo dos
30 receptores purinérgicos e no desenvolvimento de novos

ligantes contra estes receptores. Antecipa-se que os aptâmeros identificados possuem efeitos em todos os processos fisiológicos e patofisiológicos nos quais os receptores P2Y2 participam, incluindo fibrose cística.

5 Sumário da Invenção

Apesar dos inúmeros esforços da comunidade científica no sentido de sintetizar e identificar ligantes contra o receptor purinérgico P2Y2, o fato é que a maioria das moléculas até então disponíveis possuem limitações quanto à biodisponibilidade, afinidade e especificidade (Brookings et al., 2007; Davenport et al., 2007; Sauer et al., 2009).

O aptâmero descrito nesta invenção apresentou afinidade pelo receptor P2Y2, expresso na linhagem 1321N1, de 187,5 nM, um valor aproximadamente 10 vezes inferior ao calculado, sob as mesmas condições, para o agonista fisiológico ATP, sendo capaz de inibir a proteção conferida pelo ATP à apoptose em uma concentração mil vezes menor do que a do ATP. A afinidade desse aptâmero pelo P2Y2 também foi, pelo menos, 17 e 49 vezes inferior, respectivamente, ao valor obtido para a sua ligação aos subtipos purinérgicos P2Y1 e P2Y4, expressos na superfície das células 1321N1. Estes dados demonstram o potencial desse aptâmero como um potente e seletivo ligante do receptor P2Y2, sendo que suas propriedades como tal ainda podem ser implementadas com a determinação da sequência mínima do aptâmero necessária para sua interação com esse receptor.

Outra vantagem deste aptâmero em relação aos demais ligantes do receptor P2Y2 está relacionada à sua biodisponibilidade: a presença dos nucleotídeos modificados 2F'-CTP e 2F'-UTP na sequência dessas moléculas confere a

elas uma considerável estabilidade à degradação por ectonucleotidases (de Smidt et al., 1991, Pieken et al., 1991, Ulrich et al., 2004). Além disso, a biodisponibilidade destas moléculas, em ensaios *in vivo*, ainda pode ser
5 aumentada pela diminuição da depuração renal, com acoplamento delas à moléculas volumosas como o polietilenoglicol, colesterol ou biotina-estreptavidina (Dougan et al., 2000, Ruckman et al., 1998, Boomer et al., 2005, de Smidt et al., 1991).

10 Devido a essas características, o receptor P2Y₂ é um intrigante alvo para o desenvolvimento de novas drogas. Contudo, as moléculas até então descritas possuem limitações quanto à seletividade, potência e resistência às nucleotidases (Brookings et al., 2007; Davenport et al.,
15 2007; Sauer et al., 2009).

Os ligantes fisiológicos de P2Y₂, ATP e UTP, além de serem prontamente degradados em fluidos biológicos, possuem uma baixa especificidade pelo P2Y₂, atuando como ligante de muitos outros subtipos purinérgicos (Parr et al., 1994,
20 Lustig et al., 1993, Jacobson, 2010). Os nucleotídeos modificados UTPyS e ATPyS (Lazarowski et al., 1995a, Lazarowski et al., 1995b), apesar de possuírem uma estabilidade superior à ação de nucleotidases do que os nucleotídeos fisiológicos, estão sujeitos a oxidação química
25 (Jacobson, 2010). Outros análogos do UTP, descritos como agonistas seletivos do receptor P2Y₂: 2-thio-2'-amino-2'-deoxy-UTP e 2-thio-UTP (El-Tayeb et al., 2006, Ivanov et al., 2007), dificilmente se tornarão drogas devido as suas presumíveis instabilidades fisiológicas frente à ação de
30 fosfatases (Hillmann et al., 2009).

Os agonistas com estrutura de dinucleotídeos, Up4U e Up4dC, submetidos a testes clínicos como novos tratamentos para a síndrome dos olhos secos e fibrose cística, respectivamente, (Nichols, 2004, Deterding et al., 2005) 5 possuem potência, eficácia e seletividade apenas moderadas (Brookings et al., 2007; Davenport et al., 2007; Sauer et al., 2009, Hillmann et al., 2009). Embora essas moléculas sejam metabolicamente mais estáveis do que os mononucleotídeos ATP e UTP, elas geralmente possuem uma curta 10 meia-vida devido à hidrólise enzimática, especialmente por pirófosfatases (NPPs) (Vollmayer et al., 2003).

A reduzida disponibilidade de ligantes subtipos específicos contra o receptor P2Y2 e demais subtipos purinérgicos, vem dificultando a elucidação das funções 15 exatas desses receptores em processos fisiopatológicos e, consequentemente, limitando a exploração de seus potenciais terapêuticos. A identificação de aptâmeros com afinidade pelo receptor purinérgico P2Y2 utilizando a tecnologia de SELEX traz, de uma forma geral, uma nova perspectiva para o 20 desenvolvimento de ligantes específicos contra os receptores purinérgicos; e particularmente em relação ao P2Y2, o aptâmero B7, e, por conseguinte todas as sequências da classe I de aptâmeros (por apresentarem uma região consenso comum ao aptâmero B7), surgem como uma nova ferramenta para 25 explorar o papel patofisiológico destes receptores na pesquisa básica e clínica, abrindo a possibilidade que estas moléculas se tornem compostos de alta relevância farmacêutica.

Breve Descrição dos Desenhos

30 A Figura 1 mostra um Esquema de seleção *in vitro* de

aptâmeros de RNA resistentes à ação de nucleases contra o receptor purinérgico P2Y2.

A Figura 2 mostra gráficos com a caracterização das células de astrocitoma humano 1321N1 transfectadas com o
5 vetor pLXSN contendo a sequência codificante do receptor purinérgico P2Y2 humano (1321N1-P2Y2).

A Figura 3 mostra a biblioteca de DNA e iniciadores utilizados na identificação de aptâmeros de RNA para o receptor P2Y2 por SELEX.

10 A Figura 4 mostra a curva para a determinação do B_{max} e do K_d , da mistura dos 46 aptâmeros caracterizados no ciclo 9, em relação à ligação destes à preparação de proteínas de membrana da célula 1321N1-hP2Y2.

A Figura 5 mostra o ensaio de competição homóloga para
15 determinar a ligação do aptâmero B7 às células de astroglioma humano 1321N1 expressando o receptor recombinante P2Y2 de camundongo.

A Figura 6 mostra o ensaio de competição homóloga para a ligação do ATP às células de astroglioma humano 1321N1
20 expressando o receptor recombinante P2Y2 de camundongo.

A Figura 7 mostra o ensaio de competição homóloga Aptâmero B7.

A Figura 8 mostra a indução à apoptose de células P19 indiferenciadas.

25 Descrição Detalhada da Invenção

Esta invenção apresenta uma família de 21 sequências de ribonucleotídeos (modificadas quimicamente, pela substituição do grupo 2'-OH dos nucleotídeos de pirimidina por um átomo de Flúor: 2'-F-dCTP e 2'-F-dCUTP) com alta
30 afinidade de ligação ao receptor purinérgico P2Y2. Tais

ácidos nucleicos foram identificados pelo método SELEX, acrônimo para *Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment*. As 21 sequências descritas são caracterizadas por apresentarem uma região consenso de oito nucleotídeos (CCUCGCUG) como base nas suas atividades de ligação ao receptor P2Y2.

O primeiro representante caracterizado desse conjunto, o aptâmero B7, apresentou uma considerável afinidade (constante de dissociação de 164 nM) e especificidade de ligação ao receptor purinérgico P2Y2, mostrando uma atividade biológica inibitória sobre mesmo, a qual foi comprovada pela capacidade desta molécula de inibir a proteção contra a apoptose desencadeada pelo ATP, via o P2Y2.

Desta forma, pretende-se reivindicar a sequência do aptâmero B7 (5'GGGAGAAUUCAACUGCCAUCUAGGCGGUUGAUUGAUCCUCGCGCÇUUACUCCAGGCUAGUACUACAAGCUUCUGGACUCGGU 3') e também a dos demais 20 oligonucleotídeos pertencentes à mesma classe de B7 (formados pelas regiões randômicas descritas na tabela 2 flanqueadas pelas sequências constantes 1: 5'GGGAGAAUUCAACUGCCAUCUAGGC3' e 2: 5'AGUACUACAAGCUUCUGGACUCGGU 3'), já que as propriedades apresentadas pelo aptâmero B7 predizem as dos outros aptâmeros, pelo fato destes possuírem, em comum, a sequência consenso CCUCGCUG, na qual estão localizados os nucleotídeos que provavelmente devem interagir com o receptor P2Y2. Desta forma, em acordo com vários estudos publicados sobre a técnica SELEX, as demais 20 sequências, ainda não caracterizadas, deveriam possuir atividade, de ligação ao receptor P2Y2, inibitória, com constantes de dissociação na faixa de 10 nM a 10 µM. Os aptâmeros serão utilizados em concentrações de 10 nM a 10 µM

em formulações de tampão PBS (tampão fosfato salino) para ensaios in vitro ou solução salina fisiológica (0.9 % NaCl) + 1.5 mM MgCl₂ quando utilizado para injeção intravenosa ou intratumoral para aplicações in vivo. Processos de administração das mesmas podem também incluir: administração tópica via um líquido ou gel ou administração sistêmica via gotas nasais ou spray, inalação por nebulizador ou outro dispositivo, injetável, instilação intra-operativa ou forma de supositório.

Uma vez conhecidos os efeitos do receptor P2Y₂ na inibição de apoptose, os antagonistas deste receptor, como o aptâmero B7, possuem relevância como possíveis terapêuticos, por exemplo, na inibição de apoptose que diminuirá o número de células viáveis que possam proliferar. Sabe-se também do papel do receptor P2Y₂ em processos neurodegenerativos e neuroinflamatórios, tais como na epileptogênese.

O aptâmero B7, como inibidor do receptor P2Y₂, pode também possuir papel terapêutico no tratamento de lesão e enfisema de pulmão em fumantes. Neste caso, tanto o aptâmero B7 quanto os demais aptâmeros mencionados na tabela 2, como inibidores do receptor P2Y₂, possuem atividade terapêutica na reversão do estado inflamatório. Um aumento da atividade de receptores foi observado em condições isquêmicas de ataque cardíaco. O aptâmero inibidor do receptor P2Y₂ qualifica-se como possível terapêutico para reversão da hiperativação do sistema purinérgico.

Na realização da presente invenção foi utilizada a técnica de evolução sistemática de ligantes por enriquecimento exponencial (Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment, SELEX) para identificar

moléculas de ácidos nucleicos com afinidade pelo receptor purinérgico P2Y2. Essas moléculas de ácidos nucleicos são os alvos desta patente. O procedimento empregado envolveu basicamente: (a) a apresentação da biblioteca combinatória de oligonucleotídeos modificados ao alvo, uma preparação de membrana das células 1321N1 expressando heterologicamente o receptor purinérgico P2Y2 humano; (b) separação dos ligantes com afinidade ao alvo dos demais por filtração em membrana de nitrocelulose; (c) eluição das moléculas de RNA ligadas especificamente ao receptor P2Y2 com o agonista purinérgico ATP γ S; (d) reação de transcrição reversa, seguida de amplificação por PCR das sequências recuperadas e (e) reação de transcrição para a síntese enzimática da biblioteca de RNA enriquecida com moléculas com afinidade pelo receptor P2Y2.

O esquema de seleção *in vitro* de aptâmeros de RNA resistentes à ação de nucleases contra o receptor purinérgico P2Y2 é mostrado na Figura 1. A biblioteca de DNA, contendo sítios de ligação aos iniciadores e o promotor da RNA polimerase T7, é transcrita em RNA, na presença dos nucleotídeos modificados 2'-F-CTP e 2'-F-UTP. Após a incubação da biblioteca com a preparação de membrana das células 1321N1-hP2Y2 (80 μ g), os oligonucleotídeos com afinidade pelo alvo são selecionados via filtração em membrana de nitrocelulose. Para recuperar as moléculas que se ligam especificamente ao receptor P2Y2, a membrana, contendo o complexo alvo-RNA, é incubada com uma solução contendo uma alta concentração (2 mM) do agonista purinérgico ATP γ S. Os RNAs eluídos são recuperados por extração com fenol-clorofórmio, reversamente transcritos e amplificados via

PCR. A biblioteca resultante é utilizada em um novo ciclo de SELEX, ou então, após o enriquecimento desejado, clonada, seqüenciada e caracterizada.

Abreviaturas: 2'-F-Py: 2'-F-pirimidina, 1321N1-hP2Y2:
5 células de astrocitoma humano 1321N1 expressando heterologicamente o receptor purinérgico P2Y2 humano.

Como citado anteriormente, utilizamos como alvo o receptor P2Y2 recombinante expresso em uma preparação de membrana da linhagem de astrocitoma humano 1321N1. Antes de
10 iniciar o procedimento, esta linhagem foi caracterizada quanto à expressão gênica e protéica do receptor P2Y2, quanto a sua atividade frente aos agonistas purinérgicos ATP e ATPγS e também com relação à densidade deste receptor na superfície celular (Figura 2).

15 As células 1321N1 selvagens, naturalmente, não expressam receptores de nucleotídeos do tipo P2 funcionais (Parr et al., 1994) o que, por consequência, diminui a probabilidade da seleção de moléculas com ligação inespecífica a outros subtipos purinérgicos. Contudo, dada a
20 complexidade da membrana celular, é de se esperar que, além do receptor P2Y2, outros constituintes da membrana também possam ser ligantes das moléculas de RNA. Para contornar este inconveniente, o ATPγS foi utilizado nos ciclos de seleção para eluir especificamente as seqüências de RNA
25 ligadas ao seu domínio de ligação ao P2Y2R. Entre as drogas descritas como ligantes do P2Y2R, o ATPγS foi selecionado porque sua afinidade e especificidade pelo P2Y2 são superiores às da suramina e devido à presença do tiofosfato terminal, ele é menos suscetível à degradação por ecto-
30 nucleotidases do que os agonistas fisiológicos ATP e UTP

(Abbracchio et al. 2006).

A biblioteca de RNA, utilizada na seleção, foi transcrita de uma biblioteca combinatória de DNA em que cada sequência possui 100 nucleotídeos (nt) com 32 posições aleatórias, flanqueada por duas regiões constantes necessárias para o anelamento dos iniciadores, para a digestão com enzimas de restrição e para a transcrição *in vitro* com a T7 RNA polimerase (Figura 3).

A Figura 2 mostra a caracterização das células de astrocitoma humano 1321N1 transfectadas com o vetor pLXSN contendo a sequência codificante do receptor purinérgico P2Y2 humano (1321N1-P2Y2). **(A)** representa a expressão do mRNA do receptor P2Y2 que foi detectada através da transcrição reversa do RNA total das células, seguida por uma PCR utilizando iniciadores específicos para a região codificante do gene. A identidade do amplicon foi confirmada por sequenciamento. **(B)** representa a detecção da expressão protéica do receptor P2Y2 por Western Blot. A avaliação da expressão gênica e protéica da β -actina foi utilizada como controle interno para normalizar e averiguar a integridade do RNA total e do extrato protéico, respectivamente. **(C)** representa as curvas de concentração-ativação das células 1321N1-P2Y2 pelos agonistas ATP e ATPyS. A mobilização de $[Ca^{2+}]_i$, induzida por diferentes concentrações dos agonistas ATP e ATPyS foi monitorada por microfluorimetria usando Flexstation 3. **(D)** representa o ensaio de competição homóloga para determinar a afinidade do ATP pelo receptor P2Y2 e a densidade do P2Y2R nas células 1321N1-hP2Y2. As células 1321N1-P2Y2 (2×10^5 células) foram incubadas com $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (1,7 nM, 1 μCi) na presença e ausência de crescentes

concentrações de ATP (0.001 μ M to 3000 μ M). Os dados apresentados em (C) e (D) foram analisados no programa GraphPad Prism 4 e representam os valores médios $\pm$ E.P.M de 2 experimentos independentes. RFU: unidade relativa de fluorescência.

A Figura 3 mostra a biblioteca de DNA e iniciadores utilizados na identificação de aptâmeros de RNA para o receptor P2Y2 por SELEX. As sequências dos iniciadores sense e antisense estão mostradas respectivamente acima e abaixo da sequência da biblioteca parcialmente randômica. A posição do sítio da RNA polimerase T7 está em negrito e os sítios das enzimas de restrição estão sublinhados. N32: posições aleatórias em que os quatro desoxinucleotídeos (A: desoxiadenosina trifosfato, C: desoxicitidina trifosfato, T: desoxitimidina trifosfato, G: desoxiguanosina trifosfato) são incorporados com igual probabilidade. Após a síntese da fita complementar e da PCR, as fitas codificantes são transcritas *in vitro*, na presença dos nucleotídeos modificados 2'F-CTP, 2'E-UTP, gerando a mistura de RNAs, resistentes a atividades de nucleases, utilizadas para o SELEX (Ulrich et al., 2005).

O procedimento de SELEX foi iniciado com aproximadamente 56 cópias de cada um dos 10^{13} variantes da biblioteca. Após nove 9 rodadas de SELEX, identificamos 46 sequências, que foram agrupadas, baseado na conservação parcial de regiões consensos, em três famílias e se ligaram à preparação de membrana das células de astrocitoma humano 1321N1, expressando o receptor purinérgico P2Y2 humano recombinante, com K_d de 164 nM (Figura 4).

Esta invenção se limita à descrição de uma das famílias

identificadas, a família I com 21 membros (Tabela 2), cujo representante, que teve sua sequência repetida em 3 clones, foi caracterizado quanto a sua afinidade de ligação ao receptor P2Y2 e quanto a sua atividade biológica, propiciando, desta forma, a predição destas características para as demais sequências desta família, já que estas apresentam uma região consenso conservada de oito nucleotídeos, os quais provavelmente interagem com o receptor P2Y2. Espera-se que as demais sequências ainda não caracterizadas possuem constantes de dissociação (K_d) na faixa de 10 nM - 10 μ M.

A Figura 4 mostra a curva para a determinação do B_{max} e do K_d , da mistura dos 46 aptâmeros caracterizados no ciclo 9, em relação à ligação destes à preparação de proteínas de membrana da célula 1321N1-hP2Y2. Várias concentrações dos aptâmeros, radiomarcados com 32 P, foram incubados com 3 μ g de proteína do extrato de membranas das células 1321N1-hP2Y2. Após incubação, o complexo foi aplicado em um gel de poliacrilamida não desnaturante 5%. Após eletroforese, o gel foi exposto ao cassete phosphor imaging para digitalização e análise. A ligação inespecífica foi verificada na presença de 1 μ M da mistura dos aptâmeros não radiomarcados. A curva foi plotada utilizando o programa GraphPad Prism 4.

A Tabela 2, abaixo, representa estruturas primárias dos aptâmeros de RNA da classe I. Após nove ciclos de seleção, as sequências de RNA foram reversamente transcritas, ligadas ao vetor pGEM T easy e transformadas em *E. coli* cepa DH5 α . Clones foram identificados e sequenciados. Os oligonucleotídeos foram divididos em três classes de acordo com as regiões consensos. Para a

identificação destas, as regiões randômicas dos aptâmeros foram alinhadas e comparadas na procura de regiões conservadas. Na tabela podem ser visualizadas as posições, os nucleotídeos, e as frequências dos nucleotídeos conservados dentro das regiões randômicas das sequências da classe I.

Tabela 2 - Classe I

Aptâmero	Sequência (5'-3')
A5	CACUGGCCUCGCGUGGAACGCUCCGACUCUCGC
B1	GCACUUAGUGUGCCUCGCGUGGUCCACCCACAU
C5	UUA AUGCCUCGCGUGGAAGUCUCCACUAAUAGC
D7	UGCUCGCACCUGGAUGUCCUGAUGUCUCUGGCC
D2	GGCGUAACUCGCGCCUGAUGACUUGACCCUGA
B7, E6, G4	GGUCGAUUGAUCCUCGCGCCUACUCCAGGCU
C4	AUUGACCUCGCCCACAACCGAUCCAUAUAGGU
E3	CACCUGCAAGGGCCUGGGUGUCAGUCGCUCCA
E4	AGCUCUCGGUUCGUCUCUCUAGCGAUUUUAUUUG
C7	AAGUCUGCCGGUGUUGUCUUUUCCUAACUGA
A7	GCGCUGCCUAGCGUGACAGCUUGCAUUGCGGU
B2	AGUAGAUUUCGCCACGCCGCGUGCUGGUCCAUC
D5	AAGCCAGCUUGCUUAGACUCCUCCCUAUAUGC
F5, H3	CACUCGGUGGUAGCUCGAUCCGCCCAAUUGUC
C2, H1	AGUACGUCUCGAUGCACCAGUGAUAUUGUCCCU
F4	AAACCUAGAUCUCUGAGUAGUUCUCUCCUCCUAG
H6	ACCGCGGAUGCUCACUGAGCAUCUUGUCCCA
C1	CGUUAAGUUCUUACCAACCCUCCUCCUCCGUA
F1	GCCACUAAUUGGCACUGAUUGAACGCUCCGAC
A6	GUUAACGCUAGUUUGGCGUUUCCCCAGUCGAA
G6	AUCCUGCAGAGCCUGGUGGUAGUGUCACCUGA

consenso	CCUCGCUG							
posição	1	2	3	4	5	6	7	8
consenso	C	C	U	C	G	C	U	C OU G
frequência	16	24	22	20	20	15	17	22

A afinidade de ligação do aptâmero B7 à superfície das células 1231N1, expressando, individualmente, os receptores purinérgicos recombinantes P2Y2 de camundongo, P2Y1 e P2Y4, foi determinada por ensaios de competição homóloga. Observamos que a constante de dissociação para a linhagem 1231N1-mP2Y2 foi de 187,5 nM (figura d.5), um valor aproximadamente 10 vezes inferior ao calculado para o ATP (figura d.6) na mesma linhagem e, pelo menos, 17 e 49 vezes

inferior ao valor obtido para as células 1321N1-P2Y1 e 1321N1-P2Y4, respectivamente (Figura 7).

A Figura 5 mostra o ensaio de competição homóloga para determinar a ligação do aptâmero B7 às células de astroglioma humano 1321N1 expressando o receptor recombinante P2Y2 de camundongo. Uma concentração de 2,8 nM (137,5 fmol) do aptâmero radiomarcado com ^{32}P -ATP foi incubada com 3×10^4 células 1321N1-P2Y2 na presença ou ausência de concentrações crescentes do mesmo não radiomarcado para um volume final de 50 μl . Os ensaios foram realizados a 25°C com um tempo de incubação de 30 min. Decorrido o tempo necessário para o equilíbrio de ligação ser atingido, as células foram lavadas duas vezes com 50 μl de meio extracelular e então solubilizadas em solução contendo 1% de SDS e 100 mM de citrato de sódio por 30 min. A radioatividade foi quantificada na presença de líquido de cintilação. Como controle o mesmo ensaio foi realizado com o ciclo 0 (transcrito da biblioteca não submetida à seleção). Os dados foram plotados utilizando o programa GraphPad Prism 4.

A Figura 6 mostra o ensaio de competição homóloga para a ligação do ATP às células de astroglioma humano 1321N1 expressando o receptor recombinante P2Y2 de camundongo. As células 1321N1-P2Y2 (3×10^4 células) foram incubadas com [α - ^{32}P]ATP (1,7 nM) na presença e ausência de crescentes concentrações de ATP (0.1 μM a 1000 μM) para um volume final de 50 μl . Os parâmetros K_d e B_{max} foram determinados pela análise dos dados por regressão não linear usando o programa GraphPad Prism 4. Os dados apresentados são os valores médios $\pm$ E.P.M de 2 experimentos independentes

A Figura 7 mostra o ensaio de competição homóloga Aptâmero B7. Uma concentração de 1,1 nM (55 fmol) do aptâmero radiomarcado com ^{32}P -ATP foi incubada com 3×10^4 células na presença ou ausência de concentrações crescentes do mesmo não radiomarcado, para um volume final de 50 μl . Os ensaios foram realizados a 25°C com um tempo de incubação de 40 min. Em **A**: curva de competição realizada com as células 1321N1 expressando o receptor recombinante P2Y1. Em **B**: curva de competição utilizando a linhagem 1321N1 expressando o receptor P2Y4. Os dados foram plotados utilizando o programa GraphPad Prism 4.

A análise da afinidade do aptâmero B7 foi avaliada em células 1321N1 expressando o receptor purinérgico P2Y2 de camundongo (1321N1-mP2Y2), em detrimento da linhagem 1321N1 expressando o receptor purinérgico P2Y2 humano (1321N1-hP2Y2), com a qual o procedimento de SELEX foi realizado, pelo fato de que o ensaio funcional deste aptâmero seria realizado em células de carcinoma embrionário murino P19, na qual a caracterização da expressão gênica, protéica e funcional dos receptores purinérgicos está bem caracterizada (Resende et al., 2007, 2008).

A atividade biológica do aptâmero foi avaliada em células P19 indiferenciadas (sabidamente expressando receptores P2Y2 endógeno) privadas de soro. Nosso objetivo foi observar se o aptâmero seria capaz de inibir a proteção, mediada pelo ATP, à apoptose induzida pela privação de soro, na linhagem P19. O método utilizado foi a detecção da marcação com anexina V-FITC e idoteto de propídio por citometria de fluxo.

A representação deste ensaio teve por base o trabalho

de Arthur et al., o qual demonstrou que células PC12 e neurônios da raiz dorsal são protegidos, da apoptose desencadeada pela privação de soro, pelos nucleotídeos ATP, UTP e ATPγS. Um efeito mediado pelo receptor P2Y2 que requer Scr, ERK e Akt (Arthur et al. 2006).

De fato, em concordância com Arthur et al., nós verificamos que a privação de soro reduziu significativamente o número de células P19 viáveis (anexina V-FITC e PI negativos) (figura d.8) e que o tratamento com 100 μM de ATP reverteu este efeito, provavelmente via o receptor P2Y2, já que dentre os subtipos purinérgicos expressos em células P19 indiferenciadas, os principais responsáveis pelos aumentos transitórios na $[Ca^{2+}]_i$, induzidos pelo ATP, são os receptores P2Y1, P2Y2 e P2X4 (Rêsende et al., 2007, 2008), sendo que destes três subtipos, somente P2Y2R está associado à proteção induzida por nucleotídeos à apoptose (Chorna et al., 2004, Coutinho-Silva et al., 2005, Arthur et al., 2006, Burgos et al., 2007). Descrições da literatura sugerem que a ativação do receptor P2Y1 induz a apoptose em células tratadas com nucleotídeos (Sellers et al. 2001, Mamedova et al., 2006, Coutinho-Silva et al., 2005), e Solini et al., indicaram o envolvimento do receptor P2X4 na indução da apoptose por nucleotídeos em células mesangiais humanas (Solini et al., 2006).

O tratamento das células P19 indiferenciadas com 100 nM do aptâmero B7 desencadeou a elevação do nível de células apoptóticas (anexina V-FITC e anexina V-FITC/PI positivas) (figura d.8) consideravelmente, tanto nas células carenciadas, quanto nas mantidas em soro, o que indica que o aptâmero está atuando sobre um receptor purinérgico ou

induzindo a apoptose por outra via .

A hipótese de que o aptâmero B7 está agindo sobre o receptor purinérgico P2Y2 foi testada com o tratamento simultâneo com 100 μ M de ATP e 100 nM do aptâmero. Neste caso, os níveis das células vivas e apoptóticas retrocederam aos do controle, indicando que houve uma competição entre o ATP e o aptâmero B7. Nas células privadas de soro, a incubação com 100 μ M de ATP e 100 nM do aptâmero reverteu a proteção à apoptose promovida pelo ATP, a porcentagem de células vivas decaiu de 73,79% para 27,25%, o mesmo não foi observado para a cultura mantida em meio com soro, uma plausível explicação para este dado seria a ligação inespecífica dos aptâmeros a componentes do soro, o que diminuiria o número de moléculas disponíveis para competir com o ATP pelo seu alvo.

Desta forma, nós mostramos que de fato o aptâmero B7 é capaz de inibir a proteção do ATP contra a apoptose em células privadas de soro, em uma concentração 100 vezes menor que a concentração do ATP, provavelmente competindo com o ATP por seu sítio de ligação ao receptor P2Y2.

Em suma, esta invenção descreve sequências modificadas de RNA com propriedades ligantes ao receptor purinérgico P2Y2. Este trabalho identificou um conjunto 46 sequências que foram agrupadas em três famílias, uma destas famílias, a classe I, contendo 21 destas sequências (alvos desta patente), teve um de seus membros caracterizado: o aptâmero B7. Os dados obtidos tornam o aptâmero B7 e, por conseguinte toda a classe I (por apresentarem uma sequência consenso comum ao aptâmero B7), uma importante ferramenta em estudos cujo objetivo é definir a atuação do subtipo P2Y2 em eventos

patofisiológicos. Esses aptâmeros podem ser utilizados como reagentes em ensaios farmacológicos, como radioligantes (após marcação com o nucleotídeo ATP ou GTP radiomarcado) e antagonistas do receptor P2Y₂, e em experimentos de citômica, acoplado a uma molécula fluorescente, como também para fins terapêuticos.

O aptâmero B7 e as demais sequências da classe I, além de serem úteis como ferramenta na pesquisa básica, ainda poderão ser utilizados como compostos de alta relevância farmacêutica, ou então servirem como protótipos para o desenvolvimento de novas drogas.

É importante ressaltar que o aptâmero B7 foi o primeiro a ser caracterizado do conjunto de 21 sequências agrupadas na classe I, muito provavelmente, dentro deste conjunto, há compostos que apresentam propriedades relevantes, e similares às do aptâmero B7, como ligante do receptor P2Y₂, já que estas sequências apresentam em comum uma região consenso de oito nucleotídeos, a qual provavelmente interage com o receptor P2Y₂. Desta forma, todos os membros da classe I são alvos desta patente.

A Figura 8 mostra a indução à apoptose de células P19 indiferenciadas. As células P19, carenciadas e cultivadas na presença de SFB, foram submetidas aos seguintes tratamentos: 100 nM de ciclo 0 (biblioteca); 100 µM de ATP; 100 nM do aptâmero B7; 100 nM do aptâmero B7 e 100 µM de ATP, e então coradas com anexina V-FITC e iodeto de propídio (PI). As barras mostram a distribuição das células (média de três experimentos) analisadas por citometria de fluxo. O gráfico permite a comparação direta das porcentagens de células que se encontram nas seguintes condições: células necróticas (PI

positivo, anexina V negativa); células mortas (anexina V/PI positivos); células apoptóticas (anexina V positiva) e células vivas (anexina V e PI negativas). Controle: células não tratadas.

5 Embora a presente invenção tenha sido descrita de uma maneira que permita aqueles versados na técnica fazer e usar a mesma, será entendido e apreciado que há equivalentes para as modalidades de exemplo mostradas aqui e que modificações e variações podem ser realizadas, sem que se desvie do
10 escopo e do espírito das invenções, os quais não devem ser limitados pelas modalidades exemplificadas.

REIVINDICAÇÕES

1. Sequência de ribonucleotídeos caracterizada pelo fato de compreender a SEQ. ID. N°: 1.

2. Sequência de ribonucleotídeos caracterizada por 5 compreender ainda as SEQ. ID. N°: 2 à SEQ. ID. N°: 21.

3. Sequências de ribonucleotídeos, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizadas pelo fato de serem modificadas quimicamente pela substituição do grupo 2'-OH dos nucleotídeos de pirimidina por um átomo de Flúor: 2'-dCTP e 2'-dCUTP. 10

4. Sequências de ribonucleotídeos, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizadas pelo fato de possuírem alta afinidade de ligação ao receptor purinérgico P2Y2.

5. Sequências de ribonucleotídeos, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizadas pelo fato de 15 apresentarem uma região consenso de oito nucleotídeos (CCUCGCUG) como base em suas atividades de ligação ao receptor P2Y2.

6. Aptâmero B7, conforme definido na reivindicação 20 1, caracterizado pelo fato de que apresenta uma afinidade pelo receptor P2Y2 expresso em uma preparação de membrana da linhagem de astrocitoma humano 1321N1, de 187,5 nM.

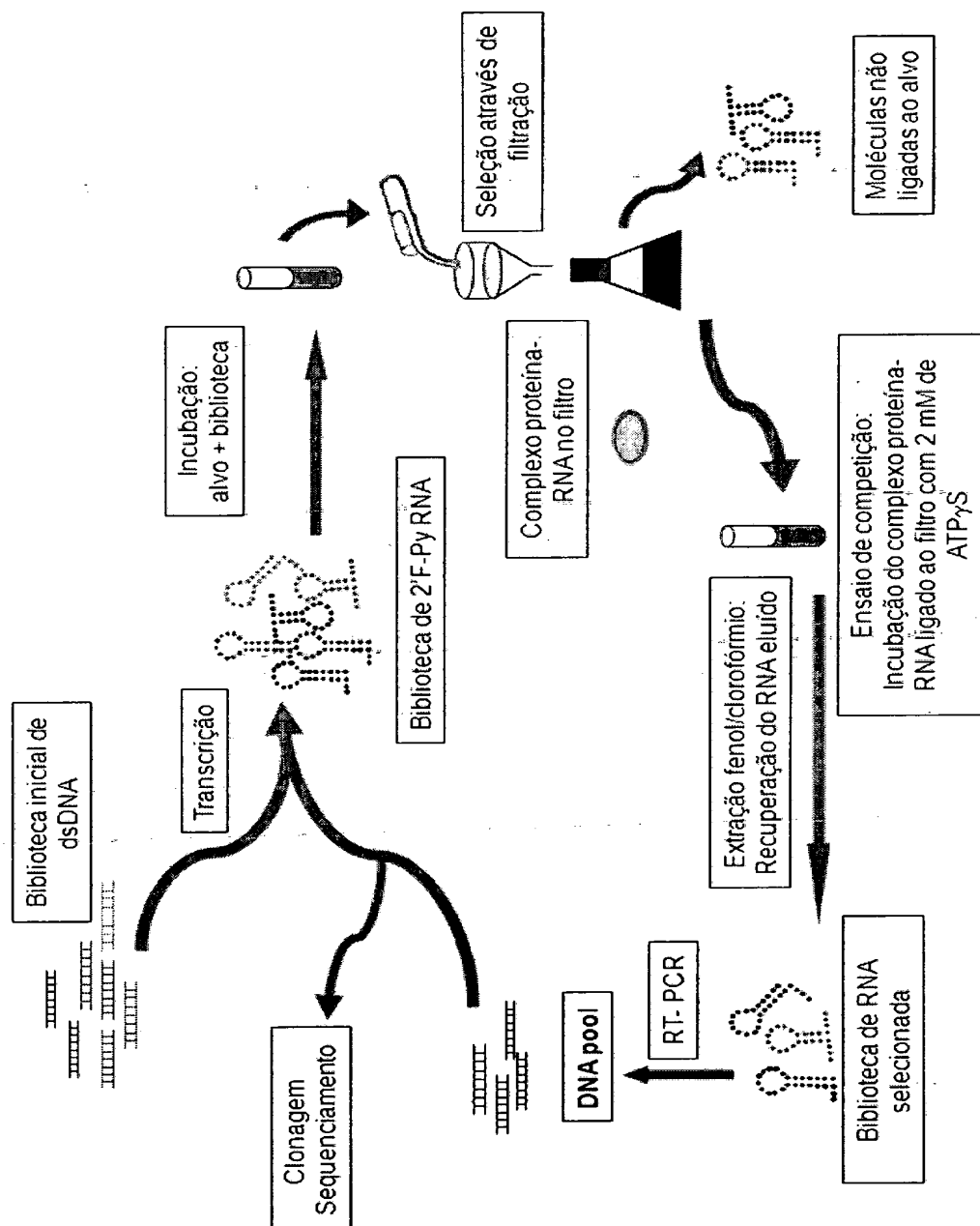
7. Aptâmero B7, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que é capaz de inibir a proteção 25 conferida pelo ATP à apoptose em uma concentração mil vezes menor do que a do ATP.

8. Aptâmero B7, conforme definido na reivindicação 1, caracterizado pelo fato de apresentar ainda uma afinidade pelo receptor P2Y2 de pelo menos, 17 e 49 vezes 30 inferior, respectivamente, ao valor obtido para a sua

ligação aos subtipos purinérgicos P2Y1 e P2Y4, expressos na superfície das células 1321N1.

9. Aptâmero B7, de acordo com qualquer uma das reivindicações 6, 7 ou 8, caracterizado pelo fato de ser
5 utilizado em processos que envolvam a sinalização purinérgica via receptor P2Y2, incluindo o seu uso como reagente em ensaios farmacológicos *in vivo* e *in vitro* e de citômica, na forma de diagnósticos e na forma de agonista ou antagonista em aplicações terapêuticas.

10 10. Aptâmero B7, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que as aplicações terapêuticas incluem fibrose cística, lesão e enfisema de pulmão em fumantes, neoplasias, cardio e neuroproteção e
-neurodegeneração na glicose reativa causada por
15 neuroinflamação.

**FIG. 1**

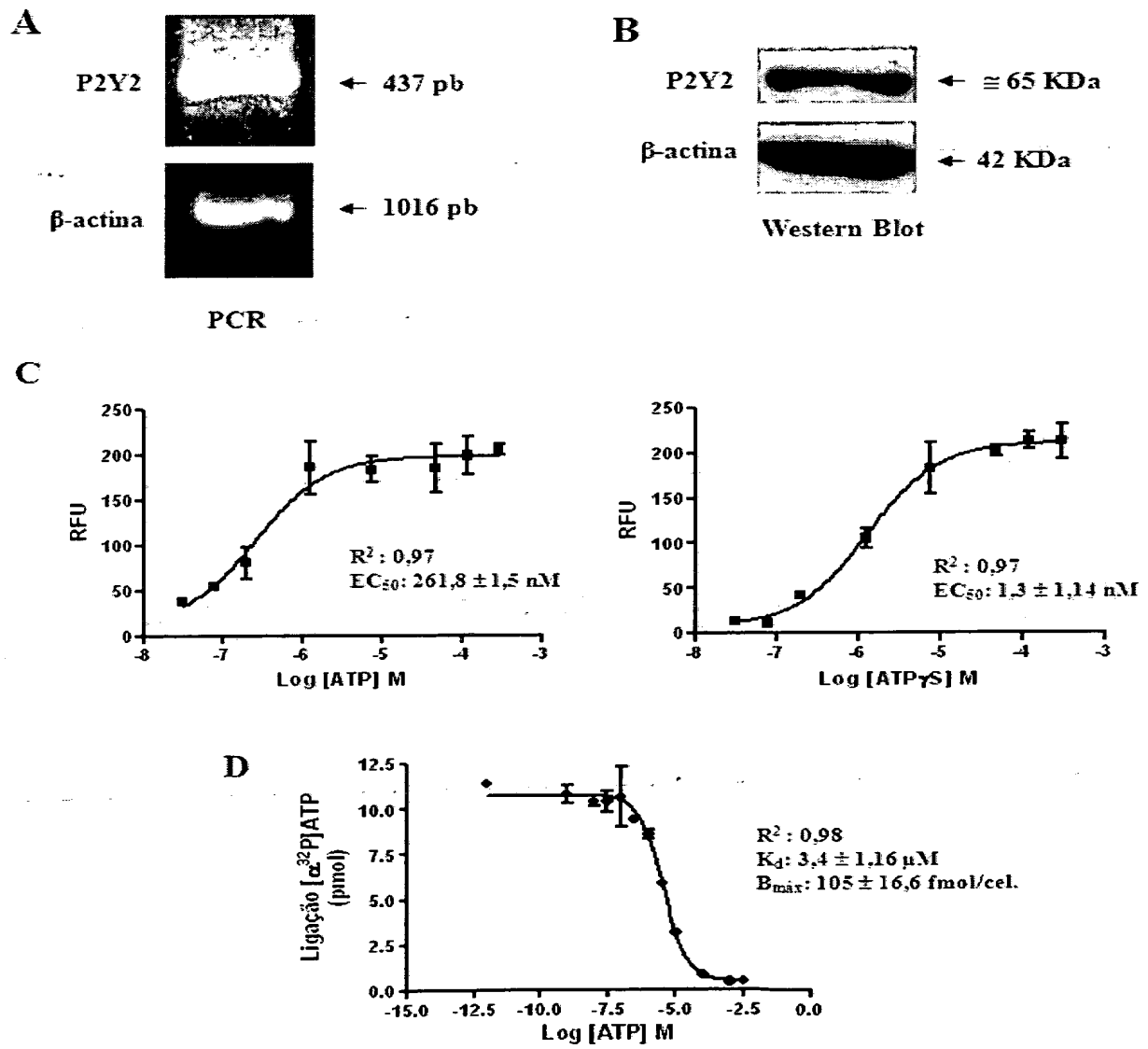


FIG. 2

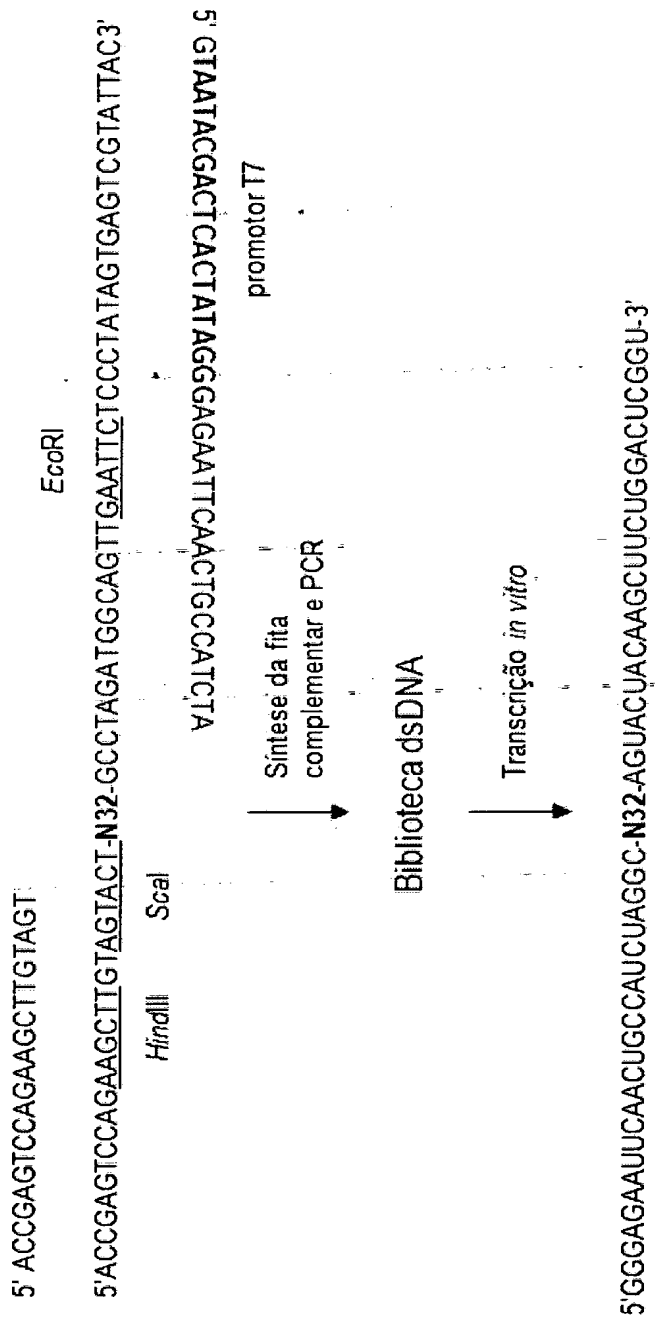
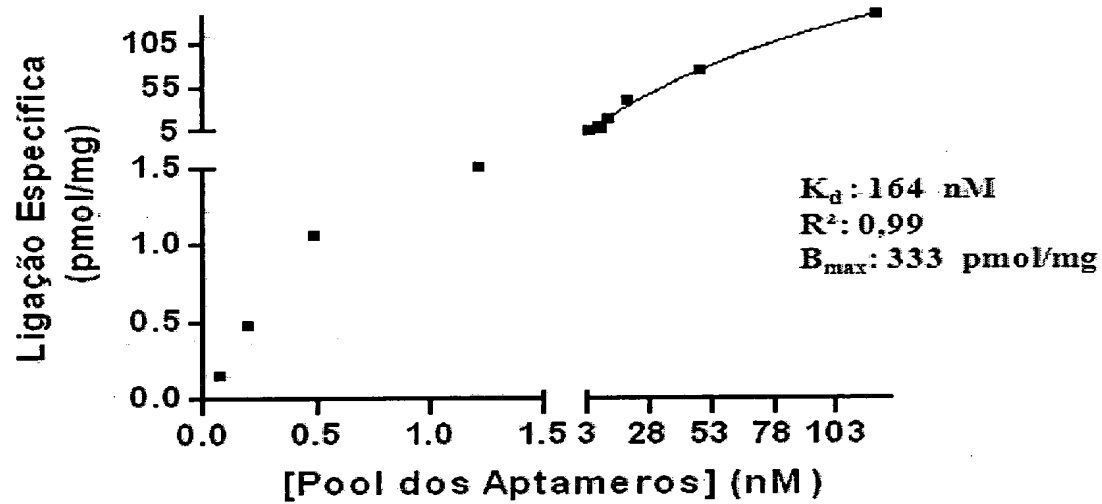
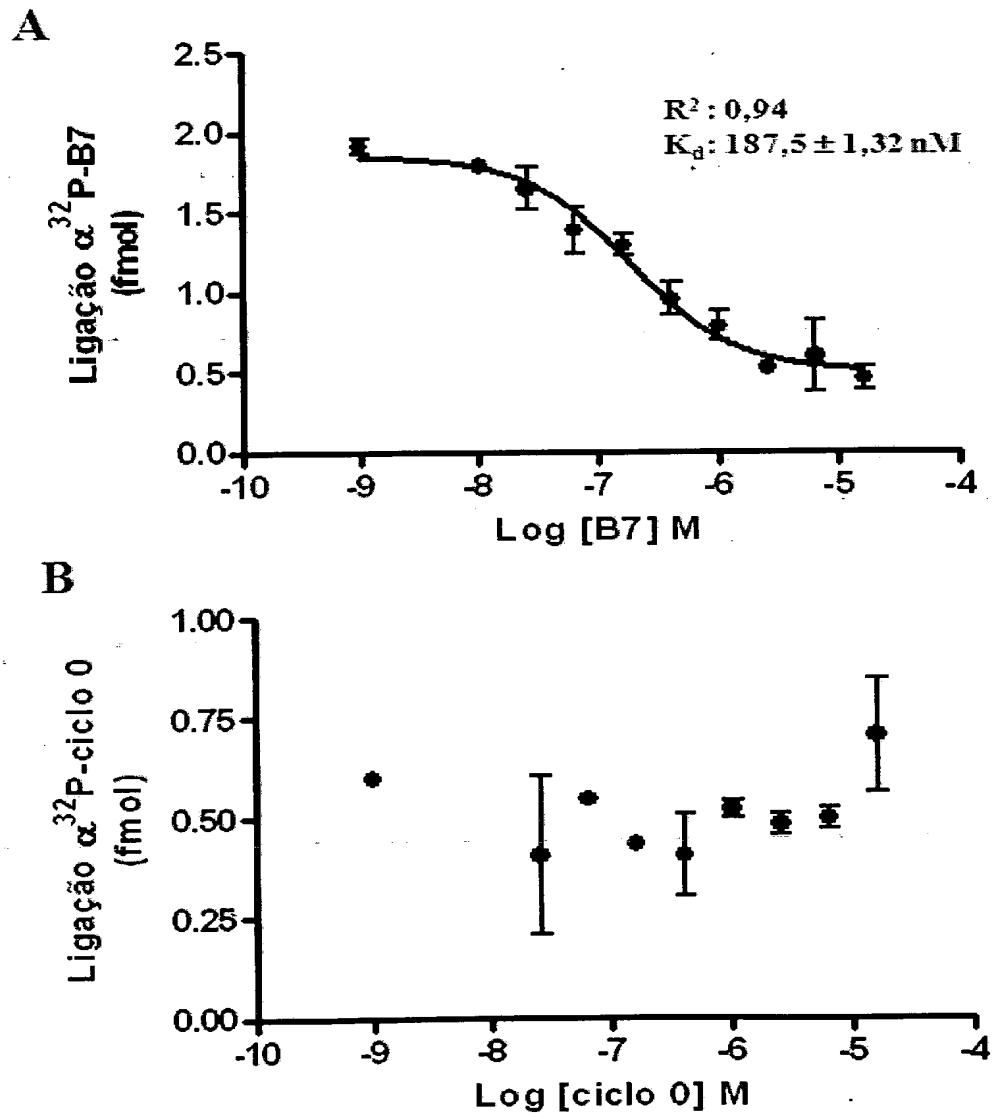
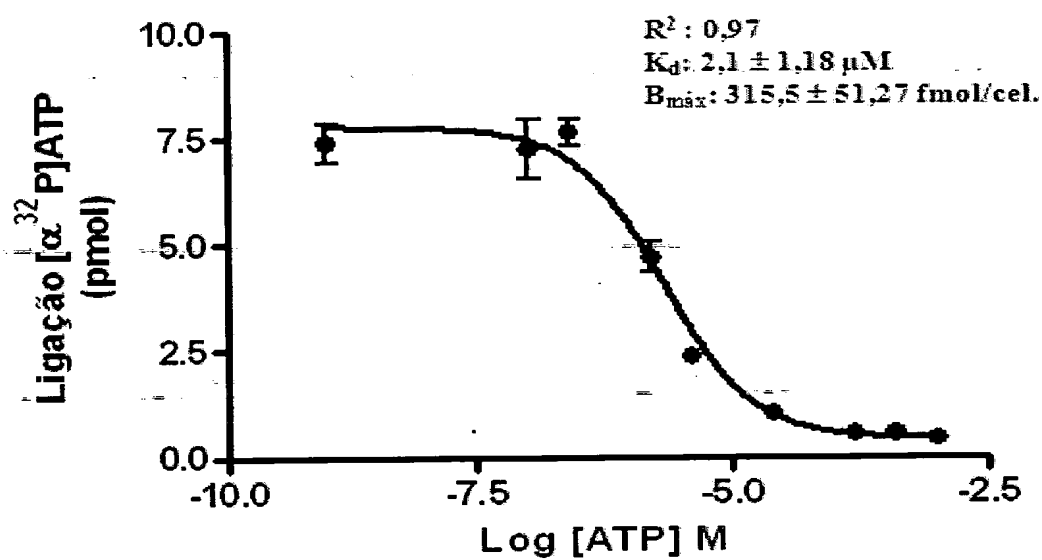
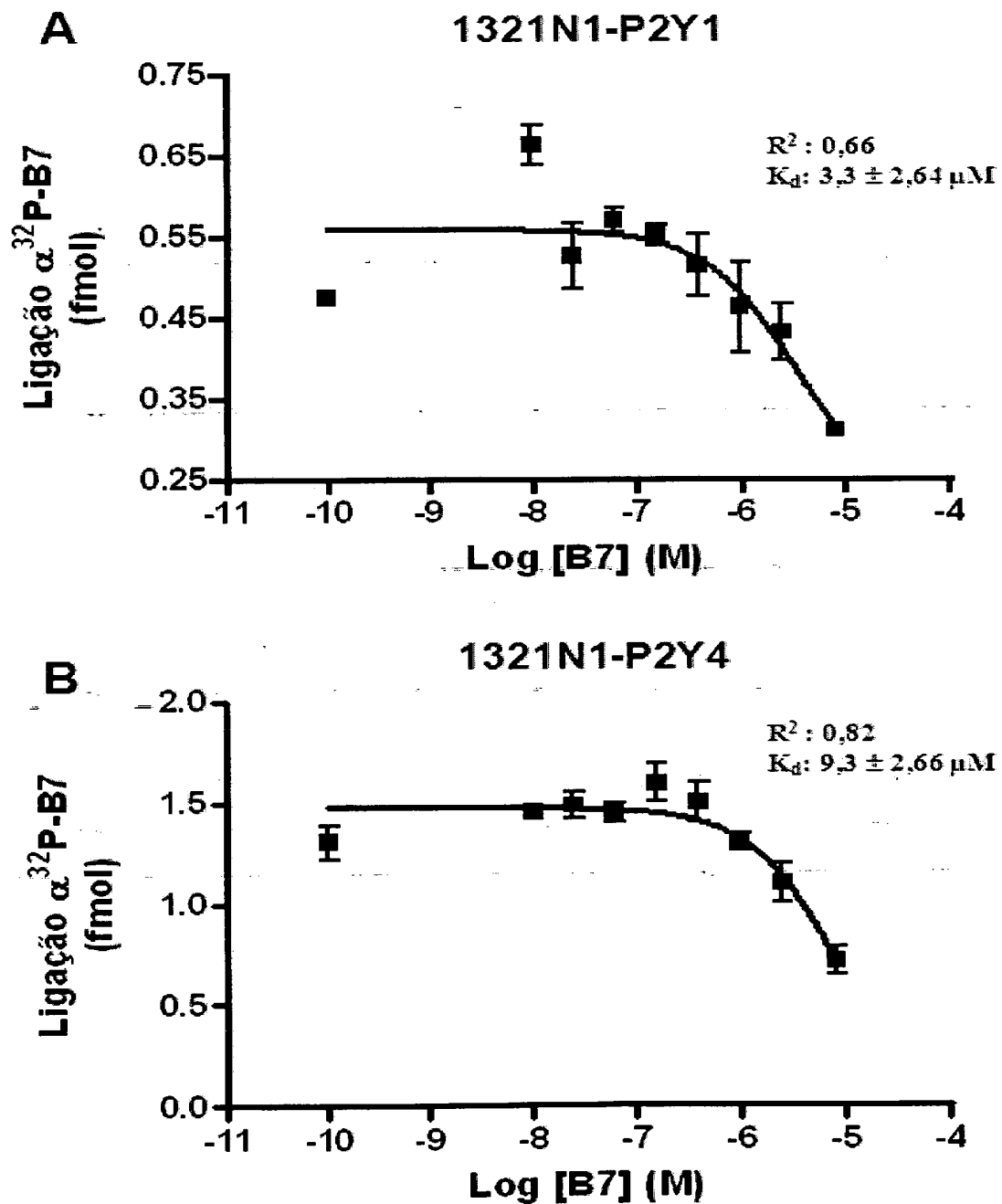


FIG. 3

**FIG. 4**

**FIG. 5**

**FIG. 6**

**FIG. 7**

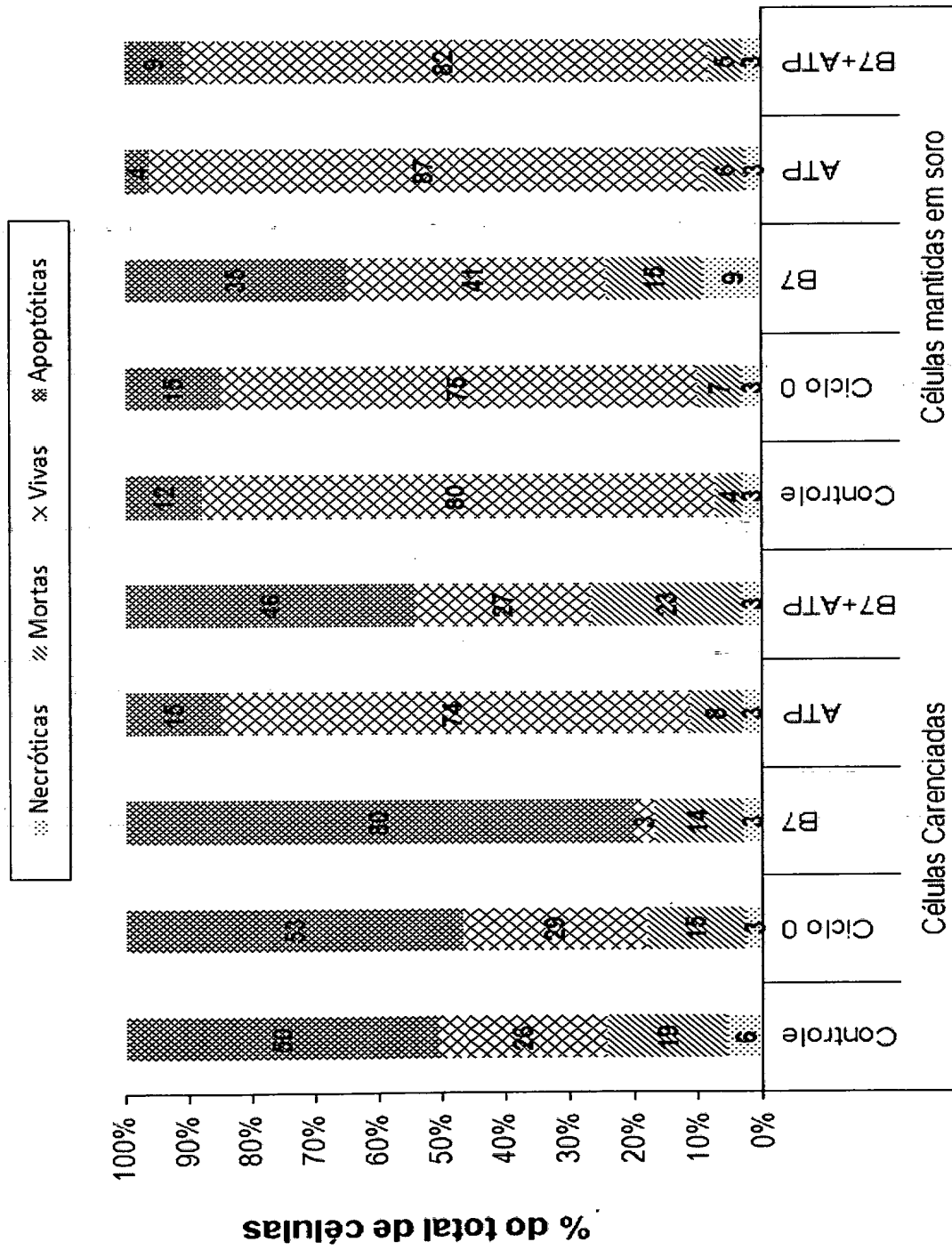


FIG. 8

Resumo**SEQUÊNCIAS DE RIBONUCLEOTÍDEOS QUIMICAMENTE MODIFICADAS
COMO MODULADORES DA ATIVIDADE DE RECEPTORES PURINÉRGICOS
P2Y2 E APTÂMERO B7**

5 A presente invenção refere-se a uma família de 21
sequências de ribonucleotídeos modificadas quimicamente
pela substituição do grupo 2'-OH dos nucleotídeos de
pirimidina por um átomo de Flúor: 2'-F-dCTP e 2'-F-dCUTP com
alta afinidade de ligação ao receptor purinérgico P2Y2,
10 sendo relevantes em qualquer processo que envolva a
sinalização purinérgica via o receptor P2Y2, incluindo, mas
não limitando, o seu uso como reagente em ensaios
farmacológicos (*in vivo* e *in vitro*, de citômica, em testes
de diagnóstico e como antagonista em aplicações
15 terapêuticos como, por exemplo, fibrose cística, lesão e
enfisema de pulmão em fumantes e neoplasias, cardio e
neuroproteção e neurodegeneração como, por exemplo, na
glicose reativa causada por neuroinflamação.
Particularmente, a presente invenção descreve o aptâmero
20 B7, apresentando uma considerável afinidade e
especificidade de ligação ao receptor purinérgico P2Y2,
mostrando uma atividade biológica inibitória sobre mesmo.