



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

(21) **PI0709895-2 A2**



(22) Data de Depósito: 30/03/2007
(43) Data da Publicação: 02/08/2011
(RPI 2117)

(51) *Int.Cl.:*
C12N 15/11 2006.01
A61K 31/712 2006.01
C07H 21/00 2006.01
A61P 3/06 2006.01
A61P 3/10 2006.01
A61P 31/14 2006.01
A61P 35/00 2006.01
A61P 9/10 2006.01

(54) Título: **COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA**

(30) Prioridade Unionista: 03/04/2006 US 60/788,995,
01/05/2006 US 60/796,813, 18/08/2006 US 60/838,710, 03/04/2006
DK PA200600478, 01/05/2006 DK PA200600615, 01/05/2006 US
60/796,813, 03/04/2006 DK PA200600478, 01/05/2006 DK
PA200600615

(73) Titular(es): Santaris Pharma A/S

(72) Inventor(es): Phill Kearney, Sakari Kauppinen

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

(86) Pedido Internacional: PCT DK2007000168 de 30/03/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/112753 de 11/10/2007

(57) Resumo: COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA invenção proporciona composições farmacêuticas compreendendo oligonucleotídeos de fita única, com um comprimento de entre 8 e 26 nucleobases, os quais são complementares a micro-RNAs humanos selecionados do grupo consistindo em miR1 9b, miR21, miRi 22a, miRi 55 e miR375. Os oligonucleotídeos curtos são particularmente eficazes no alívio de repressão de miRNA in vivo. Descobriu-se que a incorporação de análogos de nucleotídeo de alta afinidade nos oligonucleotídeos resulta em moléculas de anti-micro-RNA altamente eficazes os quais parecem funcionar via a formação de duplas quase irreversíveis com o alvo de miRNA ao invés de mecanismos baseados em clivagem de RNA, tais como mecanismos associados à RNaseH ou RISC.

020080449733108
PI0709895-2

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA**".

CAMPO DA INVENÇÃO

5 A presente invenção refere-se à composições farmacêuticas compreendendo oligonucleotídeos de fita única contendo LNA capazes de inibição de micro-RNAs que induzem à doença, particularmente micro-RNAs humanos miR-19b, miR-21, miR-122A, miR-155 e miR-375.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Micro-RNAs- novos reguladores de expressão de gene

10 Micro-RNAs (miRNAs) são uma classe abundante de RNAs endógenos curtos que atuam como reguladores pós-transcricionais de expressão de gene através de emparelhamento de base com seus mRNAs alvo. Os miRNAs maduros são seqüencialmente processados a partir de transcritos de hairpina mais longos pelas ribonucleases de RNase III de Drosha
15 (Lee e outros 2003) e Dicer (Hutvagner e outros 2001, Ketting e outros 2001). Até o momento, mais de 3400 miRNAs foram anotados em vertebrados, invertebrados e plantas de acordo com a liberação 7.1 do banco de dados de micro-RNA miRBase em outubro de 2005 (Griffith-Jones 2004, Griffith-Jones e outros 2006) e muitos miRNAs que correspondem a genes putativos também foram identificados.
20

A maioria dos miRNAs de animais reconhece seus sítios alvos localizados em 3'-UTRs através de emparelhamento de base incompleto, resultando em repressão traducional dos genes alvo (Bartel 2004). Um grupo crescente de pesquisa mostra que miRNAs de animal exercem papéis biológicos fundamentais no crescimento e apoptose celular (Brennecke e outros
25 2003), diferenciação de linhagem hematopoiética (Chen e outros 2004), regulação da expectativa de vida (Boehm e Slack 2005), diferenciação de fotorreceptor (Li e Carthew 2005), regulação de gene de homeobox (Yekta e outros 2004, Hornstein e outros 2005), assimetria neuronal (hnston e outros
30 2004), secreção de insulina (Poy e outros 2004), morfogênese cerebral (Giraldez e outros 2005), proliferação e diferenciação muscular (Chen, Mandel e outros 2005, Kwon e outros 2005, Sokol e Ambros 2005), cardiogênese

(Zhao e outros 2005) e desenvolvimento embriônico em vertebrados (Wieholds e outros 2005).

Micro-RNAs em doenças humanas

miRNAs estão envolvidos em uma ampla variedade de doenças humanas. Uma é atrofia muscular espinhal (SMA), uma doença neurodegenerativa pediátrica causada por níveis reduzidos de proteína ou mutações que causam perda de função da sobrevivência do gene de neurônios motores (SMN) (Paushkin e outros 2002). Recentemente, foi mostrado que uma mutação no sítio alvo de miR-189 no gene SLITRK1 humano está associada à síndrome de Tourette (Abelson e outros 2005), enquanto que outro estudo recente reportou que o genoma de RNA do vírus da hepatite C (HCV) interage com um micro-RNA da célula hospedeira, o miR-122a fígado-específico, para facilitar sua replicação no hospedeiro (Jopling e outros 2005). Outras doenças nas quais um miRNAs ou sua maquinaria de processamento foram implicados incluem retardo mental X frágil (FXMR) causado por ausência da proteína de retardo mental X frágil (FMRP) (Nelson e outros 2003, Jin e outros 2004) e síndrome de DiGeorge (Landthaler e outros 2004).

Além disso, padrões de expressão de miRNA alterados foram reportados em muitos cânceres humanos. Por exemplo, os genes de miRNA humanos miR15a e miR16-1 são deletados ou sub-regulados na maioria dos casos de leucemia linfocítica crônica de células B (CLL), onde uma assinatura única de 13 genes de miRNA foi recentemente mostrada estar associada ao prognóstico e progressão (Calin e outros 2002, Calin e outros 2005). O papel de miRNAs em câncer é ainda sustentado pelo fato de que mais de 50% dos genes de miRNA humanos estão localizados em regiões genômicas câncer-associadas ou em sítios frágeis (Calin e outros 2004). Recentemente, análise de expressão sistemática de uma diversidade de cânceres humanos revelou uma sub-regulação geral de miRNAs em tumores comparado com tecidos normais (Lu e outros 2005). De modo interessante, classificação miRNA-baseada de tumores pobremente diferenciados obteve sucesso, enquanto que perfis de mRNA eram altamente imprecisos quando aplicados às mesmas amostras. Também foi mostrado que miRNAs são

desregulados em câncer de mama (Iorio e outros 2005), câncer de pulmão (Johnson e outros 2005) e câncer de cólon (Michael e outros 2004), enquanto que o agrupamento miR-17-92, o qual é amplificado em linfomas de célula B humanos e miR-155, o qual é super-regulado em linfoma de Burkitt, foram reportados como os primeiros oncogenes de miRNA humano (Eis e outros 2005, He e outros 2005). Assim, miRNAs humanos não seriam apenas altamente úteis como biomarcadores para futuro diagnóstico de câncer, mas estão emergindo rapidamente como alvos atraentes para intervenção em doenças através de tecnologias de oligonucleotídeo.

10 *Inibição de miRNAs usando oligonucleotídeos de fita única*

Várias abordagens de oligonucleotídeo foram reportadas para várias abordagens de oligonucleotídeo foram reportadas para inibição de miRNA.

15 O WO03/029459 (Tuschl) reivindica oligonucleotídeos os quais codificam miRNAs e seus complementos de entre 18-25 nucleotídeos de comprimento os quais podem compreender análogos de nucleotídeo. LNA é sugerido como um possível análogo de nucleotídeo, embora nenhum oligonucleotídeo contendo LNA seja divulgado. Tuschl reivindica que oligonucleotídeos de miRNA podem ser usados em terapia.

20 O US2005/0182005 divulga um oligorribonucleotídeo de 2'OMe RNA de 24 mers complementares à forma mais longa de miR 21, o qual descobriu-se que reduz a repressão induzida por miR 21, enquanto que um oligonucleotídeo contendo DNA equivalente não. O termo 2'OMe-RNA se refere a um análogo RNA onde há uma substituição para metila na posição 2' (2'OMetila).

25 O US2005/0227934 (Tuschl) se refere a moléculas antimir com até 50% de resíduos de DNA. Ele também reporta que antimirs contendo 2' OMe RNA foram usados contra miRNAs pancreáticos, mas parece que nenhuma estrutura de oligonucleotídeo real é divulgada.

30 O US20050261218 (ISIS) reivindica um composto oligomérico compreendendo uma primeira região e uma segunda região, em que pelo menos uma região compreende uma modificação e uma porção do compos-

to oligomérico é objetivada a um ácido nucléico alvo de RNA de não codificação pequeno, em que o ácido nucléico alvo de RNA de não-codificação pequeno é um miRNA. Compostos oligoméricos de entre 17 e 25 nucleotídeos de comprimento são reivindicados. Os exemplos se referem a compostos PS totalmente 2' OMe, 21meros e 20 meros e oligonucleotídeos de gap-mero 2'OMe objetivados contra uma faixa de pré-miRNA e alvos de miRNA maduro.

Boutla e outros 2003 (Nucleic Acids Research 31: 4973-4980) descrevem o uso de oligonucleotídeo de DNA anti-sentido complementares a 11 diferentes miRNAs em *Drosophila*, bem como a seu uso para inativar os miRNAs através de injeção dos oligonucleotídeos de DNA em embriões de mosca. Dos 11 oligonucleotídeos de DNA anti-sentido, apenas 4 estruturas mostraram interferência grave com o desenvolvimento normal, enquanto que os 7 oligonucleotídeos restantes não mostram quaisquer fenótipos, presumivelmente em virtude de sua incapacidade de inibir o miRNA em questão.

Uma abordagem alternativa a isso foi reportada por Hutvagner e outros (2004) e Leaman e outros (2005), na qual oligonucleotídeos anti-sentido 2'-O-metila, complementares ao miRNA maduro, poderiam ser usados como inibidores potente e irreversíveis de RNA de interferência curto (siRNA) e função de miRNA *in vitro* e *in vivo* em *Drosophila* e *C. elegans*, desse modo, induzindo a um fenótipo de perda de função. Uma deficiência desse método é a necessidade de altas concentrações de oligonucleotídeo 2'-O-metila (100 micromolar) em experimentos de transfecção e injeção, as quais podem ser tóxicas para o animal. Esse método foi recentemente aplicado a estudos com camundongos, através de conjugação de oligonucleotídeos anti-sentido 2'-O-metila complementares a quatro diferentes miRNAs em colesterol para silenciamento de miRNAs *in vivo* (Krützfeldt e outros 2005). Esses assim denominados antagomirs foram administrados a camundongos através de injeções intravenosas. Embora esses experimentos tenham resultado em silenciamento eficaz de miRNAs endógenos *in vivo*, o qual descobriu-se ser específico, eficiente e de longa duração, uma principal deficiência era a necessidade de alta dosagem (80 mg/kg) de antagomir 2'-

O-Me para silenciamento eficiente.

Inibição de micro-RNAs usando oligonucleotídeos LNA-modificados foi anteriormente descrita por Chan e outros *Cancer Research* 2005, 65 (14) 6029-6033, Lecellier e outros *Science* 2005, 308, 557-560, Naguibneva e outros *Nature Cell Biology* 2006 8 (3), 278-84 e Ørum e outros *Gene* 2006, (Disponível online em 24 de fevereiro de 2006). Em todos os casos, os oligonucleotídeos anti-mir LNA-modificados eram complementares a todo o micro-RNA maduro, isto é, 20-23 nucleotídeos de comprimento, o que impede a captação eficiente *in vivo* e ampla biodistribuição das moléculas.

10 Naguibneva (Naguibneva e outros *Nature Cell Biology* 2006 8) descrevem o uso de um oligonucleotídeo anti-sentido de DNA-LNA-DNA mixmer anti-mir para inibir a função do micro-RNA miR-181 *in vitro*, o qual é um bloco de 8 nucleotídeos de LNA localizado no centro da molécula flanqueada por 6 nucleotídeos de DNA na extremidade 5' e 9 nucleotídeos de DNA na extremidade 3', respectivamente. Uma principal deficiência desse design anti-sentido é a baixa estabilidade *in vivo* em virtude de baixa resistência à nuclease das extremidade de DNA de flanqueamento.

15 Embora Chan e outros (Chan e outros *Cancer Research* 2005, 65 (14) 6029-6033), e Ørum e outros (Ørum e outros *Gene* 2006, (Disponível online em 24 de Fevereiro de 2006) não divulguem o design das moléculas anti-mir LNA-modificadas usadas em seu estudo, Lecellier e outros (Lecellier e outros *Science* 2005, 308, 557-560) descrevem o uso de um oligonucleotídeo anti-sentido de gap-mero LNA-DNA-LNA anti-mir para inibir a função de micro-RNA, no qual um bloco 4 nucleotídeos de LNA está localizado na extremidade 5' e na extremidade 3', respectivamente, com uma janela de 13 nucleotídeos de DNA no centro de cada molécula. Uma principal deficiência desse design anti-sentido é a baixa captação *in vivo*, bem como baixa estabilidade em virtude do trecho de DNA de 13 nucleotídeos do oligonucleotídeo anti-mir.

25
30 Assim, há uma necessidade no campo por oligonucleotídeos aperfeiçoados capazes de inibir micro-RNAs.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção está baseada na descoberta de que o uso de oligonucleotídeos curtos projetados para se ligar com alta afinidade a alvos de miRNA são altamente eficazes para aliviar a repressão de mRNA por micro-RNAs *in vivo*.

Embora não desejando estar preso a qualquer teoria específica, a evidência divulgada aqui indica que a objetivação altamente eficiente de miRNAs *in vivo* é obtida projetando oligonucleotídeo com o objetivo de formação de uma dupla altamente estável com o miRNA alvo *in vivo*. Isso é obtido através do uso de análogos de nucleotídeos de alta afinidade, tal como pelo menos uma unidade de LNA e, adequadamente, outros análogos de nucleotídeo de alta afinidade, tais como LNA, 2'-MOE RNA de análogos de nucleotídeo 2'-Fluoro, em um oligonucleotídeo curto, tal como, 10-17 ou 10-16 nucleobases. Em um aspecto, o objetivo é gerar um oligonucleotídeo de um comprimento o qual é improvável de formar um complexo de siRNA (isto é, um oligonucleotídeo curto) e com uma carga suficiente de análogos de nucleotídeo de alta afinidade, de modo que o oligonucleotídeo adere quase permanentemente a seu miRNA alvo, formando eficazmente uma dupla estável e não funcional com o miRNA alvo. Descobriu-se que tais designs são consideravelmente mais eficientes do que os oligonucleotídeos da técnica anterior, particularmente designs de gap-mero e bloc-âmero e oligonucleotídeos os quais têm um comprimento longo, por exemplo, 20-23 meros. O termo 2'-Fluoro DNA se refere a um análogo de DNA onde há uma substituição para flúor na posição 2' (2'F).

A invenção proporciona uma composição farmacêutica compreendendo um oligonucleotídeo tendo um comprimento de entre 8 e 17, tal como 10 e 17, tal como 8-16 ou 10-16 unidades de nucleobase, um diluente, veículo ou adjuvante farmacêuticamente aceitável, em que pelo menos uma das unidades de nucleobase do oligonucleotídeo de fita única é um análogo de nucleotídeo de alta afinidade, tal como uma unidade de nucleobase de Ácido Nucléico Bloqueado (LNA) e em que o oligonucleotídeo de fita única é complementar a uma seqüência de micro-RNA humana selecionada do gru-

po consistindo em micro-RNAs humanos miR-19b, miR-21, miR-122A, miR-155 e miR-375.

5 A invenção proporciona uma composição farmacêutica compreendendo um oligonucleotídeo tendo um comprimento de 10 a 26 unidades de nucleobase e um diluente, veículo ou adjuvante farmacêuticamente aceitável, em que o oligonucleotídeo compreende uma seqüência de DNA central a partir das posições dois a sete ou das posições três a oito, contando a partir da extremidade 3' de 3' acgttt 5' (SEQ ID NO 6, 5'tttgca3'), em que pelo menos uma, tal como uma, de preferência, pelo menos duas, tal como duas
10 ou três unidades de DNA na referida seqüência foram substituídas por sua unidade de LNA correspondente e, opcionalmente, em que o referido oligonucleotídeo não compreende uma região de mais de 7 unidades de DNA contínuas.

15 A invenção proporciona uma composição farmacêutica compreendendo um oligonucleotídeo tendo um comprimento de 10 a 26 unidades de nucleobase e um diluente, veículo ou adjuvante farmacêuticamente aceitável, em que o oligonucleotídeo compreende uma seqüência de DNA central a partir das posições dois a sete ou das posições três a oito, contando a partir da extremidade 3' de 3' ctca 5' (SEQ ID NO 7, 5' acactc 3'), em que
20 pelo menos uma, tal como uma, de preferência pelo menos duas, tal como duas ou três unidades de DNA na referida seqüência foram substituídas por sua unidade de LNA correspondente e, opcionalmente, em que o referido oligonucleotídeo não compreende uma região de mais de 7 unidades de DNA contínuas.

25 A invenção proporciona uma composição farmacêutica compreendendo um oligonucleotídeo tendo um comprimento de 10 a 26 unidades de nucleobase e um diluente, veículo ou adjuvante farmacêuticamente aceitável, em que o oligonucleotídeo compreende uma seqüência de DNA central a partir das posições dois a sete ou das posições três a oito, contando a
30 partir da extremidade 3' de 3' ttacga 5' (SEQ ID NO 8, 5'agcatt3'), em que pelo menos uma, tal como uma, de preferência pelo menos duas, tal como duas ou três unidades de DNA na referida seqüência foram substituídas por

sua unidade de LNA correspondente e, opcionalmente, em que o referido oligonucleotídeo não compreende uma região de mais de 7 unidades de DNA contínuas.

5 A invenção proporciona uma composição farmacêutica compreendendo um oligonucleotídeo tendo um comprimento de 10 a 26 unidades de nucleobase e um diluente, veículo ou adjuvante farmacêuticamente aceitável, em que o oligonucleotídeo compreende uma seqüência de DNA central a partir das posições dois a sete ou das posições três a oito, contando a partir da extremidade 3' de 3' acaagc 5' (SEQ ID NO 9, 5' cgaaca 3'), em que
10 pelo menos uma, tal como uma, de preferência pelo menos duas, tal como duas ou três unidades de DNA na referida seqüência foram substituídas por sua unidade de LNA correspondente e, opcionalmente, em que o referido oligonucleotídeo não compreende uma região de mais de 7 unidades de DNA contínuas.

15 A invenção proporciona uma composição farmacêutica compreendendo um oligonucleotídeo tendo um comprimento de 10 a 26 unidades de nucleobase e um diluente, veículo ou adjuvante farmacêuticamente aceitável, em que o oligonucleotídeo compreende uma seqüência de DNA central a partir das posições dois a sete ou das posições três a oito, contando a
20 partir da extremidade 3' de 3' cgaata 5' (SEQ ID NO 10, 5' ataagc3'), em que pelo menos uma, tal como uma, de preferência pelo menos duas, tal como duas ou três unidades de DNA na referida seqüência foram substituídas por sua unidade de LNA correspondente e, opcionalmente, em que o referido oligonucleotídeo não compreende uma região de mais de 7 unidades de
25 DNA contínuas.

Os análogos de nucleotídeo de alta afinidade são análogos de nucleotídeo os quais resultam em um oligonucleotídeo o qual tem uma maior estabilidade térmica da dupla com um nucleotídeo de RNA complementar do que a afinidade de ligação de um nucleotídeo de DNA equivalente. Isso é,
30 tipicamente, determinado medindo a T_m .

Não identificam-se quaisquer efeitos que não sobre o alvo significativos quando usando esses oligonucleotídeos curtos de alta afinidade

objetivados contra miRNAs específicos. Na verdade, a evidência fornecida aqui indica que os efeitos sobre a expressão de mRNA são em virtude da presença de uma seqüência complementar ao miRNA objetivado (alvos de mRNA primários) dentro do mRNA ou efeitos secundários sobre mRNAs os
5 quais são regulados por alvos de mRNA primários (alvos de mRNA secundários). Nenhum efeito de toxicidade foi identificado, indicando nenhum efeito prejudicial significativo que não sobre o alvo.

A invenção ainda proporciona o uso de um oligonucleotídeo de acordo com a invenção, tal como aquele o qual pode formar parte da composição farmacêutica, para a fabricação de um medicamento para o trata-
10 mento de uma doença ou distúrbio médico associado à presença ou superexpressão (super-regulação) do micro-RNA.

A invenção ainda proporciona um método para o tratamento de uma doença ou distúrbio médico associado à presença ou superexpressão
15 do micro-RNA compreendendo a etapa de administração de uma composição (tal como a composição farmacêutica) de acordo com a invenção a uma pessoa que precisa de tratamento.

A invenção ainda proporciona um método para redução da quantidade eficaz de um miRNA em uma célula ou um organismo compre-
20 endendo administração de uma composição (tal como a composição farmacêutica) de acordo com a invenção ou um oligonucleotídeo de fita única de acordo com a invenção à célula ou ao organismo. Redução da quantidade eficaz, nesse contexto, se refere à redução do miRNA funcional presente na célula ou organismo. É reconhecido que os oligonucleotídeos preferidos de
25 acordo com a invenção podem nem sempre reduzir significativamente a quantidade real de miRNA na célula ou organismo uma vez que, tipicamente, eles formam duplas muito estáveis com seus miRNAs alvo.

A invenção ainda proporciona um método para a reversão de repressão de um mRNA alvo de um miRNA em uma célula ou um organismo
30 compreendendo administração de uma composição (tal como a composição farmacêutica) ou um oligonucleotídeo de fita única de acordo com a invenção à célula ou organismo.

A invenção ainda proporciona o uso de um oligonucleotídeo de fita única de entre 8-16, tal como entre 10-16 nucleobases de comprimento, para a fabricação de um medicamento para o tratamento de uma doença ou distúrbio médico associado à presença ou superexpressão do micro-RNA.

5 A invenção ainda proporciona um método para o tratamento de uma doença ou distúrbio médico associado à presença ou superexpressão do micro-RNA compreendendo a etapa de administração de uma composição (tal como a composição farmacêutica) compreendendo um oligonucleotídeo de fita única de entre 8-16, tal como entre 10-16 nucleobases de comprimento a uma pessoa que precisa de tratamento.

10 A invenção ainda proporciona um método para redução da quantidade eficaz de um miRNA alvo (isto é, a quantidade de miRNA a qual está disponível para reprimir mRNAs alvo) em uma célula ou organismo compreendendo administração de uma composição (tal como a composição farmacêutica) compreendendo um oligonucleotídeo de fita única de entre 8-16, tal como entre 10-16 nucleobases, à célula ou ao organismo.

15 A invenção ainda proporciona um método para reversão de repressão de um mRNA alvo de um miRNA em uma célula ou um organismo compreendendo um oligonucleotídeo de fita única de entre 8-16, tal como 20 10-16 nucleobases ou uma composição compreendendo o referido oligonucleotídeo à célula ou ao organismo.

A invenção ainda proporciona um método para a síntese de um oligonucleotídeo de fita única objetivado contra um micro-RNA humano selecionado do grupo consistindo em micro-RNAs humanos miR-19b, miR-21, 25 miR-122A, miR-155 e miR-375, tal como um oligonucleotídeo de fita única descrito aqui, o referido método compreendendo as etapas de:

- a. Opcionalmente seleção de uma primeira nucleobase, contando a partir da extremidade 3', a qual é um análogo de nucleotídeo, tal como uma nucleobase de LNA.
- 30 b. Opcionalmente, seleção de uma segunda nucleobase, contando a partir da extremidade 3', a qual é um análogo de nucleotídeo, tal como uma nucleobase de LNA.

c. Seleção de uma região do oligonucleotídeo de fita única a qual corresponde à região de cultura de miRNA, em que a referida região é conforme definido aqui.

5 d. Opcionalmente, seleção de uma sétima e oitava nucleobases conforme definido aqui.

e. Opcionalmente seleção entre 1 e 10 outras nucleobases as quais podem ser selecionadas do grupo consistindo em nucleotídeos (x) e análogos de nucleotídeo (X), tal como LNA.

10 f. Opcionalmente, seleção de uma região 5' do oligonucleotídeo de fita única conforme definido aqui.

g. Opcionalmente, seleção de um 5' término do oligonucleotídeo de fita única conforme definido aqui.

em que a síntese é realizada através de síntese seqüencial das regiões definidas nas etapas a-g, em que a referida síntese pode ser realizada na direção 3'-5' (a para g) ou 5' – 3' (g para a) e em que o referido oligonucleotídeo de fita única é complementar a uma seqüência do miRNA alvo.

15 Em uma modalidade, o oligonucleotídeo da invenção é projetado para não ser recrutado por RISC ou para mediar a clivagem RISC-dirigida do miRNA alvo. Considera-se que, usando oligonucleotídeos longos, isto é, de 20 21 ou 22 meros. Particularmente oligonucleotídeos de RNA ou um oligonucleotídeo "análogo" de RNA o qual é complementar ao miRNA alvo, o oligonucleotídeo pode competir contra o mRNA alvo em termos de associação ao complexo RISC e, desse modo, aliviar a repressão de miRNA dos mRNAs alvos de miRNA via a introdução de um oligonucleotídeo o qual compete 25 como um substrato pelo miRNA.

Contudo, a presente invenção busca prevenir tal clivagem de mRNA alvo indesejável ou inibição traducional através de fornecimento de oligonucleotídeos capazes de complementar e, aparentemente, em alguns casos, se ligar quase que irreversivelmente ao micro-RNA maduro. Isso parece resultar em uma forma de proteção contra degradação ou clivagem (por 30 exemplo, pelo RISC ou RNaseH ou outras endo- ou exo-nucleases), o que pode não resultar em redução substancial ou mesmo significativa do miRNA

(por exemplo, conforme detectado através de Northern blot usando sondas de LNA) dentro de uma célula, mas assegura que a quantidade eficaz do miRNA, conforme medido através de análise de reversão de repressão, é reduzida consideravelmente. Portanto, em um aspecto, a invenção proporciona oligonucleotídeos os quais são projetados propositalmente para não serem compatíveis com o complexo RISC, mas removem miRNA através de titulação pelo oligonucleotídeo. Embora não desejando estar preso a uma teoria específica sobre porque os oligonucleotídeos da presente invenção são tão eficazes, em analogia aos oligonucleotídeos baseado em RNA (ou 2'OMe oligonucleotídeos completos), parece que os oligonucleotídeos de acordo com a presente invenção funcionam através de inibição não competitiva da função de miRNA, uma vez que eles removem mais eficazmente o miRNA disponível do citoplasma onde, conforme os oligonucleotídeos da técnica anterior, proporcionam um substrato alternativo ao miRNA, o qual pode atuar como um inibidor de competidor, a eficácia do qual seria mais dependente da concentração do oligonucleotídeo no citoplasma, bem como da concentração do mRNA e miRNA alvos.

Embora não desejando estar preso a qualquer teoria específica, uma outra possibilidade que pode existir com o uso de oligonucleotídeos de comprimento aproximadamente similar aos miRNAs alvo (isto é, o miRNA) é que os oligonucleotídeos poderiam formar uma dupla semelhante a siRNA com o miRNA alvo, uma situação a qual reduziria a eficácia do oligonucleotídeo. Também é possível que os oligonucleotídeos em si possam ser usados como a fita guia dentro do complexo RISC, desse modo, gerando a possibilidade de degradação RISC-dirigida de alvos não específicos, o que acontece apenas para ter complementaridade suficiente ao guia de oligonucleotídeo.

Através de seleção de oligonucleotídeos curtos para objetivação de seqüências de miRNA, tais problemas são evitados.

Oligonucleotídeos curtos os quais incorporam LNA são conhecidos da área de reagentes, tal como o LNA (veja, por exemplo, WO2005/098029 e W0 2006/069584). Contudo, as moléculas projetadas para uso diagnóstico e reagente são de design muito diferente daquele para uso farmacêutico. Por

exemplo, as nucleobases terminais dos oligos reagentes, tipicamente, não são LNA, mas DNA, e as ligações de internucleosídeo são, tipicamente, outras que não fosforotioato, a ligação preferida para uso nos oligonucleotídeos da presente invenção. A invenção, portanto, proporciona uma nova classe de oligonucleotídeos *per se*.

A invenção ainda proporciona um oligonucleotídeo (fita única), conforme descrito no contexto da composição farmacêutica da invenção, em que o referido oligonucleotídeo compreende:

- i) pelo menos uma ligação de fosforotioato e/ou
- ii) pelo menos uma unidade de LNA 3'terminal e/ou
- iii) pelo menos uma unidade de LNA 5' terminal.

É preferível, para a maioria dos usos terapêuticos, que o oligonucleotídeo seja completamente fosforotiolado – a exceção sendo para oligonucleotídeos terapêuticos para uso no CNS, tal como no cérebro ou coluna, onde a fosforotioação pode ser tóxica e, em virtude da ausência de nucleases, ligações de fosfodiéster podem ser usadas, mesmo entre unidades de DNA consecutivas. Conforme mencionado aqui, outros aspectos preferidos do oligonucleotídeo de acordo com a invenção é que a segunda nucleobase 3' e/ou as 9^a e 10^a (a partir da extremidade 3') também podem ser LNA.

Os inventores descobriram que outros métodos para evitar clivagem de RNA (tal como degradação por *exo-nuclease* no soro sanguíneo ou clivagem RISC-associada do oligonucleotídeo de acordo com a invenção) são possíveis e, como tal, a invenção também proporciona um oligonucleotídeo de fita única o qual compreende:

- a. uma unidade de LNA na posição 1 e 2 contando a partir da extremidade 3' e/ou
- b. uma unidade de LNA na posição 9 e/ou 10, também contando a partir da extremidade 3' e/ou
- c. uma ou duas unidades de LNA 5'

Embora os benefícios desses outros aspectos possam ser observados com oligonucleotídeos mais longos, tal como um nucleotídeo de até 26 unidades de nucleobase de comprimento, considera-se que essas

características podem também ser usadas com os oligonucleotídeos mais curtos mencionados aqui, tal como os oligonucleotídeos de entre 8 – 17, 8 – 16, 10 – 17 ou 10 – 16 nucleobases descritos aqui. É altamente preferido que os oligonucleotídeos compreendam análogos de nucleotídeo de alta afinidade, tais como aqueles referidos aqui, mais preferivelmente unidades de LNA.

Os inventores, portanto, descobriram, surpreendentemente, que oligonucleotídeos de fita única cuidadosamente projetados compreendendo unidades de ácido nucléico bloqueado (LNA) em uma ordem particular mostram silenciamento significativo de micro-RNAs, resultando em níveis reduzidos de micro-RNA. Descobriu-se que ligação hermética dos referidos oligonucleotídeos à assim denominada seqüência de cultura, nucleotídeos de 2 a 8 ou 2-7, contando a partir da extremidade 5', dos micro-RNAs alvo, era importante. O nucleotídeo 1 dos micro-RNAs alvo é uma base de não emparelhamento e está, mais provavelmente, oculto em uma bolsa de ligação na proteína Ago 2. Embora não desejando estar preso a uma teoria específica, os presentes inventores consideram que, através de seleção das seqüências de região de cultura, particularmente com oligonucleotídeos que compreendem LNA, de preferência unidades de LNA na região a qual é complementar à região de cultura, a dupla entre miRNA e oligonucleotídeo é particularmente eficaz na objetivação de miRNAs, evitando efeitos que não sobre o alvo e, possivelmente, proporcionando uma outra característica a qual impede a função de miRNA RISC-dirigida.

Os inventores descobriram, surpreendentemente, que silenciamento de micro-RNA é ainda mais intensificado quando oligonucleotídeos de fita única LNA-modificados não contêm um nucleotídeo na extremidade 3' correspondendo a esse nucleotídeo 1 não emparelhado. Descobriu-se ainda que duas unidades de LNA na extremidade 3' dos oligonucleotídeos de acordo com a presente invenção tornam os referidos oligonucleotídeos altamente resistentes à nuclease.

Ainda, descobriu-se que os oligonucleotídeos da invenção os quais têm pelo menos um análogo de nucleotídeo, tal como um nucleotídeo

de LNA nas posições correspondendo às posições 10 e 11, contando a partir da extremidade 5' do micro-RNA alvo, podem impedir a clivagem dos oligonucleotídeos da invenção.

Conseqüentemente, em um aspecto, a invenção se refere a um
5 oligonucleotídeo tendo um comprimento de 12 a 26 nucleotídeos, em que:

i) o primeiro nucleotídeo, contando a partir da extremidade 3',
é uma unidade de ácido núcleo bloqueada (LNA),

ii) o segundo nucleotídeo, contando a partir da extremidade 3',
é uma unidade de LNA; e

10 iii) os nono e/ou décimo nucleotídeos, contando a partir da ex-
tremidade 3', são uma unidade de LNA.

A invenção ainda proporciona oligonucleotídeos conforme defi-
nido aqui para uso como um medicamento.

A invenção ainda refere-se a composições compreendendo os
15 oligonucleotídeos definidos aqui e um veículo farmacologicamente aceitável.

Conforme mencionado acima, micro-RNAs estão relacionados a
uma série de doenças. Conseqüentemente, um quarto aspecto da invenção,
se refere ao uso de um oligonucleotídeo conforme definido aqui para a fabri-
cação de um medicamento para o tratamento de uma doença associada à
20 expressão de miRNAs selecionadas do grupo consistindo em atrofia muscu-
lar espinhal, síndrome de Tourette, vírus da hepatite C, retardo mental X frá-
gil, síndrome de DiGeorge e câncer, tal como leucemia linfocítica crônica,
câncer de mama, câncer de pulmão e câncer de cólon, em particular câncer.

Um outro aspecto da invenção é um método para reduzir os ní-
25 veis de micro-RNA alvo através de contato do micro-RNA alvo com um oli-
gonucleotídeo conforme definido aqui, em que o oligonucleotídeo:

1. é complementar ao micro-RNA alvo,

2. não contém um nucleotídeo na extremidade 3' que corres-
ponde ao primeiro nucleotídeo da extremidade 5' do micro-RNA alvo.

30 A invenção ainda proporciona um oligonucleotídeo compreen-
dendo uma seqüência de nucleobase selecionada do grupo consistindo em
SEQ ID NO 20, SEQ ID NO 21, SEQ ID NO 22, SEQ ID NO 23, SEQ ID NO

24, SEQ ID NO 25, SEQ ID NO 28, SEQ ID NO 26, SEQ ID NO 27, SEQ ID NO 82, SEQ ID NO 83, SEQ ID NO 84, SEQ ID NO 85, SEQ ID NO 86, SEQ ID NO 87, SEQ ID NO 88, e SEQ ID NO 89; em que uma letra minúscula identifica a base nitrogenosa de uma unidade de DNA e uma letra maiúscula identifica a base nitrogenosa de uma unidade de LNA; e em que as citosinas de LNA são opcionalmente metiladas ou um conjugado dos mesmos.

A invenção ainda proporciona um oligonucleotídeo compreendendo uma seqüência de nucleobase selecionada do grupo consistindo em SEQ ID NO 11, SEQ ID NO 12, SEQ ID NO 13, SEQ ID NO 14, SEQ ID NO 15, SEQ ID NO 16, SEQ ID NO 17, SEQ ID NO 18, SEQ ID NO 19, SEQ ID NO 90, SEQ ID NO 91, SEQ ID NO 92, SEQ ID NO 93, SEQ ID NO 94, SEQ ID NO 95, SEQ ID NO 96, SEQ ID NO 97, SEQ ID NO 98, SEQ ID NO 99, SEQ ID NO 100, e SEQ ID NO 101; em que uma letra minúscula identifica a base nitrogenosa de uma unidade de DNA e uma letra maiúscula identifica a base nitrogenosa de uma unidade de LNA; e em que as citosinas de LNA são opcionalmente metiladas ou um conjugado dos mesmos.

A invenção ainda proporciona um oligonucleotídeo compreendendo uma seqüência de nucleobase selecionada do grupo consistindo em SEQ ID NO 29, SEQ ID NO 30, SEQ ID NO 31, SEQ ID NO 32, SEQ ID NO 33, SEQ ID NO 34, SEQ ID NO 35, SEQ ID NO 36, SEQ ID NO 37, SEQ ID NO 102, SEQ ID NO 103, SEQ ID NO 104, e SEQ ID NO 105; em que uma letra minúscula identifica a base nitrogenosa de uma unidade de DNA e uma letra maiúscula identifica a base nitrogenosa de uma unidade de LNA; e em que as citosinas de LNA são opcionalmente metiladas ou um conjugado dos mesmos.

A invenção ainda proporciona um oligonucleotídeo compreendendo uma seqüência de nucleobase selecionada do grupo consistindo em SEQ ID NO 47, SEQ ID NO 48, SEQ ID NO 49, SEQ ID NO 50, SEQ ID NO 51, SEQ ID NO 52, SEQ ID NO 53, SEQ ID NO 54, SEQ ID NO 55, SEQ ID NO 106, SEQ ID NO 107, SEQ ID NO 108 e SEQ ID NO 109; em que uma letra minúscula identifica a base nitrogenosa de uma unidade de DNA e uma letra maiúscula identifica a base nitrogenosa de uma unidade de LNA; e em

que as citosinas de LNA são opcionalmente metiladas ou um conjugado dos mesmos.

A invenção ainda proporciona um oligonucleotídeo compreendendo uma seqüência de nucleobase selecionada do grupo consistindo em
5 SEQ ID NO 65, SEQ ID NO 66, SEQ ID NO 67, SEQ ID NO 68, e SEQ ID NO 69, SEQ ID NO 38, SEQ ID NO 39, SEQ ID NO 40, SEQ ID NO 41, SEQ ID NO 42, SEQ ID NO 43, SEQ ID NO 44, SEQ ID NO 45, e SEQ ID NO 46; em que uma letra minúscula identifica a base nitrogenosa de uma unidade de DNA e uma letra maiúscula identifica a base nitrogenosa de uma unidade
10 de LNA; e em que as citosinas de LNA são opcionalmente metiladas ou um conjugado dos mesmos.

Em uma modalidade, o oligonucleotídeo pode ter uma seqüência de nucleobase de entre 1-17 nucleobases, tal como 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 ou 17 nucleobases e, como tal, a oligonucleobase em tal modalidade
15 pode ser uma sub-seqüência contínua dentro dos oligonucleotídeos divulgados aqui.

Os inventores da presente invenção descobriram, surpreendentemente, que oligonucleotídeos anti-sentido de um determinado comprimento compreendendo uma seqüência de DNA central em particular e ácidos
20 nucléicos bloqueados (LNAs) na referida seqüência central exibem propriedades superiores de inibição de micro-RNA.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Fig. 1. O efeito de tratamento com diferentes oligonucleotídeos anti-miR de LNA sobre a expressão de ácido nucléico alvo na linhagem de
25 célula expressando miR-122a Huh-7. São mostradas as quantidades de miR-122a (unidades arbitrárias) derivado de uma qRT-PCR miR-122a-específica quando comparado com células não tratadas (placebo). Os oligonucleotídeos anti-miR de LNA foram usados em duas concentrações, 1 e 100 nM, respectivamente. Também está incluído um controle de combinação errônea (SPC3350) ao SPC3349 (também referido aqui como SPC3549).
30

Fig. 2a. Avaliação de dose-resposta de *knock-down* de anti-miR-122a de LNA para SPC3548 e SPC3549 em comparação com SPC3372 *in*

vivo em fígados de camundongo usando RT-PCR em tempo real de miR-122a.

Fig. 2b. Níveis de miR-122 no fígado de camundongo após tratamento com diferentes LNA-antimiRs. As moléculas de LNA-antimiR SPC3372 e SPC3649 foram administradas a camundongos normais através de três injeções i.p. dia sim, dia não durante um período de seis dias nas doses indicadas e os mesmos foram sacrificados 48 horas após a última dose. RNA total foi extraído dos fígados dos camundongos e miR-122 foi medido através de qPCR miR-122-específica.

Fig. 3. Avaliação dos níveis de colesterol no plasma em camundongos tratados com LNA-antimiR-122a comparado com os camundongos de controle que receberam solução salina.

Fig. 4a. Avaliação os níveis relativos de mRNA de Bckdk em camundongos tratados com LNA antimiR-122a em comparação com camundongos de controle com solução salina usando RT-PCR quantitativa em tempo real.

Fig. 4b. Avaliação os níveis relativos de mRNA de aldolase A em camundongos tratados com LNA antimiR-122a em comparação com camundongos de controle com solução salina usando RT-PCR quantitativa em tempo real.

Fig 4c. Avaliação os níveis de mRNA de GAPDH em camundongos tratados com LNA antimiR-122a (animais 4-30) em comparação com camundongos de controle com solução salina (animais 1-3) usando RT-PCR quantitativa em tempo real.

Fig. 5. Avaliação da dose-resposta de *knock-down* de LNA-antimiR[®] -122a *in vivo* em fígados de camundongo usando RT-PCR em tempo real de miR-122a. Seis grupos de animais (5 camundongos por grupo) foram tratados da seguinte maneira. Os animais do Grupo 1 foram injetados com 0,2 ml de solução salina através de i.v. em 3 dias sucessivos, o Grupo 2 recebeu 2,5 mg/kg de SPC3372, o Grupo 3 recebeu 6,25 mg/kg, o Grupo 4 recebeu 12,5 mg/kg e o Grupo 5 recebeu 25 mg/kg, enquanto que o Grupo 6 recebeu 25 mg/kg de SPC 3373 (oligonucleotídeo LNA-antimiR[®]

erroneamente combinado), todos da mesma maneira. O experimento foi repetido (portanto, n = 10) e os resultados combinados são mostrados.

Fig. 6. Northern blot comparando SPC3649 com SPC3372. RNA total de um camundongo em cada grupo foi submetido à Northern blot miR-122-específico. miR-122 maduro e a dupla (micro-RNA bloqueado) formada entre o LNA-antimiR e miR-122 são indicados.

Fig. 7. Os camundongos foram tratados com 25 mg/kg/dia de LNA-antimiR ou solução salina durante três dias consecutivos e sacrificados 1, 2 ou 3 semanas após a última dose. Também são incluídos os valores dos animais sacrificados 24 horas após a última dose (exemplo 11 "design antigo"). Os níveis de miR-122 foram avaliados através de qPCR e normalizados para a média do grupo com solução salina em cada ponto de tempo individual. São também incluídos os valores dos animais sacrificados 24 horas após a última dose (mostrada a média e SD, n = 7, 24h n = 10). Dia 9, 16 ou 23 de sacrifício corresponde a sacrifício 1, 2 ou 3 semanas após a última dose).

Fig. 8. Os camundongos foram tratados com 25 mg/kg/dia de LNA-antimiR ou solução salina durante três dias consecutivos e sacrificados 1, 2 ou 3 semanas após a última dose. Também são incluídos os valores dos animais sacrificados 24 horas após a última dose (exemplo 11 "design antigo"). O colesterol no plasma foi medido e normalizado para o grupo com solução salina em cada ponto de tempo (mostrada a média e SD, n = 7, 24h n = 10).

Fig. 9. Indução dose-dependente de miR-122a alvo através de inibição com SPC3372 de miR-122a. Os camundongos foram tratados com diferentes doses de SPC3372 durante três dias consecutivos, conforme descrito acima, e sacrificados 24 horas depois da última dose. O RNA total extraído do fígado foi submetido à qPCR. Genes com um sítio previsto de miR-122 alvo e observados como estando super-regulados através de análise de microarranjo foram investigados com relação à indução dose-dependente através de aumento das doses de SPC3372 usando qPCR. RNA total de fígado de 2 a 3 camundongos por grupo sacrificados 24 horas após a última

dose foi submetido à qPCR para os genes indicados. São mostrados na figura 9 os níveis de mRNA com relação ao grupo com solução salina, n = 2-3 (2,5 – 12,5 mg/kg/dia: n = 2, sem SD). Também é mostrado o controle de combinação errônea (mm, SPC3373)

5 Fig. 10. Indução transitória de mRNAs de miR-122a alvo após tratamento com SPC3372. Camundongos NMRI fêmeas foram tratados com 25 mg/kg/dia de SPC3372 junto com um controle de solução salina durante três dias consecutivos e sacrificados 1, 2 ou 3 semanas após a última dose. RNA foi extraído dos fígados e os níveis de mRNA de mRNAs previstos de
10 miR-122a alvo, selecionados através de dados de microarranjo, foram investigados através de qPCR. Três animais de cada grupo foram analisados.

Fig. 11. Indução de Vldlr em fígado através de tratamento com SPC3372. As mesmas amostras de RNA de fígado conforme no exemplo anterior (figura 10) foram investigadas com relação à indução de Vldlr.

15 Fig. 12. Estabilidade da dupla miR-122a/ SPC3372 no plasma de camundongo. A estabilidade do SPC3372 e da dupla SPC3372/miR-122a foi testada no plasma de camundongo a 37°C durante 96 horas. É mostrado na figura 12 um PAGE corado com SYBR-Gold.

20 Fig. 13. Captura de miR-122a maduro por SPC3372 leva à formação de dupla. É mostrada na figura 13 uma membrana hibridizada com uma sonda miR-122a-específica (painel superior) e re-hibridizada com uma sonda Let-7-específica (painel inferior). Com a sonda miR-122, duas bandas puderam ser detectadas, uma correspondendo ao miR-122 maduro e uma correspondendo a uma dupla entre SPC3372 e miR-122.

25 Fig. 14. Captura de miR-122a por SPC3372 junto com a distribuição de SPC3372 avaliada através de hibridização *in situ* de seções de fígado. Criosseções de fígado de animais tratados foram.

30 Fig. 15. Expressão de gene no fígado em camundongos tratados com LNA-antimiR miR-122. Camundongos tratados com solução salina e LNA-antimiR foram comparados através de caracterização de perfil por expressão ampla em genoma usando arranjos Affymetrix Mouse Genome 430 2.0. (a,1) Mostrado o número de sondas que mostraram expressão diferen-

cial, em amostras de fígado, de camundongos tratados com LNA-antimiR-122 e solução salina 24 horas após tratamento. (b,2) A ocorrência de seqüência de cultura de miR-122 em genes diferencialmente expressos. A plotagem mostra o percentual de transcritos com pelo menos uma seqüência de reconhecimento de cultura de miR-122 em sua 3' UTR. Aleatório: seqüências aleatórias foram geradas e pesquisadas com relação a seqüências de reconhecimento de cultura de miR-122. Perfis de expressão de gene no fígado temporais em camundongos tratados com LNA-antimiR. Os camundongos foram tratados com 25 mg/kg/dia de LNA-antimiR ou solução salina durante três dias consecutivos e sacrificados 1, 2 ou 3 semanas depois da última dose. Incluídos também são os valores dos animais sacrificados 24 horas após a última dose. (c,3) Amostras de RNA de diferentes pontos de tempo também foram submetidas à caracterização de perfil de expressão. Análise de agrupamento hierárquico dos perfis de expressão de genes identificados como diferencialmente expressos entre camundongos tratados com LNA-antimiR e solução salina 24 horas, uma semana ou três semanas pós-tratamento. (d,4) Perfis de expressão de genes identificados como diferencialmente expressos entre camundongos tratados com LNA-antimiR e solução salina 24 horas pós-tratamento foram acompanhados com o tempo. As proporções de expressão e genes super- e sub-regulados em camundongos tratados com LNA-antimiR se aproxima de 1 na maioria do curso de tempo, indicando um efeito reversível do tratamento com LNA-antimiR.

Fig. 16. O efeito de tratamento com SPC3372 e 3595 sobre os níveis de miR-122 em fígados de camundongo.

Fig. 17. O efeito de tratamento com SPC3372 e 3595 sobre os níveis de Aldolase A em fígados de camundongo.

Fig. 18. O efeito de tratamento com SPC3372 e 3595 sobre os níveis de Bckdk em fígados de camundongo.

Fig. 19. O efeito de tratamento com SPC3372 e 3595 sobre os níveis de CD320 em fígados de camundongo.

Fig. 20. O efeito de tratamento com SPC3372 e 3595 sobre os níveis de Ndr3 em fígados de camundongo.

Fig.21. O efeito de tratamento a longo prazo com SPC3649 sobre o colesterol total no plasma em camundongos hipercolesterolêmicos e normais. Amostras semanais de plasma sanguíneo foram obtidas dos camundongos de controle tratados com solução salina e tratados com SPC3649 uma vez por semana, seguido por avaliação do colesterol total no plasma. Os camundongos foram tratados com 5 mg/kg de SPC3649, SPC3744 ou solução salina duas vezes por semana. Camundongos normais foram tratados em paralelo.

Fig.22. O efeito de tratamento a longo prazo com SPC3649 sobre os níveis de miR-122 em camundongos hipercolesterolêmicos e normais.

Fig. 23. O efeito de tratamento a longo prazo com SPC3649 sobre os níveis de Aldolase A em camundongos hipercolesterolêmicos e normais.

Fig. 24. O efeito de tratamento a longo prazo com SPC3649 sobre os níveis de Bckdk em camundongos hipercolesterolêmicos e normais.

Fig. 25. O efeito de tratamento a longo prazo com SPC3649 sobre os níveis de AST em camundongos hipercolesterolêmicos e normais.

Fig. 26. O efeito de tratamento a longo prazo com SPC3649 sobre os níveis de ALT em camundongos hipercolesterolêmicos e normais.

Fig. 27. Modulação de replicação de HCV por SPC3649 em um modelo com células Huh-7. Análise de Northern blot do RNA de HCV em células Huh-7 após transfecção com diferentes moléculas de LNA-antimiR (SPC3648, SPC3649 e SPC3550) e 2' OMe antago-mir-122 (painel superior). As intensidades de sinal de hibridização foram quantificadas e normalizadas para os sinais de mRNA de espectrina em cada fileira (painel inferior).

Fig. 28. Reversão de repressão funcional de luciferase Renilla com miR-19b alvo através de oligonucleotídeos de bloqueio de miR-19b em uma linhagem de célula expressando miR-19b endogenamente, HeLa. "miR-19b alvo" é o plasmídeo com miR-19b alvo, mas não co-transfectado com oligo de bloqueio miR-19b e, conseqüentemente, representa expressão de luciferase Renilla totalmente reprimida por miR-19b.

Fig. 29. Reversão de repressão funcional de luciferase Renilla

com o miR-122 alvo através de oligonucleotídeos de bloqueio de miR-122 em uma linhagem de célula expressando miR-122 endogenamente, Huh-7. "miR-122 alvo" é o plasmídeo correspondente com miR-122 alvo, mas não co-transfectado com o oligo de bloqueio miR-122 e, conseqüentemente, re-
5 apresenta expressão de luciferase Renilla totalmente reprimida por miR-122.

Fig. 30. Diagrama ilustrando o alinhamento de um oligonucleotídeo de acordo com a invenção e um micro-RNA alvo.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

O oligonucleotídeo da invenção é, tipicamente, fita única. Por-
10 tanto, deve ser compreendido que, dentro do contexto da invenção, o termo oligonucleotídeo pode ser usado permutavelmente com o termo oligonucleotídeo de fita única.

Em uma modalidade, a invenção proporciona composições farmacêuticas compreendendo oligonucleotídeos curtos (fita única), com um
15 comprimento de entre 8 e 17 nucleobases de comprimento, tal como entre 10 e 17 nucleobases de comprimento, os quais são complementares a micro-RNAs humanos. Os oligonucleotídeos curtos são particularmente eficazes para aliviar repressão de miRNA *in vivo*. Descobriu-se que a incorporação de análogos de nucleotídeo de alta afinidade nos oligonucleotídeos re-
20 sulta em moléculas anti-micro-RNA altamente eficazes as quais parecem funcionar via a formação de duplas quase irreversíveis com o miRNA alvo, ao invés de mecanismos baseados em clivagem de RNA, tais como mecanismo associados à RNaseH ou RISC.

É altamente preferível que o oligonucleotídeo de fita única de
25 acordo com a invenção compreenda uma região de seqüência de nucleobase contínua a qual é 100% complementar à região de cultura de micro-RNA humana.

É preferível que o oligonucleotídeo de fita única de acordo com a invenção seja complementar à seqüência de micro-RNA humano maduro.

30 Oligonucleotídeos preferidos de acordo com a invenção são complementares a uma seqüência de micro-RNA selecionada do grupo consistindo em has-miR19b, hsa-miR21, hsa-miR 122, hsa-miR 142 a7b, hsa-

miR 155, hsa-miR 375.

Em uma modalidade, o oligonucleotídeo de acordo com a invenção não compreende uma nucleobase na extremidade 3' que corresponde ao primeiro nucleotídeo na extremidade 5' do micro-RNA alvo.

5 Em uma modalidade, a primeira nucleobase do oligonucleotídeo de fita única de acordo com a invenção, contando a partir da extremidade 3', é um análogo de nucleotídeo, tal como uma unidade de LNA.

Em uma modalidade, a segunda nucleobase do oligonucleotídeo de fita única de acordo com a invenção, contando a partir da extremidade 3',
10 é um análogo de nucleotídeo, tal como uma unidade de LNA.

Em uma modalidade, os nono e/ou décimo nucleotídeos do oligonucleotídeo de fita única de acordo com a invenção, contando a partir da extremidade 3' é, um análogo de nucleotídeo, tal como uma unidade de LNA.

15 Em uma modalidade, a nona nucleobase do oligonucleotídeo de fita única de acordo com a invenção, contando a partir da extremidade 3' é, um análogo de nucleotídeo, tal como uma unidade de LNA.

Em uma modalidade, a décima nucleobase do oligonucleotídeo de fita única de acordo com a invenção, contando a partir da extremidade 3'
20 é, um análogo de nucleotídeo, tal como uma unidade de LNA.

Em uma modalidade, as nona e décima nucleobases do oligonucleotídeo de fita única de acordo com a invenção, calculado a partir da extremidade 3' é, um análogo de nucleotídeo, tal como uma unidade de LNA.

25 Em uma modalidade, o oligonucleotídeo de fita única de acordo com a invenção não compreende uma região de mais de 5 unidades de nucleotídeo de DNA consecutivas. Em uma modalidade, o oligonucleotídeo de fita única de acordo com a invenção não compreende uma região de mais de 6 unidades de nucleotídeo de DNA consecutivas. Em uma modalidade, o
30 oligonucleotídeo de fita única de acordo com a invenção não compreende uma região de mais de 7 unidades de nucleotídeo de DNA consecutivas. Em uma modalidade, o oligonucleotídeo de fita única de acordo com a invenção

não compreende uma região de mais de 8 unidades de nucleotídeo de DNA consecutivas. Em uma modalidade, o oligonucleotídeo de fita única de acordo com a invenção não compreende uma região de mais de 3 unidades de nucleotídeo de DNA consecutivas. Em uma modalidade, o oligonucleotídeo de fita única de acordo com a invenção não compreende uma região de mais de 2 unidades de nucleotídeo de DNA consecutivas.

5 Em uma modalidade, o oligonucleotídeo de fita única compreende pelo menos uma região consistindo em pelo menos duas unidades de análogo de nucleotídeo consecutivas, tal como pelo menos duas unidades consecutivas de LNA.

10 Em uma modalidade, o oligonucleotídeo de fita única compreende pelo menos uma região consistindo em pelo menos três unidades de análogo de nucleotídeo consecutivas, tal como pelo menos três unidades consecutivas de LNA.

15 Em uma modalidade, o oligonucleotídeo de fita única da invenção não compreende uma região de mais de 7 unidades de análogo de nucleotídeo consecutivas, tal como unidades consecutivas de LNA. Em uma modalidade, o oligonucleotídeo de fita única da invenção não compreende uma região de mais de 6 unidades de análogo de nucleotídeo consecutivas, tal como unidades consecutivas de LNA. Em uma modalidade, o oligonucleotídeo de fita única da invenção não compreende uma região de mais de 5 unidades de análogo de nucleotídeo consecutivas, tal como unidades consecutivas de LNA. Em uma modalidade, o oligonucleotídeo de fita única da invenção não compreende uma região de mais de 4 unidades de análogo de nucleotídeo consecutivas, tal como unidades consecutivas de LNA. Em uma modalidade, o oligonucleotídeo de fita única da invenção não compreende uma região de mais de 3 unidades de análogo de nucleotídeo consecutivas, tal como unidades consecutivas de LNA. Em uma modalidade, o oligonucleotídeo de fita única da invenção não compreende uma região de mais de 2 unidades de análogo de nucleotídeo consecutivas, tal como unidades consecutivas de LNA.

20
25
30 Em uma modalidade, a primeira ou segunda 3' nucleobase do

oligonucleotídeo de fita única corresponde ao segundo 5' nucleotídeo da seqüência do micro-RNA.

5 Em uma modalidade, as unidades de nucleobase 1 a 7 (incluindo) do oligonucleotídeo de fita única, conforme medido a partir da extremidade 3' da região do oligonucleotídeo de fita única são complementares à seqüência de região de cultura de micro-RNA.

10 Em uma modalidade, as unidades de nucleobase 2 a 7 (incluindo) do oligonucleotídeo de fita única, conforme medido a partir da extremidade 3' da região do oligonucleotídeo de fita única são complementares à seqüência de região de cultura de micro-RNA.

15 Em uma modalidade, o oligonucleotídeo de fita única compreende pelo menos uma unidade de análogo de nucleotídeo, tal como pelo menos uma unidade de LNA, em uma posição a qual está dentro da região complementar à região de cultura de miRNA. O oligonucleotídeo de fita única pode, em uma modalidade, compreender entre 1 e 6 ou entre 1 e 7 unidades de análogo de nucleotídeo, tal como entre 1 e 6 e 1 e 7 unidades de LNA, em uma posição a qual está dentro da região complementar à região de cultura de miRNA.

20 Em uma modalidade, a seqüência de nucleobase do oligonucleotídeo de fita única a qual é complementar à seqüência da região de cultura de micro-RNA é selecionada do grupo consistindo em (X)Xxxxxx, (X)xXxxxx, (X)xxXxxx, (X)xxxXxx, (X)xxxxXx e (X)xxxxxX, conforme lido em uma direção 3' - 5', em que "X" denota um análogo de nucleotídeo, (X) denota um análogo de nucleotídeo opcional, tal como uma unidade de LNA, e "x" denota uma unidade de nucleotídeo de DNA ou RNA.

25 Em uma modalidade, o oligonucleotídeo de fita única compreende pelo menos duas unidades de análogo de nucleotídeo, tal como pelo menos duas unidades de LNA, em posições as quais são complementares à região de cultura de miRNA.

30 Em uma modalidade, a seqüência de nucleobase do oligonucleotídeo de fita única a qual é complementar à seqüência da região de cultura de micro-RNA, é selecionado do grupo consistindo em (X)XXxxxx,

(X)XxXxxx, (X)XxxXxx, (X)XxxxXx, (X)XxxxxX, (X)xXXxxx, (X)xXxXxx,
 (X)xXxxXx, (X)xXxxxX, (X)xxXXxx, (X)xxXxXx, (X)xxXxxX, (X)xxxXXx,
 (X)xxxXxX e (X)xxxxXX, em que "X" denota um análogo de nucleotídeo, tal
 como uma unidade de LNA, (X) denota um análogo de nucleotídeo opcional,
 5 tal como uma unidade de LNA, e "x" denota uma unidade de nucleotídeo de
 DNA ou RNA.

Em uma modalidade, o oligonucleotídeo de fita única compreende pelo menos três unidades de análogo de nucleotídeo, tal como pelo menos três unidades de LNA, em posições as quais são complementares à região de cultura de miRNA.
 10

Em uma modalidade, a seqüência de nucleobase do oligonucleotídeo de fita única a qual é complementar à seqüência da região de cultura de micro-RNA, é selecionado do grupo consistindo em (X)XXXxxx,
 (X)xXXXxx, (X)xxXXXx, (X)xxxXXX, (X)XXxXxx, (X)XXxxXx, (X)XXxxxX,
 15 (X)xXXxXx, (X)xXXxxX, (X)xxXXxX, (X)XxXXxx, (X)XxxXXx, (X)XxxxXX,
 (X)xXxXXx, (X)xXxxXX, (X)xxXxXX, (X)xXxXxX e (X)XxXxXx, em que "X"
 denota um análogo de nucleotídeo, tal como uma unidade de LNA, (X) denota um análogo de nucleotídeo opcional, tal como uma unidade de LNA, e "x"
 denota uma unidade de nucleotídeo de DNA ou RNA.

Em uma modalidade, o oligonucleotídeo de fita única compreende pelo menos quatro unidades de análogo de nucleotídeo, tal como pelo menos quatro unidades de LNA, em posições as quais são complementares à região de cultura de miRNA.
 20

Em uma modalidade a seqüência de nucleobase do oligonucleotídeo de fita única a qual é complementar à seqüência da região de cultura de micro-RNA, é selecionado do grupo consistindo em (X)xxXXX,
 (X)xXxXXX, (X)xXXxXX, (X)xXXXxX, (X)xXXXXx, (X)XxxXXXX, (X)XxXxXX,
 (X)XxXXxX, (X)XxXXx, (X)XXxxXX, (X)XXxXxX, (X)XXxXXx, (X)XXXxxX,
 (X)XXXxXx, e (X)XXXXxx, em que "X" denota um análogo de nucleotídeo, tal
 como uma unidade de LNA, (X) denota um análogo de nucleotídeo opcional,
 25 tal como uma unidade de LNA, e "x" denota uma unidade de nucleotídeo de
 DNA ou RNA.
 30

Em uma modalidade, o oligonucleotídeo de fita única compreende pelo menos cinco unidades de análogo de nucleotídeo, tal como pelo menos cinco unidades de LNA, em posições as quais são complementares à região de cultura de miRNA.

5 Em uma modalidade, a seqüência de nucleobase do oligonucleotídeo de fita única a qual é complementar à seqüência da região de cultura de micro-RNA, é selecionado do grupo consistindo em (X)xXXXXX, (X)XxXXXX, (X)XXxXXX, (X)XXXxXX, (X)XXXXxX e (X)XXXXXx, em que "X" denota um análogo de nucleotídeo, tal como uma unidade de LNA, (X) denota um análogo de nucleotídeo opcional, tal como uma unidade de LNA, e "x" denota uma unidade de nucleotídeo de DNA ou RNA.

10 Em uma modalidade, o oligonucleotídeo de fita única compreende pelo menos seis unidades de análogo de nucleotídeo, tal como pelo menos seis unidades de LNA, em posições as quais são complementares à região de cultura de miRNA.

15 Em uma modalidade, a seqüência de nucleobase do oligonucleotídeo de fita única a qual é complementar à seqüência da região de cultura de micro-RNA, é selecionado do grupo consistindo em XXXXXX, XxXXXXX, XXxXXXX, XXXxXXX, XXXXxXX, XXXXXxX e XXXXXXx, em que "X" denota um análogo de nucleotídeo, tal como uma unidade de LNA, tal como uma unidade de LNA, e "x" denota uma unidade de nucleotídeo de DNA ou RNA.

20 Em uma modalidade, os dois motivos de nucleobase nas posições 7 a 8, contando a partir da extremidade 3' do oligonucleotídeo de fita única é selecionado do grupo consistindo em xx, XX, xX e Xx, em que "X" denota um análogo de nucleotídeo, tal como uma unidade de LNA, tal como uma unidade de LNA, e "x" denota uma unidade de nucleotídeo de DNA ou RNA.

25 Em uma modalidade, os dois motivos de nucleobase nas posições 7 a 8, contando a partir da extremidade 3' do oligonucleotídeo de fita única é selecionado do grupo consistindo em XX, xX e Xx, em que "X" denota um análogo de nucleotídeo, tal como uma unidade de LNA, tal como uma unidade de LNA, e "x" denota uma unidade de nucleotídeo de DNA ou RNA.

30 Em uma modalidade, os dois motivos de nucleobase nas posições 7 a 8, contando a partir da extremidade 3' do oligonucleotídeo de fita única é selecionado do grupo consistindo em XX, xX e Xx, em que "X" denota um análogo de nucleotídeo, tal como uma unidade de LNA, tal como uma unidade de LNA, e "x" denota uma unidade de nucleotídeo de DNA ou RNA.

m uma modalidade, o oligonucleotídeo de fita única compreende pelo menos 12 nucleobases e em que os dois motivos de nucleobase nas posições 11 a 12, contando a partir da extremidade 3' do oligonucleotídeo de fita única é selecionado do grupo consistindo em xx, XX, xX e Xx, em que
 5 "X" denota um análogo de nucleotídeo, tal como uma unidade de LNA, tal como uma unidade de LNA, e "x" denota uma unidade de nucleotídeo de DNA ou RNA.

Em uma modalidade, o oligonucleotídeo de fita única compreende pelo menos 12 nucleobases e em que os dois motivos de nucleobase nas
 10 posições 11 a 12, contando a partir da extremidade 3' do oligonucleotídeo de fita única é selecionado do grupo consistindo em XX, xX e Xx, em que "X" denota um análogo de nucleotídeo, tal como uma unidade de LNA, tal como uma unidade de LNA, e "x" denota uma unidade de nucleotídeo de DNA ou RNA.

15 Em uma modalidade, o oligonucleotídeo de fita única compreende pelo menos 13 nucleobases e em que os três motivos de nucleobase nas posições 11 to 13, contando a partir da extremidade 3', é selecionado do grupo consistindo em xxx, Xxx, xXx, xxX, XXx, XxX, xXX e XXX, em que "X" denota um análogo de nucleotídeo, tal como uma unidade de LNA, tal como
 20 uma unidade de LNA, e "x" denota uma unidade de nucleotídeo de DNA ou RNA.

Em uma modalidade, os três motivos de nucleobase nas posições 11 a 13, contando a partir da extremidade 3' do oligonucleotídeo de fita única, é selecionado do grupo consistindo em Xxx, xXx, xxX, XXx, XxX, xXX
 25 e XXX, em que "X" denota um análogo de nucleotídeo, tal como uma unidade de LNA, tal como uma unidade de LNA, e "x" denota uma unidade de nucleotídeo de DNA ou RNA.

Em uma modalidade, o oligonucleotídeo de fita única compreende pelo menos 14 nucleobases e em que os quatro motivos de nucleobase
 30 nas posições 11 a 14, contando a partir da extremidade 3', é selecionado do grupo consistindo em xxxx, XXxX e XXXX em que "X" denota

um análogo de nucleotídeo, tal como uma unidade de LNA, tal como uma unidade de LNA, e "x" denota uma unidade de nucleotídeo de DNA ou RNA.

Em uma modalidade, os quatro motivos de nucleobase nas posições 11 a 14 do oligonucleotídeo de fita única, contando a partir da extremidade 3', é selecionado do grupo consistindo em Xxxx, xXxx, xxXx, xxxX, 5 XXxx, XxXx, XxxX, xXXx, xXxX, xxXX, XXXx, XxXX, xXXX, XXxX e XXXX, em que "X" denota um análogo de nucleotídeo, tal como uma unidade de LNA, e "x" denota uma unidade de nucleotídeo de DNA ou RNA.

Em uma modalidade, o oligonucleotídeo de fita única compreende 15 nucleobases e os cinco motivos de nucleobase nas posições 11 a 15, contando a partir da extremidade 3', é selecionado do grupo consistindo em Xxxxx, 10 xXxXx, XxXXXX, xXXXX, e 15 XXXXX em que "X" denota um análogo de nucleotídeo, tal como uma unidade de LNA, tal como uma unidade de LNA, e "x" denota uma unidade de nucleotídeo de DNA ou RNA.

Em uma modalidade, o oligonucleotídeo de fita única compreende 16 nucleobases e os seis motivos de nucleobase nas posições 11 a 16, contando a partir da extremidade 3', é selecionado do grupo consistindo em Xxxxxx, xXxxxx, xxXxxx, xxxXxx, xxxxXx, xxxxxX, XXxxxx, XxXxxx, XxxXxx, 20 XxxxXx, xxxXX, XXXxxx, 25 xXXxxX, e XXXXXX em que "X" denota um análogo de nucleotídeo, tal como uma unidade de LNA, tal como 30 uma unidade de LNA, e "x" denota uma unidade de nucleotídeo de DNA ou RNA.

Em uma modalidade, os seis motivos de nucleobase nas posi-

ções 11 a 16 do oligonucleotídeo de fita única, contando a partir da extremidade 3', is xxXxxX, em que "X" denota um análogo de nucleotídeo, tal como uma unidade de LNA, tal como uma unidade de LNA, e "x" denota uma unidade de nucleotídeo de DNA ou RNA.

5 Em uma modalidade, as três nucleobases mais 5' são selecionadas do grupo consistindo em Xxx, xXx, xxX, XXx, XxX, xXX e XXX, em que "X" denota um análogo de nucleotídeo, tal como uma unidade de LNA, tal como uma unidade de LNA, e "x" denota uma unidade de nucleotídeo de DNA ou RNA.

10 Em uma modalidade, x" denota uma unidade de DNA.

Em uma modalidade, o oligonucleotídeo de fita única compreende uma unidade de análogo de nucleotídeo, tal como uma unidade de LNA, na extremidade 5'.

15 Em uma modalidade, as unidades de análogo de nucleotídeo, tal como X, são independentemente selecionadas do grupo consistindo em: unidade de 2'-O-alkil-RNA, unidade de 2'-OMe-RNA, unidade de 2'-amino-DNA, unidade de 2'-fluoro-DNA, unidade de LNA, unidade de PNA, unidade de HNA, unidade de INA.

20 Em uma modalidade, todas as nucleobases do oligonucleotídeo de fita única da invenção são unidades de análogo de nucleotídeo.

Em uma modalidade, as unidades de análogo de nucleotídeo, tal como X, são independentemente selecionadas do grupo consistindo em: unidade de 2'-OMe-RNAs, unidade de 2'-fluoro-DNAs, e unidades de LNA,

25 Em uma modalidade, o oligonucleotídeo de fita única compreende a referida pelo menos uma unidade de análogo de LNA e pelo menos uma outra unidade de análogo de nucleotídeo que não LNA.

Em uma modalidade, a unidade de análogo de nucleotídeo de não-LNA é independentemente selecionada de unidades de 2'-OMe RNA e unidades de 2'-fluoro DNA.

30 Em uma modalidade, o oligonucleotídeo de fita única consiste de pelo menos uma seqüência XYX ou YXY, em que X é LNA e Y é uma unidade de 2'-OMe RNA e uma unidade de 2'-fluoro DNA.

Em uma modalidade, a seqüência de nucleobases do oligonucleotídeo de fita única consiste de unidades X e Y alternadas.

Em uma modalidade, o oligonucleotídeo de fita única compreende unidades de LNA e DNA alternadas (Xx) ou (xX).

5 Em uma modalidade, o oligonucleotídeo de fita única compreende um motivo de LNA alternado, seguido por 2 unidades de DNA (Xxx), xXx ou xxX.

10 Em uma modalidade, pelo menos uma unidade de análogo de nucleotídeo de DNA ou não-LNA são substituídas por uma nucleobase de LNA em uma posição selecionada das posições identificadas como unidades de nucleobase de LNA em qualquer uma das modalidades mencionadas acima.

Em uma modalidade, "X" denota uma unidade de LNA.

15 Em uma modalidade, o oligonucleotídeo de fita única compreende pelo menos 2 unidades de análogo de nucleotídeo, tal como pelo menos 3 unidades de análogo de nucleotídeo, tal como pelo menos 4 unidades de análogo de nucleotídeo, tal como pelo menos 5 unidades de análogo de nucleotídeo, tal como pelo menos 6 unidades de análogo de nucleotídeo, tal como pelo menos 7 unidades de análogo de nucleotídeo, tal como pelo me-
20 nos 8 unidades de análogo de nucleotídeo, tal como pelo menos 9 unidades de análogo de nucleotídeo, tal como pelo menos 10 unidades de análogo de nucleotídeo.

25 Em uma modalidade, o oligonucleotídeo de fita única compreende pelo menos 2 unidades de LNA, tal como pelo menos 3 unidades de LNA, tal como pelo menos 4 unidades de LNA, tal como pelo menos 5 unidades de LNA, tal como pelo menos 6 unidades de LNA, tal como pelo menos 7 unidades de LNA, tal como pelo menos 8 unidades de LNA, tal como pelo menos 9 unidades de LNA, tal como pelo menos 10 unidades de LNA.

30 Em uma modalidade em que pelo menos um dos análogos de nucleotídeo, tal como unidades de LNA, é citosina ou guanina, tal como entre 1 – 10 dos análogos de nucleotídeo, tal como unidades de LNA, é citosina ou guanina, tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, ou 9 dos análogos de nucleotídeo,

tal como unidades de LNA, é citosina ou guanina.

Em uma modalidade pelo menos dois dos análogos de nucleotídeo tal como unidades de LNA é citosina ou guanina. Em uma modalidade pelo menos três dos análogos de nucleotídeo tal como unidades de LNA é citosina ou guanina. Em uma modalidade pelo menos quatro dos análogos de nucleotídeo tal como unidades de LNA é citosina ou guanina. Em uma modalidade pelo menos cinco dos análogos de nucleotídeo tal como unidades de LNA é citosina ou guanina. Em uma modalidade pelo menos seis dos análogos de nucleotídeo tal como unidades de LNA é citosina ou guanina. Em uma modalidade pelo menos sete dos análogos de nucleotídeo tal como unidades de LNA é citosina ou guanina. Em uma modalidade pelo menos oito dos análogos de nucleotídeo tal como unidades de LNA é citosina ou guanina.

Em uma modalidade preferida, os análogos de nucleotídeo têm uma elevada estabilidade térmica da dupla a um RNA complementar do que a afinidade de ligação de um nucleotídeo de DNA equivalente ao referido nucleotídeo de RNA complementar.

Em uma modalidade, os análogos de nucleotídeo conferem estabilidade intensificada no soro ao oligonucleotídeo de fita única.

Em uma modalidade, o oligonucleotídeo de fita única forma uma conformação de A – hélice com uma molécula de RNA fita única complementar.

Uma dupla entre duas moléculas de RNA existe, tipicamente, em uma conformação de A- forma, onde uma dupla entre duas moléculas de DNA existe, tipicamente, em uma conformação de B- forma. Uma dupla entre uma molécula de DNA e RNA existe, tipicamente em uma conformação intermediária (forma A/B). O uso de análogos de nucleotídeo, tal como beta-D-óxi LNA pode ser usado para promover uma conformação semelhante à forma A. Dicromismos circulares (CD) padrões ou análise por NMR é usada para determinar a forma de duplas entre os oligonucleotídeos da invenção e moléculas de RNA complementares.

Uma vez que se acredita que o recrutamento pelo complexo

RISC é dependente da conformação estrutural específica do miRNA/mRNA alvo, os oligonucleotídeos de acordo com a presente invenção podem, em uma modalidade formar uma dupla A/B- com uma molécula de RNA complementar.

5 Contudo, também determinou-se que o uso de análogos de nucleotídeo os quais promovem a estrutura de A – forma também podem ser eficazes, tal como o isômero alfa-L de LNA.

 Em uma modalidade, o oligonucleotídeo de fita única forma uma conformação de A/B-forma com uma molécula de RNA fita única comple-
10 mentar.

 Em uma modalidade, o oligonucleotídeo de fita única forma uma conformação de A - forma com uma molécula de RNA fita única complemen-
tar.

 Em uma modalidade, o oligonucleotídeo de fita única de acordo
15 com a invenção não media a clivagem baseada em RNaseH de uma molé-
cula de RNA fita única complementar. Tipicamente, um trecho de pelo me-
nos 5 (tipicamente não efetivo de recrutamento de RNaseH), mais preferi-
velmente pelo menos 6, mais preferivelmente pelo menos 7 ou 8 nucleoba-
ses de DNA consecutivas (ou nucleobases alternadas as quais podem recru-
20 tar RNaseH, tal como alfa L-amino LNA) são requeridas de forma que um
oligonucleotídeo seja eficaz no recrutamento de RNaseH.

 O EP 1 222 309 proporciona métodos *in vitro* para determinação
de atividade de RNaseH os quais podem ser usados para determinar a ca-
pacidade de recrutar RNaseH. Um composto é considerado capaz de re-
25 crutar RNaseH se, quando fornecido com o RNA alvo complementar, ele
tem uma taxa inicial, conforme medido pmol/l/min, de pelo menos 1 %, tal
como pelo menos 5%, tal como pelo menos 10% ou menos de 20% do DNA
equivalente do oligonucleotídeo, sem 2' substituições com grupos de ligação
de fosforotioato entre todos os nucleotídeos no oligonucleotídeo, usando a
30 metodologia fornecida pelo Exemplo 91 - 95 do EP 1 222 309.

 Um composto é considerado incapaz de recrutar RNaseH quan-
do fornecido com o RNA alvo complementar, ele tem uma taxa inicial, con-

forme medido pmol//min, de menos de 1%, tal como menos de 5%, tal como menos de 10% ou menos de 20% da taxa inicial determinada usando o oligonucleotídeo de DNA equivalente apenas, sem 2' substituições, com grupos de ligação de fosforotioato entre todos os nucleotídeos no oligonucleotídeo usando a metodologia fornecida pelo Exemplo 91 - 95 do EP 1 222 309.

Em uma modalidade altamente preferida o oligonucleotídeo de fita única da invenção é capaz de formar uma dupla com uma molécula de ácido nucléico de RNA fita única complementar (tipicamente de cerca do mesmo comprimento que o referido oligonucleotídeo de fita única) com ligações internucleosídeo de fosfodiéster, em que a dupla tem uma T_m de pelo menos cerca de 60 °C; na verdade, é preferido que o oligonucleotídeo de fita única seja capaz de formar uma dupla com uma molécula de ácido nucléico de RNA fita única complementar com ligações internucleosídeo de fosfodiéster, em que a dupla tem uma T_m de entre cerca de 70 °C a cerca de 95 °C, tal como uma T_m de entre cerca de 70 °C a cerca de 90 °C, tal como entre cerca de 70 °C e cerca de 85 °C.

Em uma modalidade, o oligonucleotídeo de fita única é capaz de formar uma dupla com uma molécula de ácido nucléico de DNA fita única complementar com ligações internucleosídeo de fosfodiéster, em que a dupla tem uma T_m de entre cerca de 50 °C a cerca de 95 °C, tal como entre cerca de 50 °C a cerca de 90 °C, tal como pelo menos cerca de 55 °C, tal como pelo menos cerca de 60 °C ou não mais de cerca de 95 °C.

O oligonucleotídeo de fita única pode, em uma modalidade, ter um comprimento de entre 14 -16 nucleobases, incluindo 15 nucleobases.

Em uma modalidade, a unidade ou unidades de LNA são independentemente selecionadas do grupo consistindo em óxi-LNA, tio-LNA, e amino-LNA, na configuração de D-β e L-α ou combinações das mesmas.

Em uma modalidade específica, as unidades de LNA podem ser uma nucleobase de ENA.

Em uma modalidade, as unidades de LNA são beta D óxi-LNA.

Em uma modalidade, as unidades de LNA são alfa-L amino LNA.

Em uma modalidade preferida, o oligonucleotídeo de fita única compreende entre 3 e 17 unidades de LNA.

Em uma modalidade, o oligonucleotídeo de fita única compreende pelo menos um grupo de ligação internucleosídeo o qual difere de fosfato.

5 Em uma modalidade, o oligonucleotídeo de fita única compreende pelo menos uma ligação internucleosídeo de fosforotioato.

Em uma modalidade, o oligonucleotídeo de fita única compreende ligações de fosfodiéster e fosforotioato.

10 Em uma modalidade, todas as ligações internucleosídeo são ligações de fosforotioato.

Em uma modalidade, o oligonucleotídeo de fita única compreende pelo menos uma ligação internucleosídeo de fosfodiéster.

Em uma modalidade, todas as ligações internucleosídeo do oligonucleotídeo de fita única da invenção são ligações de fosfodiéster.

15 Em uma modalidade, uma composição farmacêutica de acordo com a invenção compreende um veículo, tal como solução salina ou solução salina tamponada.

Em uma modalidade, o método para a síntese de oligonucleotídeo de fita única objetivado contra um micro-RNA humano é realizado na direção 3' a 5' a -f.

O método para a síntese do oligonucleotídeo de fita única de acordo com a invenção pode ser realizado usando síntese de oligonucleotídeo em fase sólida padrão.

25 Outras modalidades da invenção as quais podem ser combinadas com as modalidades acima são mostradas nas reivindicações e sob o título "Outras Modalidades".

Definições

O termo 'nucleobase' se refere a nucleotídeo, tal como DNA e RNA, e análogos de nucleotídeo.

30 O termo "oligonucleotídeo" (ou simplesmente "oligo") se refere, no contexto da presente invenção, a uma molécula formada através de ligação covalente de duas ou mais nucleobases quando usado no contexto do

oligonucleotídeo da invenção (também referido como oligonucleotídeo de fita única), o termo "oligonucleotídeo" pode ter, em uma modalidade, por exemplo, entre 8 -26 nucleobases, tal como entre 10 a 26 nucleobases, tal como entre 12 a 26 nucleobases. Em uma modalidade preferida, conforme detalhado aqui, o oligonucleotídeo da invenção tem um comprimento de entre 8 – 5 17 nucleobases, tal como entre 20 -27 nucleobases tal como entre 8 – 16 nucleobases, tal como entre 12 – 15 nucleobases.

Em tal modalidade, o oligonucleotídeo da invenção pode ter um comprimento de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 10 24, 25 ou 26 nucleobases.

Será reconhecido que, para oligonucleotídeos mais curtos, pode ser necessário aumentar a proporção de análogos de nucleotídeo (alta afinidade), tal como LNA. Portanto, em uma modalidade pelo menos cerca de 30% das nucleobases são análogos de nucleotídeo, tal como pelo menos 15 cerca de 33%, tal como pelo menos cerca de 40%, ou pelo menos cerca de 50% ou pelo menos cerca de 60%, tal como pelo menos cerca de 66%, tal como pelo menos cerca de 70%, tal como pelo menos cerca de 80%, ou pelo menos cerca de 90%. Será também evidente que o oligonucleotídeo pode compreender uma seqüência de nucleobase a qual consiste unicamente de 20 seqüências de análogo de nucleotídeo.

Aqui, o termo "base nitrogenosa" se destina a abranger purinas e pirimidinas, tal como as nucleobases de DNA A, C, T e G, as nucleobases de RNA A, C, U e G, bem como nucleobases de não-DNA/RNA, tais como 5-metilcitosina (^{Me}C), isocitosina, pseudoisocitosina, 5-bromouracila, 5- 25 propiniluracila, 5-propinil-6-fluoroluracila, 5-metiltiazoleuracila, 6-aminopurina, 2-aminopurina, inosina, 2,6-diaminopurina, 7-propino-7-deazaadenina, 7-propino-7-deazaguanina e 2-cloro-6-aminopurina, em particular ^{Me}C. Será compreendido que a seleção real da nucleobases de não-DNA/RNA dependerá do nucleotídeo correspondente (ou equivalente) pre- 30 sente na fita de micro-RNA, o qual é o oligonucleotídeo que se deseja objetivar. Por exemplo, no caso em que o nucleotídeo correspondente é G, normalmente será necessário selecionar uma nucleobase de não-DNA/RNA a

qual é capaz de estabelecer ligações de hidrogênio a G. Nesse caso específico, onde o nucleotídeo correspondente é G, um exemplo típico de uma nucleobase de não-DNA/RNA é ^{Me}C.

5 O termo "grupo de ligação internucleosídeo" se destina a significar um grupo capaz de acoplamento covalente junto com duas nucleobases, tal como entre unidades de DNA, entre unidades de DNA e análogos de nucleotídeo, entre duas unidades de não-LNA, entre uma unidade de não-LNA e uma unidade de LNA e entre duas unidades de LNA, etc. Exemplos preferidos incluem grupos de fosfato, fosfodiéster e fosforotioato.

10 A ligação internucleosídeo pode ser selecionada do grupo consistindo em: -O-P(O)₂-O-, -O-P(O,S)-O-, -O-P(S)₂-O-, -S-P(O)₂-O-, -S-P(O,S)-O-, -S-P(S)₂-O-, -O-P(O)₂-S-, -O-P(O,S)-S-, -S-P(O)₂-S-, -O-PO(R^H)-O-, O-PO(OCH₃)-O-, -O-PO(NR^H)-O-, -O-PO(OCH₂CH₂S-R)-O-, -O-PO(BH₃)-O-, -O-PO(NHR^H)-O-, -O-P(O)₂-NR^H-, -NR^H-P(O)₂-O-, -NR^H-CO-O-, -NR^H-CO-NR^H-, e/ou a ligação internucleosídeo e pode ser selecionada do grupo consistindo em: -O-CO-O-, -O-CO-NR^H-, -NR^H-CO-CH₂-, -O-CH₂-CO-NR^H-, -O-CH₂-CH₂-NR^H-, -CO-NR^H-CH₂-, -CH₂-NR^H-CO-, -O-CH₂-CH₂-S-, -S-CH₂-CH₂-O-, -S-CH₂-CH₂-S-, -CH₂-SO₂-CH₂-, -CH₂-CO-NR^H-, -O-CH₂-CH₂-NR^H-CO-, -CH₂-NCH₃-O-CH₂-, onde R^H é selecionado de hidrogênio e C₁₋₄-alquila. Adequadamente, em algumas modalidades, ligações internucleosídeo contendo enxofre (S), conforme proporcionado acima, pode ser preferidas.

15

20

Os termos "correspondendo a" e "corresponde a", conforme usado no contexto de oligonucleotídeos se referem a uma comparação entre

25 uma seqüência de nucleobase do composto da invenção e o comprimento inverso do mesmo ou, em uma modalidade, entre uma seqüência de nucleobase e uma seqüência de nucleobase equivalente (idêntica) a qual pode, por exemplo, compreender outras nucleobases, mas retêm a mesma seqüência de base ou complemento da mesma. Análogos de nucleotídeo são comparados diretamente com seus nucleotídeos equivalentes ou naturais correspondentes. Seqüências as quais formam o complemento reverso de uma

30 seqüência são referidas como a seqüência complementar da seqüência.

Quando de referência ao comprimento de uma molécula de nucleotídeo, conforme referido aqui, o comprimento corresponde ao número de unidades monoméricas, isto é, nucleobases, a despeito do fato de se essas unidades monoméricas são nucleotídeo ou análogos de nucleotídeo. Com
5 relação às nucleobases, os termos monômero e unidade são usados permutavelmente aqui.

Deverá ser compreendido que quando o termo "cerca" é usado no contexto de valores específicos ou faixas de valores, a descrição deverá ser lida como incluindo o valor específico ou faixa relacionada.

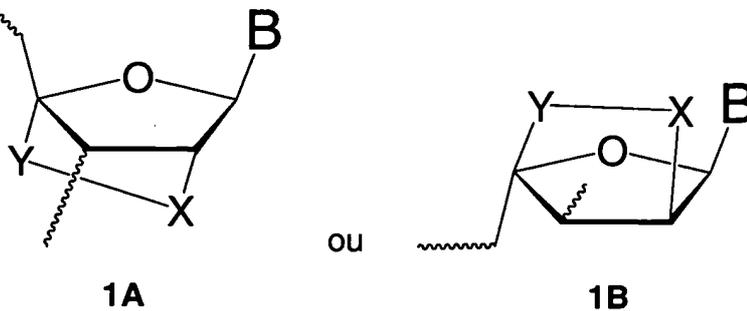
10 Análogos de DNA preferidos incluem análogos de DNA onde o grupo 2'-H é substituído por uma outra substituição que não -OH (RNA), por exemplo, através de substituição por -O-CH₃, -O-CH₂-CH₂-O-CH₃, -O-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂, -O-CH₂-CH₂-CH₂-OH ou -F.

15 Análogos de RNA preferidos incluem análogos de RNA os quais foram modificados em seu grupo 2'-OH, por exemplo, através de substituição por um outro grupo que não -H (DNA), por exemplo, -O-CH₃, -O-CH₂-CH₂-O-CH₃, -O-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂, -O-CH₂-CH₂-CH₂-OH ou -F.

Em uma modalidade, o análogo de nucleotídeo é "ENA".

20 Quando usados no presente contexto, os termos "unidade de LNA", "monômero de LNA", "resíduo de LNA", "unidade de ácido nucléico bloqueado", "monômero de ácido nucléico bloqueado" ou "resíduo de ácido nucléico bloqueado", se referem a um análogo de nucleosídeo bicíclico. Unidades de LNA são descritas, *inter alia*, no WO 99/14226, WO 00/56746, WO 00/56748, WO 01/25248, WO 02/28875, WO 03/006475 e WO 03/095467. A
25 unidade de LNA pode também ser definida com relação à sua fórmula química. Assim, uma "unidade de LNA", conforme usado aqui, tem a estrutura química mostrada no Esquema 1 abaixo:

Esquema 1



em que

5 X é selecionado do grupo consistindo em O, S e NR^{H} , onde R^{H} é H ou C_{1-4} -alquila;

Y é $(-\text{CH}_2)_r$, onde r é um número inteiro de 1-4; e

B é uma base nitrogenosa.

Quando de referência à substituição de uma unidade de DNA
 10 por sua unidade de LNA correspondente no contexto da presente invenção, o termo "unidade de LNA correspondente" se destina a significar que a unidade de DNA foi substituída por uma unidade de LNA contendo a mesma base nitrogenosa que a unidade de DNA que ela substitui, por exemplo, a unidade de LNA correspondente de uma unidade de DNA contendo a base nitrogenosa A também contém a base nitrogenosa A. A exceção é que,
 15 quando uma unidade de DNA contém a base C, a unidade de LNA correspondente contém a base C ou a base $^{\text{Me}}\text{C}$, de preferência $^{\text{Me}}\text{C}$.

Aqui, o termo, "unidade de não-LNA" se refere a um nucleosídeo diferente de uma unidade de LNA, isto é, o termo "unidade de não LNA" inclui uma unidade de DNA, bem como uma unidade de RNA. Uma unidade
 20 de não-LNA preferida é uma unidade de DNA.

Os termos "unidade", "resíduo" e "monômero" são usados permutavelmente aqui.

No presente contexto, o termo "conjugado" se destina a indicar
 25 uma molécula heterogênea formada através da ligação covalente de um oligonucleotídeo conforme descrito aqui a uma ou mais porções de não-nucleotídeo ou não-polinucleotídeo. Exemplos de porções de não-nucleotídeo ou não-polinucleotídeo incluem agentes macromoleculares, tais

como proteínas, cadeias de ácido graxo, resíduos de açúcar, glicoproteínas, polímeros ou combinações dos mesmos. Tipicamente, proteínas podem ser anticorpos para uma proteína alvo. Polímeros típicos podem ser polietileno glicol.

5 O termo "pelo menos um" abrange um número inteiro maior do que ou igual a 1, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 e assim por diante.

Os termos "um" e "uma", conforme usado sobre um nucleotídeo, um agente, uma unidade de LNA, etc., se destina a significar um ou mais.

10 Em particular, a expressão "um componente (tal como um nucleotídeo, um agente, uma unidade de LNA ou semelhante) selecionado do grupo consistindo em..." se destina a significar que um ou mais dos componentes citados podem ser selecionados. Assim, expressões tais como "um componente selecionado do grupo consistindo em A, B e C" se destina a incluir todas as

15 combinações de A, B e C, isto é, A, B, C, A+B, A+C, B+C e A+B+C.

O termo "unidade de tio-LNA" se refere a uma unidade de LNA na qual X no Esquema 1 é S. Uma unidade de tio-LNA pode estar na forma beta-D e na forma alfa-L. Geralmente, a forma beta-D da unidade de tio-LNA é preferida. A forma beta-D e a forma alfa-L de uma unidade de tio-LNA são

20 mostradas no Esquema 3 como compostos 3A e 3B, respectivamente.

O termo "unidade de amino-LNA" se refere a uma unidade de LNA na qual X no Esquema 1 é NH ou NR^H, onde R^H é hidrogênio ou C₁₋₄-alquila. Uma unidade de amino-LNA pode estar na forma beta-D e na forma alfa-L. Geralmente, a forma beta-D da unidade de amino-LNA é preferida. A

25 forma beta-D e a forma alfa-L de uma unidade de amino-LNA são mostradas no Esquema 4 como compostos 4A e 4B, respectivamente.

O termo "unidade de óxi-LNA" se refere a uma unidade de LNA na qual X no Esquema 1 é O. Uma unidade de óxi-LNA pode estar na forma beta-D e na forma alfa-L. Geralmente, a forma beta-D da unidade de óxi-LNA é preferida. A forma beta-D e a forma alfa-L de uma unidade de óxi-LNA são mostradas no Esquema 5 como compostos 5A e 5B, respectivamente.

30

No presente contexto, o termo "C₁₋₆-alquila" se destina a significar uma cadeia de hidrocarboneto saturada linear ou ramificada em que as cadeias mais longas têm de um a seis átomos de carbono, tais como metila, etila, n-propila, isopropila, n-butila, isobutila, sec-butila, terc-butila, pentila, isopentila, neopentila e hexila. Uma cadeia de hidrocarboneto ramificada se destina a significar uma C₁₋₆-alquila substituída em qualquer carbono por uma cadeia de hidrocarboneto.

No presente contexto, o termo "C₁₋₄-alquila" se destina a significar uma cadeia de hidrocarboneto saturada linear ou ramificada, em que as cadeias mais longas têm de um a quatro átomos de carbono, tal como metila, etila, n-propila, isopropila, n-butila, isobutila, sec-butila e terc-butila. Uma cadeia de hidrocarboneto ramificada se destina a significar uma C₁₋₄-alquila substituída em qualquer carbono por uma cadeia de hidrocarboneto.

Quando usado aqui, o termo "C₁₋₆-alcóxi" se destina a significar C₁₋₆-alquil-óxi, tal como metóxi, etóxi, n-propóxi, isopropóxi, n-butóxi, isobutóxi, sec-butóxi, terc-butóxi, pentóxi, isopentóxi, neopentóxi e hexóxi.

No presente contexto, o termo "C₂₋₆-alquenila" se destina a significar um grupo hidrocarboneto linear ou ramificado tendo de dois a seis átomos de carbono e contendo um ou mais ligações duplas. Exemplos ilustrativos de grupos C₂₋₆-alquenila incluem alila, homo-alila, vinila, crotila, butenila, butadienila, pentenila, pentadienila, hexenila e hexadienila. A posição da insaturação (a ligação dupla) pode ser em qualquer posição ao longo da cadeia de carbono.

No presente contexto, o termo "C₂₋₆-alquinila" se destina a significar um grupo hidrocarboneto linear ou ramificado contendo de dois a seis átomos de carbono e contendo uma ou mais ligações triplas. Exemplos ilustrativos de grupos C₂₋₆-alquinila incluem acetileno, propinila, butinila, pentinila e hexinila. A posição de insaturação (a ligação tripla) pode ser em qualquer posição ao longo da cadeia de carbono. Mais de uma ligação pode ser insaturada, de modo que a "C₂₋₆-alquinila" é uma di-ina ou enodi-ina, conforme é conhecido por aqueles habilitados na técnica.

Conforme usado aqui, "hibridização" significa ligação de hidro-

gênio, a qual pode ser ligação de hidrogênio de Watson-Crick, Hoogsteen, Hoogsteen invertida, etc., entre bases de nucleosídeo ou nucleotídeo complementares. As quatro nucleobases comumente encontradas em DNA são G, A, T e C, das quais G se emparelha com C e A se emparelha com T. Em
5 RNA, T é substituído por uracila (U), a qual, então se emparelha com A. Os grupos químicos nas nucleobases que participam na formação de dupla padrão constituem a face de Watson-Crick. Hoogsteen mostrou, anos depois, que as nucleobases de purina (G e A), além de sua face de Watson-Crick, têm uma face de Hoogsteen que pode ser reconhecida do exterior da dupla
10 e usada para ligar oligonucleotídeos de pirimidina via ligação de hidrogênio, desse modo, formando uma estrutura de hélice tripla.

No contexto da presente invenção, "complementar" se refere à capacidade de emparelhamento preciso entre duas seqüências de nucleotídeo uma com a outra. Por exemplo, se um nucleotídeo em uma determinada
15 posição de um oligonucleotídeo é capaz de ligação de hidrogênio com um nucleotídeo na posição correspondente de uma molécula de DNA ou RNA, então, o oligonucleotídeo e o DNA ou RNA são considerados como sendo complementares um ao outro nessa posição. A fita de DNA ou RNA é considerada complementar uma à outra quando um número suficiente de nucleotídeos no oligonucleotídeo pode formar ligações de hidrogênio com nucleotídeos correspondentes no RNA ou DNA alvo para permitir a formação de um complexo estável. Para ser estável *in vitro* ou *in vivo*, a seqüência de um oligonucleotídeo não precisa ser 100% complementar a seu micro-RNA alvo. Os termos "complementar" e "se hibridiza especificamente", assim, implicam
20 que o oligonucleotídeo se liga suficientemente forte e específico à molécula alvo para proporcionar a interferência desejada com a função normal do alvo, ao mesmo tempo em que deixa a função de RNAs não-alvo inalterada.

Em um exemplo preferido, o oligonucleotídeo da invenção é 100% complementar a uma seqüência de micro-RNA humano, tal como uma
30 das seqüências de micro-RNA mencionadas aqui.

Em um exemplo preferido, o oligonucleotídeo da invenção compreende uma seqüência contínua a qual é 100% complementar à região de

cultura da seqüência do micro-RNA humano.

Micro-RNAs são RNAs curtos de não codificação derivados de genes endógenos que atuam como reguladores pós-transcricionais de expressão de gene. Eles são processados a partir de precursores semelhantes à hairpina mais longos (aproximadamente 70-80 nt) denominados pré-miRNAs através da enzima RNase III Dicer. Micro-RNAs se montam em complexos de ribonucleoproteína denominados miRNPs e reconhecem seus sítios alvo através de complementaridade anti-sentido, desse modo, mediando a sub-regulação de seus genes alvo. Complementaridade quase que perfeita ou perfeita entre o miRNA e seu sítio alvo resulta em clivagem do mRNA alvo, enquanto que complementaridade limitada entre o micro-RNA e o sítio alvo resulta em inibição traducional do gene alvo.

O termo "micro-RNA" ou "miRNA", no contexto da presente invenção, significa um oligonucleotídeo de RNA consistindo em entre 18 a 25 nucleotídeos. Em termos funcionais, miRNAs são, tipicamente, moléculas de RNA endógenas regulatórias.

Os termos "micro-RNA alvo" ou "miRNA alvo" ou "alvo de miRNA" se referem a um micro-RNA com um papel biológico em doença humana, por exemplo, um miRNA oncogênico super-regulado ou um miRNA supressor de tumor em câncer, desse modo, sendo um alvo para intervenção terapêutica da doença em questão.

Os termos "gene alvo" ou "mRNA alvo" se referem a mRNAs alvos regulatórios de micro-RNAs, nos quais o referido "gene alvo" ou "mRNA alvo" é regulado pós-transcricionalmente pelo micro-RNA baseado em complementaridade quase que perfeita ou perfeita entre o miRNA e seu sítio alvo, resultando em clivagem de mRNA alvo; ou complementaridade limitada, freqüentemente conferida à complementaridade entre a assim denominada seqüência de cultura (nucleotídeos 2-7 do miRNA) e o sítio alvo, resultando em inibição traducional do mRNA alvo.

O contexto da presente invenção, o oligonucleotídeo é fita única, isso se referindo à situação onde o oligonucleotídeo está na ausência de nucleobase oligonucleotídeo complementar - isto é, ele não é um complexo

de oligonucleotídeo de fita dupla, tal como um siRNA. Em uma modalidade, a composição de acordo com a invenção não compreende um outro oligonucleotídeo o qual tem uma região de complementaridade com o oligonucleotídeo de fita única de cinco ou mais nucleobases consecutivas, tal como oito
5 ou mais ou 12 ou mais das nucleobases consecutivas. Considera-se que o outro oligonucleotídeo não está covalentemente ao oligonucleotídeo de fita única.

Oligonucleotídeo contendo LNA da invenção

Embora unidades de LNA e unidades de não-LNA possam ser
10 combinadas em uma série de maneiras para formar oligonucleotídeos, surpreendentemente, foi descoberto pelos inventores da presente invenção que uma determinada seqüência de DNA central e uma determinada presença de unidades de LNA na referida seqüência de DNA resulta em uma inibição particularmente alta de micro-RNA. Essa presença de unidades de LNA na
15 referida seqüência central dos oligonucleotídeos da presente invenção torna os referidos oligonucleotídeos altamente resistentes à nuclease.

Os nucleotídeos fora da seqüência central podem ser unidades de LNA e/ou unidades de não-LNA. Em uma modalidade, as unidades de não-LNA fora da seqüência central são unidades de DNA.

20 A seqüência central

De forma que os oligonucleotídeos anti-sentido da presente invenção inibiam seus micro-RNAs alvo tão eficientemente quanto possível, é preciso haver um determinado grau de complementaridade entre o oligonucleotídeo anti-sentido da presente invenção e o micro-RNA alvo correspondente.
25

É particularmente importante que os oligonucleotídeos da presente invenção sejam complementares às posições 3 a 8, contando a partir da extremidade 5', do micro-RNA alvo correspondente. O nucleotídeo 1, contando a partir da extremidade 5', em alguns dos micro-RNAs alvo, é uma
30 base de não-emparelhamento e está mais provavelmente oculta em uma bolsa de ligação na proteína Ago 2. Conseqüentemente, o oligonucleotídeo da invenção pode ou não ter um nucleotídeo na posição 1, contando a partir

da extremidade 3', correspondendo ao nucleotídeo 1, contando a partir da extremidade 5' do micro-RNA alvo correspondente. Em alguns casos, os primeiros dois nucleotídeos, contando a partir da extremidade 5' do micro-RNA alvo correspondente, podem ser deixados não combinados.

5 A seqüência central dos oligonucleotídeos da presente invenção é, portanto, uma seqüência de DNA das posições um a seis, dois a sete ou posições três a oito, contando a partir da extremidade 3', correspondendo às posições três a oito, contando a partir da extremidade 5', do micro-RNA alvo correspondente.

10 miR-19b

Um micro-RNA alvo particular é denominado miR-19b. A seqüência do miR-19b das posições três a oito, contando a partir da extremidade 5', é ugcaaa (veja GenBank loci AJ421740 e AJ421739). A seqüência de DNA correspondente é acgttt. Os inventores da presente invenção, além
15 disso, descobriram que, de forma a maximizar a inibição dos micro-RNAs alvo, os oligonucleotídeos da presente invenção devem conter pelo menos uma unidade de LNA em sua seqüência central.

Conseqüentemente, um primeiro aspecto da invenção se refere a um oligonucleotídeo de acordo com a invenção, tal como um oligonucleotídeo tendo um comprimento de 12 a 26 nucleotídeos tendo a seqüência de
20 DNA das posições um a seis, dois a sete ou três a oito, de preferência das posições dois a sete ou três a oito, contando a partir da extremidade 3':

acgttt,(SEQ ID NO 6)

em que pelo menos uma, tal como uma, de preferência pelo menos duas, tal
25 como duas ou três unidades de DNA na referida seqüência foram substituídas por sua unidade de LNA correspondente.

Complementaridade com outros nucleotídeos do micro-RNA alvo podem intensificar a inibição do referido micro-RNA alvo. Portanto, uma modalidade é o oligonucleotídeo conforme definido acima tendo uma seqüência de DNA das posições um a sete, dois a oito ou três a nove, de preferência das posições dois a oito ou três a nove, contando a partir da extremidade 3':
30 .

acgttta,(SEQ ID NO 70)

em que pelo menos uma, tal como uma, de preferência pelo menos duas, tal como duas, mais preferivelmente pelo menos três, tal como três ou quatro unidades de DNA na referida seqüência foram substituídas por sua unidade de LNA correspondente.

Em outra modalidade, o oligonucleotídeo de acordo com a presente invenção tem uma seqüência de DNA das posições um a oito, dois a nove ou três a dez, de preferência das posições dois a nove ou três a 10, contando a partir da extremidade 3':

10 acgtttag, (SEQ ID NO 71)

em que pelo menos uma, tal como uma, de preferência pelo menos duas, tal como duas, mais preferivelmente pelo menos três, tal como três ou quatro unidades de DNA na referida seqüência foram substituídas por sua unidade de LNA correspondente.

15 Em ainda outra modalidade, o oligonucleotídeo de acordo com a presente invenção tem uma seqüência de DNA das posições um a nove, dois a dez ou três a onze, de preferência das posições dois a dez ou três a onze, contando a partir da extremidade 3':

acgtttagg, (SEQ ID NO 72)

20 em que pelo menos uma, tal como uma, de preferência pelo menos duas, tal como duas, mais preferivelmente pelo menos três, tal como três, ainda mais preferivelmente pelo menos quatro, tal como quatro ou cinco unidades de DNA na referida seqüência foram substituídas por sua unidade de LNA correspondente.

25 miR-122a

Outro micro-RNA alvo interessante é miR-122a. A seqüência do miR-122a das posições três a oito, contando a partir da extremidade 5', é gagugu (veja entrada no miRBase HGNC:MIRN122A). A seqüência de DNA correspondente é ctcaca.

30 Conseqüentemente, um segundo aspecto da presente invenção se refere a um oligonucleotídeo de acordo com a invenção, tal como um oligonucleotídeo tendo um comprimento de 12 a 26 nucleotídeo tendo a se-

seqüência de DNA das posições um a seis, dois a sete ou três a oito, de preferência das posições dois a sete ou três a oito, contando a partir da extremidade 3':

ctcaca,(SEQ ID NO 7)

5 em que pelo menos uma, tal como uma, de preferência pelo menos duas, tal como duas ou três unidades de DNA na referida seqüência foram substituídas por sua unidade de LNA correspondente.

Uma modalidade se refere ao oligonucleotídeo antagomir miR-122a conforme descrito acima tendo a seqüência de DNA das posições um a sete, dois a oito ou três a nove, de preferência das posições dois a oito ou três a nove, contando a partir da extremidade 3':

10 ctcacac,(SEQ ID NO 73)

em que pelo menos uma, tal como uma, de preferência pelo menos duas, tal como duas, mais preferivelmente pelo menos três, tal como três ou quatro unidades de DNA na referida seqüência foram substituídas por sua unidade de LNA correspondente.

Em outra modalidade, o oligonucleotídeo de acordo com a presente invenção tem uma seqüência de DNA das posições um a oito, dois a nove ou três a dez, de preferência das posições dois a nove ou três a dez, contando a partir da extremidade 3':

20 ctcacact,(SEQ ID NO 74)

em que pelo menos uma, tal como uma, de preferência pelo menos duas, tal como duas, mais preferivelmente pelo menos três, tal como três ou quatro unidades de DNA na referida seqüência foram substituídas por sua unidade de LNA correspondente.

Em ainda outra modalidade, o oligonucleotídeo de acordo com a presente invenção tem uma seqüência de DNA das posições um a nove, dois a dez ou três a onze, de preferência das posições dois a dez ou três a onze, contando a partir da extremidade 3':

30 ctcacactg,(SEQ ID NO 75)

em que pelo menos uma, tal como uma, de preferência pelo menos duas, tal como duas, mais preferivelmente pelo menos três, tal como três, ainda mais

preferivelmente pelo menos quatro, tal como quatro ou cinco unidades de DNA na referida seqüência foram substituídas por sua unidade de LNA correspondente.

miR-155

5 Outro micro-RNA alvo interessante é miR-155. A seqüência do miR-155 das posições três a oito, contando a partir da extremidade 5', é a-augcu (veja entrada no miRBase HGNC:MIRN155). A seqüência de DNA correspondente é ttacga.

10 Conseqüentemente, um terceiro aspecto da invenção se refere a um oligonucleotídeo de acordo com a invenção, tal como um oligonucleotídeo tendo um comprimento de 12 a 26 nucleotídeos tendo a seqüência de DNA das posições um a seis, dois a sete ou três a oito, de preferência das posições dois a sete ou três a oito, contando a partir da extremidade 3':

ttacga,(SEQ ID NO 8)

15 em que pelo menos uma, tal como uma, de preferência pelo menos duas, tal como duas ou três unidades de DNA na referida seqüência foram substituídas por sua unidade de LNA correspondente.

20 Em uma modalidade, o oligonucleotídeo antagomir miR-155 como descrito acima tendo uma seqüência de DNA das posições um a sete, dois a oito ou três a nove, de preferência das posições dois a oito ou três a nove, contando a partir da extremidade 3':

ttacgat,(SEQ ID NO 76)

25 em que pelo menos uma, tal como uma, de preferência pelo menos duas, tal como duas, mais preferivelmente pelo menos três, tal como três ou quatro unidades de DNA na referida seqüência foram substituídas por sua unidade de LNA correspondente.

30 Em outra modalidade, o oligonucleotídeo de acordo com a presente invenção tem uma seqüência de DNA das posições um a oito, dois a nove ou três a dez, de preferência das posições dois a nove ou três a dez, contando a partir da extremidade 3':

ttacgatt,(SEQ ID NO 77)

em que pelo menos uma, tal como uma, de preferência pelo menos duas, tal

como duas, mais preferivelmente pelo menos três, tal como três ou quatro unidades de DNA na referida seqüência foram substituídas por sua unidade de LNA correspondente.

5 Em ainda outra modalidade, o oligonucleotídeo de acordo com a presente invenção tendo uma seqüência de DNA das posições um a nove, dois a dez ou três a onze, de preferência das posições dois a dez ou três a onze, contando a partir da extremidade 3':

ttacgatta,(SEQ ID NO 78)

10 em que pelo menos uma, tal como uma, de preferência pelo menos duas, tal como duas, mais preferivelmente pelo menos três, tal como três, ainda mais preferivelmente pelo menos quatro, tal como quatro ou cinco unidades de DNA na referida seqüência foram substituídas por sua unidade de LNA correspondente.

miR-375

15 Ainda outro micro-RNA alvo interessante é miR-375. A seqüência do miR-375 das posições três a oito, contando a partir da extremidade 5', é uguucg (veja entrada no miRBase HGNC:MIRN375). A seqüência de DNA correspondente é caagc.

20 Conseqüentemente, um quarto aspecto da invenção se refere a um oligonucleotídeo de acordo com a invenção, tal como um oligonucleotídeo tendo um comprimento de 12 a 26 nucleotídeos tendo a seqüência de DNA das posições um a seis, dois a sete ou três a oito, de preferência das posições dois a sete ou três a oito, contando a partir da extremidade 3':

acaagc; ,(SEQ ID NO 9)

25 em que pelo menos uma, tal como uma, de preferência pelo menos duas, tal como duas ou três unidades de DNA na referida seqüência foram substituídas por sua unidade de LNA correspondente.

30 Em uma modalidade, o oligonucleotídeo antagomir miR-375 conforme descrito acima tem uma seqüência de DNA das posições um a sete, dois a oito ou três a nove, de preferência das posições dois a oito ou três a nove, contando a partir da extremidade 3':

acaagca,(SEQ ID NO 79)

em que pelo menos uma, tal como uma, de preferência pelo menos duas, tal como duas, mais preferivelmente pelo menos três, tal como três ou quatro unidades de DNA na referida seqüência foram substituídas por sua unidade de LNA correspondente.

5 Em outra modalidade, o oligonucleotídeo de acordo com a presente invenção tem uma seqüência de DNA das posições um a oito, dois a nove ou três a dez, de preferência das posições dois a nove ou três a dez, contando a partir da extremidade 3':

acaagcaa, (SEQ ID NO 80)

10 em que pelo menos uma, tal como uma, de preferência pelo menos duas, tal como duas, mais preferivelmente pelo menos três, tal como três ou quatro unidades de DNA na referida seqüência foram substituídas por sua unidade de LNA correspondente.

15 Em ainda outra modalidade, o oligonucleotídeo de acordo com a presente invenção tem uma seqüência de DNA das posições um a nove, dois a dez ou três a onze, de preferência das posições dois a dez ou três a onze, contando a partir da extremidade 3':

acaagcaag, (SEQ ID NO 81)

20 em que pelo menos uma, tal como uma, de preferência pelo menos duas, tal como duas, mais preferivelmente pelo menos três, tal como três, ainda mais preferivelmente pelo menos quatro, tal como quatro ou cinco unidades de DNA na referida seqüência foram substituídas por sua unidade de LNA correspondente.

Modificação de nucleotídeo na seqüência central

25 Conforme mencionado acima, na seqüência central dos oligonucleotídeos da presente invenção pelo menos uma, tal como uma, de preferência pelo menos duas, tal como duas ou três unidades de DNA na referida seqüência foram substituídas por sua unidade de LNA correspondente. Os presentes inventores ainda descobriram que inibição dos micro-RNAs alvo
30 pode ser adicionalmente aumentada certificando-se de quem duas unidades de LNA na referida seqüência central são separadas por pelo menos uma unidade de DNA.

Conseqüentemente, uma modalidade da invenção se refere ao oligonucleotídeo conforme descrito acima, em que pelo menos duas, tal como duas ou três unidades de DNA das posições um a seis, dois a sete ou três a oito, de preferência das posições dois a sete ou três a oito, contando a partir da extremidade 3', foram substituídas por sua unidade de LNA correspondente e em que as unidades de LNA são separadas por pelo menos uma unidade de DNA.

Os presentes inventores também descobriram que inibição de micro-RNAs pode ser ainda aumentada certificando-se de que duas unidades de LNA na seqüência central são separadas por no máximo duas unidades de DNA. Conseqüentemente, em uma modalidade, a presente invenção se refere ao oligonucleotídeo conforme descrito acima, em que o número de unidades de DNA consecutivas das posições um a seis, dois a sete ou três a oito, de preferência das posições dois a sete ou três a oito, contando a partir da extremidade 3', é de no máximo dois.

As referidas descobertas se aplicam à seqüência central *per se*, isto é, as descobertas se aplicam às posições do oligonucleotídeo da presente invenção correspondendo à seqüência central. Conseqüentemente, outra modalidade se refere ao oligonucleotídeo conforme descrito acima, em que pelo menos duas, tal como duas, três ou quatro unidades de DNA das posições um a sete, dois a oito ou três a nove, de preferência das posições dois a oito ou três a nove, contando a partir da extremidade 3', foram substituídas por sua unidade de LNA correspondente e em que as unidades de LNA são separadas por pelo menos uma unidade de DNA. Uma outra modalidade se refere ao oligonucleotídeo conforme descrito acima, em que o número de unidades de DNA consecutivas das posições um a sete, dois a oito ou três a nove, de preferência das posições dois a oito ou três a nove, contando a partir da extremidade 3', é de no máximo dois.

Ainda outra modalidade se refere ao oligonucleotídeo conforme descrito acima, em que pelo menos duas, tal como duas, três ou quatro unidades de DNA das posições um a oito, dois a nove ou três a dez, de preferência das posições dois a nove ou três a dez, contando a partir da extremi-

dade 3', foram substituídas por sua unidade de LNA correspondente e em que as unidades de LNA são separadas por pelo menos uma unidade de DNA. Ainda uma outra modalidade se refere ao oligonucleotídeo conforme descrito acima, em que o número de unidades de DNA consecutivas das posições um a oito, dois a nove ou três a dez, de preferência das posições dois a nove ou três a dez, contando a partir da extremidade 3', é de no máximo dois.

Ainda outra modalidade se refere ao oligonucleotídeo conforme descrito acima, em que pelo menos duas, tal como duas, três, quatro ou cinco unidades de DNA das posições um a nove, dois a dez ou três a onze, de preferência das posições dois a dez ou três a onze, contando a partir da extremidade 3', foram substituídas por sua unidade de LNA correspondente e em que as unidades de LNA são separadas por pelo menos uma unidade de DNA. Ainda uma outra modalidade se refere ao oligonucleotídeo conforme descrito acima, em que o número de unidades de DNA consecutivas das posições um a nove, dois a dez ou três a onze, de preferência das posições dois a dez ou três a onze, contando a partir da extremidade 3', é de no máximo dois.

Modificação de nucleotídeo fora da seqüência central

Conforme mencionado acima, os nucleotídeos fora da seqüência central podem ser unidades de LNA e/ou unidades de não-LNA. Em uma modalidade, a invenção se refere ao oligonucleotídeo conforme descrito acima, em que o número de unidades de LNA fora da seqüência central é pelo menos um, tal como um, dois, três ou quatro, e em que as referidas unidades de LNA são separadas por pelo menos uma unidade de não-LNA. Em uma outra modalidade, o padrão de substituição fora da seqüência central é tal que o número de unidades consecutivas de não-LNA fora da seqüência central é de no máximo dois.

Modificação de nucleotídeo nas posições 3 a 8, contando a partir da extremidade 3'.

Nas modalidades a seguir as quais se referem à modificação de nucleotídeos nas posições 3 a 8, contando a partir da extremidade 3', as u-

nidades de LNA podem ser substituídas por outros análogos de nucleotídeo, tais como aqueles referidos aqui. "X" pode, portanto, ser selecionado do grupo consistindo em unidade de 2'-O-alkil-RNA, unidade de 2'-OMe-RNA, unidade de 2'-amino-DNA, unidade de 2'-fluoro-DNA, unidade de LNA, unidade de PNA, unidade de HNA, unidade de INA. "x" é, de preferência, DNA ou RNA, mais preferivelmente DNA.

Em uma modalidade interessante da invenção, os oligonucleotídeos da invenção são modificados nas posições 3 a 8, contando a partir da extremidade 3'. O design dessa seqüência pode ser definido pelo número de unidades de não-LNA presentes ou pelo número de unidades de LNA presentes. Em uma modalidade preferida da primeira, pelo menos um, tal como um, dos nucleotídeos nas posições três a oito, contando a partir da extremidade 3', é uma unidade de não-LNA. Em outra modalidade, pelo menos dois, tal como dois, de os nucleotídeos nas posições três a oito, contando a partir da extremidade 3', são unidades de não-LNA. Em ainda outra modalidade, pelo menos três, tal como três, dos nucleotídeos nas posições três a oito, contando a partir da extremidade 3', são unidades de não-LNA. Em ainda outra modalidade pelo menos quatro, tal como quatro, dos nucleotídeos nas posições três a oito, contando a partir da extremidade 3', são unidades de não-LNA. Em uma outra modalidade pelo menos cinco, tal como cinco, de os nucleotídeos nas posições três a oito, contando a partir da extremidade 3', são unidades de não-LNA. Em ainda uma outra modalidade, todos os seis nucleotídeos nas posições três a oito, contando a partir da extremidade 3', são unidades de não-LNA. Em uma modalidade preferida, a referida unidade de não-LNA é uma unidade de DNA.

Alternativamente definido, em uma modalidade preferida, o oligonucleotídeo de acordo com a invenção compreende pelo menos uma unidade de LNA nas posições três a oito, contando a partir da extremidade 3'. Em uma modalidade da mesma, o oligonucleotídeo de acordo com a presente invenção compreende uma unidade de LNA nas posições três a oito, contando a partir da extremidade 3'. O padrão de substituição para os nucleotídeos nas posições três a oito, contando a partir da extremidade 3', pode ser

selecionado do grupo consistindo em Xxxxxx, xXxxxx, xxXxxx, xxxXxx, xxxxXx e xxxxxX, em que "X" denota uma unidade de LNA e "x" denota uma unidade de não-LNA.

Em outra modalidade, o oligonucleotídeo de acordo com a presente invenção compreende pelo menos duas unidades de LNA nas posições três a oito, contando a partir da extremidade 3'. Em uma modalidade da mesma, o oligonucleotídeo de acordo com a presente invenção compreende duas unidades de LNA nas posições três a oito, contando a partir da extremidade 3'. O padrão de substituição para os nucleotídeos nas posições três a oito, contando a partir da extremidade 3', pode ser selecionado do grupo consistindo em XXxxxx, xxxXxX e xxxxXX, em que "X" denota uma unidade de LNA e "x" denota uma unidade de não-LNA. Em uma modalidade preferida, o padrão de substituição para os nucleotídeos nas posições três a oito, contando a partir da extremidade 3', é selecionado do grupo consistindo em XxXxxx, XxxXxx, XxxxXx, XxxxxX, xXxXxx, xXxxXx, xXxxxX, xxXxXx, xxXxxX e xxxXxX, em que "X" denota uma unidade de LNA e "x" denota uma unidade de não-LNA. Em uma modalidade mais preferida, o padrão de substituição para os nucleotídeos nas posições três a oito, contando a partir da extremidade 3', é selecionado do grupo consistindo em xXxXxx, xXxxXx, xXxxxX, xxXxXx, xxXxxX e xxxXxX, em que "X" denota uma unidade de LNA e "x" denota uma unidade de não-LNA. Em uma modalidade ainda mais preferida, o padrão de substituição para os nucleotídeos nas posições três a oito, contando a partir da extremidade 3', é selecionado do grupo consistindo em xXxXxx, xXxxXx e xxXxXx, em que "X" denota uma unidade de LNA e "x" denota uma unidade de não-LNA. Em uma modalidade ainda mais preferida, o padrão de substituição para os nucleotídeos nas posições três a oito, contando a partir da extremidade 3', is xXxXxx, em que "X" denota uma unidade de LNA e "x" denota uma unidade de não-LNA.

Em ainda outra modalidade, o oligonucleotídeo de acordo com a presente invenção compreende pelo menos três unidades de LNA nas posições três a oito, contando a partir da extremidade 3'. Em uma modalidade da

mesma, o oligonucleotídeo de acordo com a presente invenção compreende três unidades de LNA nas posições três a oito, contando a partir da extremidade 3'. O padrão de substituição para os nucleotídeos nas posições três a oito, contando a partir da extremidade 3', pode ser selecionado do grupo consistindo em XXXxxx, xXXXxx, xxXXXx, xxxXXX, XXxXxx, XXxxXx, 5 XXxxxX, xXxXxX e XxXxXx, em que "X" denota uma unidade de LNA e "x" denota uma unidade de não-LNA. Em uma modalidade preferida, o padrão de substituição para os nucleotídeos nas posições três a oito, con- 10 tando a partir da extremidade 3', é selecionado do grupo consistindo em XXxXxx, xXxXxX e XxXxXx, em que "X" denota uma unidade de LNA e "x" denota uma unidade de não-LNA. Em uma moda- lidade mais preferida, o padrão de substituição para os nucleotídeos nas po- 15 sições três a oito, contando a partir da extremidade 3', é selecionado do gru- po consistindo em xXXxXx, xXXxxX, xxXXxX, xXxXXx, xXxxXX, xxXxXX e xXxXxX, em que "X" denota uma unidade de LNA e "x" denota uma unidade de não-LNA. Em uma modalidade ainda mais preferida, o padrão de substi- tuição para os nucleotídeos nas posições três a oito, contando a partir da 20 extremidade 3', is xXxXxX ou XxXxXx, em que "X" denota uma unidade de LNA e "x" denota uma unidade de não-LNA. Em uma modalidade ainda mais preferida, o padrão de substituição para os nucleotídeos nas posições três a oito, contando a partir da extremidade 3', is xXxXxX, em que "X" denota uma unidade de LNA e "x" denota uma unidade de não-LNA.

25 Em uma outra modalidade, o oligonucleotídeo de acordo com a presente invenção compreende pelo menos quatro unidades de LNA nas posições três a oito, contando a partir da extremidade 3'. Em uma modalida- de da mesma, o oligonucleotídeo de acordo com a presente invenção com- preende four unidades de LNA nas posições três a oito, contando a partir da 30 extremidade 3'. O padrão de substituição para os nucleotídeos nas posições três a oito, contando a partir da extremidade 3', pode ser selecionado do grupo consistindo em xxXXXX, xXxXXX, xXXxXX, xXXXxX, xXXXXx,

XxxXXX, XxXxXX, XxXXxX, XxXXXx, XXxxXX, XXxXxX, XXxXXx, XXXxxX, XXXxXx e XXXXxx, em que "X" denota uma unidade de LNA e "x" denota uma unidade de não-LNA.

5 Em ainda uma outra modalidade, o oligonucleotídeo de acordo com a presente invenção compreende pelo menos cinco unidades de LNA nas posições três a oito, contando a partir da extremidade 3'. Em uma modalidade da mesma, o oligonucleotídeo de acordo com a presente invenção compreende cinco unidades de LNA nas posições três a oito, contando a partir da extremidade 3'. O padrão de substituição para os nucleotídeos nas
10 posições três a oito, contando a partir da extremidade 3', pode ser selecionado do grupo consistindo em xXXXXX, XxXXXX, XXxXXX, XXXxXX, XXXXxX e XXXXXx, em que "X" denota uma unidade de LNA e "x" denota uma unidade de não-LNA.

De preferência, o oligonucleotídeo de acordo com a presente
15 invenção compreende uma ou duas unidades de LNA nas posições três a oito, contando a partir da extremidade 3'. Isso é considerado vantajoso para a estabilidade da A-hélice formada pela dupla oligo:micro-RNA, uma dupla semelhante a uma estrutura da dupla RNA:RNA.

Em uma modalidade preferida, a referida unidade de não-LNA é
20 uma unidade de DNA.

Variação do comprimento dos oligonucleotídeos

O comprimento do oligonucleotídeos da invenção não precisa ser equivalente ao comprimento dos micro-RNAs alvo exatamente. Na verdade, considera-se vantajoso ter um oligonucleotídeo curto, tal como entre
25 10 – 17 ou 10 – 16 nucleobases.

Em uma modalidade, o oligonucleotídeo de acordo com a presente invenção tem um comprimento de 8 a 24 nucleotídeo, tal como 10 a 24, entre 12 a 24 nucleotídeo, tal como um comprimento de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 ou 24 nucleotídeo, de preferência
30 um comprimento de 10 – 22, tal como entre 12 to 22 nucleotídeo, tal como Um comprimento de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22 nucleotídeo, mais preferivelmente um comprimento de 10 – 20, tal como entre

12 to 20 nucleotídeo, tal como um comprimento de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 nucleotídeo, ainda mais preferivelmente um comprimento de 10 a 19, tal como entre 12 a 19 nucleotídeo, tal como um comprimento de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 ou 19 nucleotídeo, por exemplo, um comprimento de 10 a 18, tal como entre 12 a 18 nucleotídeo, tal como um comprimento de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 ou 18 nucleotídeo, mais preferivelmente um comprimento de 10 – 17, tal como de 12 a 17 nucleotídeos, tal como um comprimento de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 ou 17 nucleotídeos, mais preferivelmente um comprimento de 10 a 16, tal como entre 12 a 16 nucleotídeo, tal como um comprimento de 10, 11, 12, 13, 14, 15 ou 16 nucleotídeo.

Modificação do nucleotídeo da posição 11, contando a partir da extremidade 3' para a extremidade 5'

O padrão de substituição para o nucleotídeo a partir da posição 11, contando a partir da extremidade 3', para a extremidade 5' pode incluir unidades de análogo de nucleotídeo (tal como LNA) ou não. Em uma modalidade preferida, o oligonucleotídeo de acordo com a presente invenção compreende pelo menos um unidade de análogo de nucleotídeo (tal como LNA), tal como uma unidade de análogo de nucleotídeo, a partir da posição 11, contando a partir da extremidade 3' para a extremidade 5'. Em outra modalidade preferida, o oligonucleotídeo de acordo com a presente invenção compreende pelo menos duas unidades de análogo de nucleotídeo, tal como unidades de LNA, tal como duas unidades de análogo de nucleotídeo, a partir da posição 11, contando a partir da extremidade 3' para a extremidade 5'.

Nas modalidades a seguir as quais se referem à modificação de nucleotídeo nas nucleobases a partir das posição 11 para a extremidade 5' do oligonucleotídeo, as unidades de LNA podem ser substituídas por seus análogos de nucleotídeo, tais como aqueles referidos aqui. "X" pode, portanto, ser selecionado do grupo consistindo em unidade de 2'-O-alkil-RNA, unidade de 2'-OMe-RNA, unidade de 2'-amino-DNA, unidade de 2'-fluoro-DNA, unidade de LNA, unidade de PNA, unidade de HNA, unidade de INA. "x" is de preferência DNA ou RNA, mais preferivelmente DNA.

Em uma modalidade, o oligonucleotídeo de acordo com a presente invenção tem o seguinte padrão de substituição, o qual é repetido a partir do nucleotídeo onze, contando a partir da extremidade 3' para a extremidade 5': xXxX ou XxXx, em que "X" denota uma unidade de LNA e "x" denota uma unidade de não-LNA. Em outra modalidade, o oligonucleotídeo de acordo com a presente invenção tem o seguinte padrão de substituição, o qual é repetido a partir do nucleotídeo onze, contando a partir da extremidade 3' para a extremidade 5': XxxXxx, xXxxXx ou xxXxxX, em que "X" denota uma unidade de LNA e "x" denota uma unidade de não-LNA. Em ainda outra modalidade, o oligonucleotídeo de acordo com a presente invenção tem o seguinte padrão de substituição, o qual é repetido a partir do nucleotídeo onze, contando a partir da extremidade 3' para a extremidade 5': XxxxXxxx, xXxxxXxx, xxXxxxXx ou xxxXxxxX, em que "X" denota uma unidade de LNA e "x" denota uma unidade de não-LNA.

O padrão de substituição específico para o nucleotídeo a partir da posição 11, contando a partir da extremidade 3' para a extremidade 5' depende do número de nucleotídeo no oligonucleotídeo de acordo com a presente invenção. Em uma modalidade preferida, o oligonucleotídeo de acordo com a presente invenção contém 12 nucleotídeo e o padrão de substituição para as posições 11 a 12, contando a partir da extremidade 3', é selecionado do grupo consistindo em xX e Xx, em que "X" denota uma unidade de LNA e "x" denota uma unidade de não-LNA. Em uma modalidade mais preferida da mesma, o padrão de substituição para as posições 11 a 12, contando a partir da extremidade 3', é xX, em que "X" denota uma unidade de LNA e "x" denota uma unidade de não-LNA. Alternativamente, nenhuma unidade de LNA está presente nas posições 11 a 12, contando a partir da extremidade 3', isto é, o padrão de substituição é xx.

Em uma outra modalidade preferida, o oligonucleotídeo de acordo com a presente invenção contém 13 nucleotídeo e o padrão de substituição para as posições 11 a 13, contando a partir da extremidade 3', é selecionado do grupo consistindo em Xxx, xXx, xxX, XXx, XxX, xXX e XXX, em que "X" denota uma unidade de LNA e "x" denota uma unidade de não-LNA.

- Em uma modalidade mais preferida da mesma, o padrão de substituição para as posições 11 a 13, contada a partir da extremidade 3', é selecionado do grupo consistindo em xXx, xxX e xXX, em que "X" denota uma unidade de LNA e "x" denota uma unidade de não-LNA. Em uma modalidade ainda mais preferida, o padrão de substituição para as posições 11 a 13, contando a partir da extremidade 3', é xxX, em que "X" denota uma unidade de LNA e "x" denota uma unidade de não-LNA. Alternativamente, nenhuma unidade de LNA está presente nas posições 11 a 13, contando a partir da extremidade 3', isto é, o padrão de substituição é xxx.
- 10 Em uma outra modalidade preferida, o oligonucleotídeo de acordo com a presente invenção contém, 14 nucleotídeo e o padrão de substituição para as posições 11 a 14, contando a partir da extremidade 3', é selecionado do grupo consistindo em Xxxx, xXxx, xxXx, xxxX, XXxx, XxXx, XxxX, xXXx, xXxX e xxXX, em que "X" denota uma unidade de LNA e "x" denota uma unidade de não-LNA. Em uma modalidade preferida da mesma, o padrão de substituição para as posições 11 a 14, contando a partir da extremidade 3', é selecionado do grupo consistindo em xXxx, xxXx, xxxX, xXxX e xxXX, em que "X" denota uma unidade de LNA e "x" denota uma unidade de não-LNA. Em uma modalidade mais preferida da mesma, o padrão de substituição para as posições 11 a 14, contando a partir da extremidade 3', is
- 20 xXxX, em que "X" denota uma unidade de LNA e "x" denota uma unidade de não-LNA. Alternativamente, nenhuma unidade de LNA está presente nas posições 11 a 14, contando a partir da extremidade 3', isto é, o padrão de substituição é xxxx.
- 25 Em uma outra modalidade preferida, o oligonucleotídeo de acordo com a presente invenção contém 15 nucleotídeos e o padrão de substituição para as posições 11 a 15, contando a partir da extremidade 3', é selecionado do grupo consistindo em Xxxxx, xxxXX e
- 30 XxXxX, em que "X" denota uma unidade de LNA e "x" denota uma unidade de não-LNA. Em uma modalidade preferida da mesma, o padrão de substituição para as posições 11 a 15, contando a partir da extremidade 3', é sele-

cionado do grupo consistindo em xxXxx, XxXxx, XxxXx, xXxXx, xXxxX e
 xxXxX, em que "X" denota uma unidade de LNA e "x" denota uma unidade
 de não-LNA. Em uma modalidade mais preferida da mesma, o padrão de
 substituição para as posições 11 a 15, contando a partir da extremidade 3', é
 5 selecionado do grupo consistindo em xxXxx, xXxXx, xXxxX e xxXxX, em que
 "X" denota uma unidade de LNA e "x" denota uma unidade de não-LNA. Em
 uma modalidade ainda mais preferida da mesma, o padrão de substituição
 para as posições 11 a 15, contando a partir da extremidade 3', é selecionado
 do grupo consistindo em xXxxX e xxXxX, em que "X" denota uma unidade
 10 de LNA e "x" denota uma unidade de não-LNA. Em uma modalidade ainda
 mais preferida, o padrão de substituição para as posições 11 a 15, contando
 a partir da extremidade 3', is xxXxX, em que "X" denota uma unidade de LNA
 e "x" denota uma unidade de não-LNA. Alternativamente, no unidades de
 LNA está presente nas posições 11 a 15, contando a partir da extremidade
 15 3', isto é, o padrão de substituição é xxxxx.

Em ainda uma outra modalidade preferida, o oligonucleotídeo de
 acordo com a presente invenção contém 16 nucleotídeo e o padrão de substi-
 tuição para as posições 11 a 16, contando a partir da extremidade 3', é se-
 lecionado do grupo consistindo em Xxxxxx, xXxxxx, xxXxxx, xxxXxx, xxxxXx,
 20 xxxxxX, XXxxxx, XxXxxx, XxxXxx, XxxxXx, XxxxxX, xXXxxx, xXxXxx,
 xxXXXx, xxXXxX, xxXxXX e xxxXXX, em que "X" denota uma unidade de
 25 LNA e "x" denota uma unidade de não-LNA. Em uma modalidade preferida
 da mesma, o padrão de substituição para as posições 11 a 16, contando a
 partir da extremidade 3', é selecionado do grupo consistindo em XxxXxx,
 xXxXxx, xXxxXx, xxXxXx, xxXxxX, XxXxXx, XxXxxX, XxxXxX, xXxXxX,
 xXxxXX e xxXxXX, em que "X" denota uma unidade de LNA e "x" denota
 30 uma unidade de não-LNA. Em uma modalidade mais preferida da mesma, o
 padrão de substituição para as posições 11 a 16, contando a partir da ex-
 tremidade 3', é selecionado do grupo consistindo em xXxXxx, xXxxXx,

xxXxXx, xxXxxX, xXxXxX, xXxxXX e xxXxXX, em que "X" denota uma unidade de LNA e "x" denota uma unidade de não-LNA. Em uma modalidade ainda mais preferida da mesma, o padrão de substituição para as posições 11 a 16, contando a partir da extremidade 3', é selecionado do grupo consistindo em xxXxxX, xXxXxX, xXxxXX e xxXxXX, em que "X" denota uma unidade de LNA e "x" denota uma unidade de não-LNA. Em ainda uma outra modalidade preferida da mesma, o padrão de substituição para as posições 11 a 16, contando a partir da extremidade 3', é selecionado do grupo consistindo em xxXxxX e xXxXxX, em que "X" denota uma unidade de LNA e "x" denota uma unidade de não-LNA. Em uma modalidade ainda mais preferida da mesma, o padrão de substituição para as posições 11 a 16, contando a partir da extremidade 3', é xxXxxX, em que "X" denota uma unidade de LNA e "x" denota uma unidade de não-LNA. Alternativamente, no unidades de LNA está presente nas posições 11 a 16, contando a partir da extremidade 3', isto é, o padrão de substituição é xxxxxx.

Em uma modalidade preferida da invenção, o oligonucleotídeo de acordo com a presente invenção contém uma unidade de LNA na extremidade 5'. Em outra modalidade preferida, o oligonucleotídeo de acordo com a presente invenção contém uma unidade de LNA nas duas primeiras posições, contando a partir da extremidade 5'.

Em uma modalidade particularmente preferida, o oligonucleotídeo de acordo com a presente invenção contém 13 nucleotídeos e o padrão de substituição, começando a partir da extremidade 3', é XXxXxXxxXXxxX, em que "X" denota uma unidade de LNA e "x" denota uma unidade de não-LNA. A seqüência preferida para essa modalidade, começando a partir da extremidade 3' é CCTCaCacTGtA, em que uma letra maiúscula denota uma base nitrogenosa em uma unidade de LNA e uma letra minúscula denota uma base nitrogenosa em uma unidade de não-LNA.

Em outra modalidade particularmente preferida, o oligonucleotídeo de acordo com a presente invenção contém 15 nucleotídeos e o padrão de substituição, começando a partir da extremidade 3' é XXxXxXxxXXxxXxX, em que "X" denota uma unidade de LNA e "x" denota uma unidade de não-

LNA. A seqüência preferida para essa modalidade, começando a partir da extremidade 3', é CCtCaCacTGttAcC, em que uma letra maiúscula denota uma base nitrogenosa em uma unidade de LNA e uma letra minúscula denota uma base nitrogenosa em uma unidade de não-LNA.

5 Modificação do grupo de ligação internucleosídeo

Grupos de ligação internucleosídeo típicos em oligonucleotídeo são grupos fosfato, mas esses podem ser substituídos por grupos de ligação internucleosídeo diferentes de fosfato. Em uma outra modalidade interessante da invenção, o oligonucleotídeo da invenção é modificado em sua estrutura de grupo de ligação internucleosídeo, isto é, o oligonucleotídeo modificado compreende um grupo de ligação internucleosídeo o qual difere de fosfato. Conseqüentemente, em uma modalidade preferida, o oligonucleotídeo de acordo com a presente invenção compreende pelo menos uma.

Exemplos específicos de grupos de ligação internucleosídeo os quais diferem de fosfato (-O-P(O)₂-O-) incluem -O-P(O,S)-O-, -O-P(S)₂-O-, -S-P(O)₂-O-, -S-P(O,S)-O-, -S-P(S)₂-O-, -O-P(O)₂-S-, -O-P(O,S)-S-, -S-P(O)₂-S-, -O-PO(R^H)-O-, -O-PO(OCH₃)-O-, -O-PO(NR^H)-O-, -O-PO(OCH₂CH₂S-R)-O-, -O-PO(BH₃)-O-, -O-PO(NHR^H)-O-, -O-P(O)₂-NR^H-, -NR^H-P(O)₂-O-, -NR^H-CO-O-, -NR^H-CO-NR^H-, -O-CO-O-, -O-CO-NR^H-, -NR^H-CO-CH₂-, -O-CH₂-CO-NR^H-, -O-CH₂-CH₂-NR^H-, -CO-NR^H-CH₂-, -CH₂-NR^H-CO-, -O-CH₂-CH₂-S-, -S-CH₂-CH₂-O-, -S-CH₂-CH₂-S-, -CH₂-SO₂-CH₂-, -CH₂-CO-NR^H-, -O-CH₂-CH₂-NR^H-CO-, -CH₂-NCH₃-O-CH₂-, onde R^H é hidrogênio ou C₁₋₄-alquila.

Quando o grupo de ligação internucleosídeo é modificado, o grupo de ligação internucleosídeo é, de preferência, um grupo fosforotioato (-O-P(O,S)-O-). Em uma modalidade preferida, todos os grupos de ligação internucleosídeo dos oligonucleotídeos de acordo com a presente invenção são fosforotioato.

Designs para micro-RNAs específicos

30 A tabela a seguir proporciona exemplos de oligonucleotídeo de acordo com a presente invenção, tal como aqueles usados em composições farmacêuticas, quando comparado com o tipo de molécula da técnica anterior.

alvo: hsa-miR-122a MIMAT0000421		SEQ ID
uggagugugacaaugguguuugu		SEQ ID NO 1
Selecionado na linhagem de célula HUH-7 expressando miR-122		
Oligo #, micro-RNA alvo, seqüência de oligo	Design	
3962:miR-122 5'-ACAAacaccattgtcacacTCCA-3'	Complemento total, gap	SEQ ID NO 11
3965:miR-122 5'-acaaacACCATTGTcactcca-3'	Complemento total, bloco	SEQ ID NO 12
3972:miR-122 5'-acAaaCacCatTgtCacActCca-3'	Complemento total, LNA_3	SEQ ID NO 13
3549 (3649):miR-122 5'-CcAttGTcaCaCtCC-3'	Novo design	SEQ ID NO 14
3975:miR-122 5'-CcAtTGTcaCACtCC-3'	Novo design intensificado	SEQ ID NO 15
3975':miR-122 5'-ATTGTcACACtCC-3'	ED - 13mer	SEQ ID NO 16
3975":miR-122 5'-TGTcACACtCC-3'	ED - 11mer	SEQ ID NO 17
3549' (3649):miR-122 5' CC ^M AT ^M T ^M GTC ^M A ^M CA ^M CT ^M CC-3'	Novo design - 2'MOE	SEQ ID NO 18
3549" (3649):miR-122 5' CC ^F AT ^F T ^F GTC ^F A ^F CA ^F CT ^F CC-3'	Novo design - 2'Fluoro	SEQ ID NO 19
alvo: hsa-miR-19b MIMAT0000074		
ugugcaaaucgaugcaaaacuga		SEQ ID NO 2
Selecionado na linhagem de célula HeLa expressando miR-19b		
Oligo #, micro-RNA alvo, seqüência de oligo	Design	
3963:miR-19b 5'-TCAGtttgcattgattgCACA-3'	Complemento total, gap	SEQ ID NO 20
3967:miR-19b 5'-tcagttTGCATGGattgcaca-3'	Complemento total, bloco	SEQ ID NO 21
3973:miR-19b 5'-tcAgtTttGcaTggAttTgcAca-3'	Complemento total, LNA_3	SEQ ID NO 22
3560:miR-19b 5'-TgCatGGatTtGcAC-3'	Novo design	SEQ ID NO 23
3976:miR-19b 5'-TgCaTGGatTTGcAC-3'	Novo design intensificado	SEQ ID NO 24
3976':miR-19b 5'-CaTGGaTTTgCac-3'	ED - 13mero	SEQ ID NO 25

alvo: hsa-miR-122a MIMAT0000421		SEQ ID
3976":miR-19b 5'-TGGaTTTGcAC-3'	ED - 11mero	SEQ ID NO 26
3560':miR-19b 5' TG ^M CA ^M T ^M GGA ^M T ^M TT ^M GC- ^M AC-3'	Novo design - 2'MOE	SEQ ID NO 27
3560":miR-19b 5'-TG ^F CA ^F T ^F GGA ^F T ^F TT ^F GC ^F AC-3'	Novo design - 2'MOE	SEQ ID NO 28
alvo: hsa-miR-155 MIMAT0000646		
uuaaugcuaaucgugauagggg		SEQ ID NO 3
Selecionado na linhagem de célula 518A2 expressando miR-155		
Oligo #, micro-RNA alvo, seqüência de oligo	Design	
3964:miR-155 5'-CCCCtatcaccgattagcaTTAA-3'	Complemento total, gap	SEQ ID NO 29
3968:miR-155 5'-cccctaTCACGATTtagcattaa-3'	Complemento total, bloco	SEQ ID NO 30
3974:miR-155 5'-cCccTatCacGatTagCatTaa-3'	Complemento total, LNA_3	SEQ ID NO 31
3758: miR-155 5'-TcAcgATtaGcAtTA-3'	Novo design	SEQ ID NO 32
3818: miR-155 5'-TcAcGATtaGCAtTA-3'	Novo design intensificado	SEQ ID NO 33
3818': miR-155 5'-ACGATtAGCAtTA-3'	ED - 13mero	SEQ ID NO 34
3818": miR-155 5'-GATtAGCaTTA-3'	ED - 11mero	SEQ ID NO 35
3758': miR-155 5'-TC ^M AC ^M G ^M ATTA ^M GC ^M AT ^M TA-3'	Novo design - 2'MOE	SEQ ID NO 36
3758": miR-155 5'-TC ^F AC ^F G ^F ATT ^F A ^F GC ^F AT ^F TA-3'	Novo design - 2'Fluoro	SEQ ID NO 37
alvo: hsa-miR-21 MIMAT0000076		
uagcuuauacagacugauguuga		SEQ ID NO 4
miR-21 5'- TCAAcatcagctctgataaGCTA -3'	Complemento total, gap	SEQ ID NO 38
miR-21 5'- tcaacaTCAGTCTGataagcta -3'	Complemento total, bloco	SEQ ID NO 39
miR-21 5'- tcAtcAtcAgtCtgAtaAGcTt -3'	Complemento total, LNA_3	SEQ ID NO 40

alvo: hsa-miR-122a MIMAT0000421			SEQ ID
miR-21	5'- TcAgtCTgaTaAgCT -3'	Novo design	SEQ ID NO 41
miR-21	5'- TcAgTCTgaTAAgCT -3'-	Novo design intensificado	SEQ ID NO 42
miR-21	5'- AGTCTgATAAgCT -3'-	ED - 13mero	SEQ ID NO 43
miR-21	5'- TCTgAtAAGCT -3'-	ED - 11mero	SEQ ID NO 44
miR-21	5'- TC ^M AG ^M T ^M CTG ^M A ^M TA- M ^M AG ^M CT - 3'	Novo design - 2'MOE	SEQ ID NO 45
miR-21	5'- TC ^F AG ^F T ^F CTG ^F A ^F TA ^F AG ^F CT- 3'	Novo design - 2'Fluoro	SEQ ID NO 46
alvo: hsa-miR-375 MIMAT0000728			
uuuguucguucggcucgcguga			SEQ ID NO 5
miR- 375	5'- TCTCgcggtgccgttcttt -3'	Complemento total, gap	SEQ ID NO 47
miR- 375	5'- tctcgcGTGCCGTTcgttcttt -3'	Complemento total, bloco	SEQ ID NO 48
miR- 375	5'- tcTcgCgtGccGttCgtTctTt -3'	Complemento total, LNA_3	SEQ ID NO 49
miR- 375	5'- GtGccGTtcGtTcTT 3'	Novo design	SEQ ID NO 50
miR- 375	5'- GtGcCGTtcGTTcTT 3'	Novo design intensificado	SEQ ID NO 51
miR- 375	5'- GCCGTtCgTTCTT 3'	ED - 13mero	SEQ ID NO 52
miR- 375	5'- CGTTcGTTCTT 3'	ED - 11mero	SEQ ID NO 53
miR- 375	5'- GT ^M GC ^M C ^M GTT ^M C ^M GT ^M TC ^M TT 3'	Novo design - 2'MOE	SEQ ID NO 54
miR- 375	5'- GT ^F GC ^F C ^F GTT ^F C ^F GT ^F TC ^F TT 3'	Novo design - 2'Fluoro	SEQ ID NO 55

Letras maiúsculas sem um superescrito M ou F, se referem a unidades de LNA. Letra minúscula = DNA, exceto para a letra minúscula em negrito = RNA. As citocinas de LNA podem ser opcionalmente metiladas). Letras maiúsculas seguido por um superescrito M se referem a unidades de 2'OME RNA. Letras maiúsculas seguido por um superescrito F se referem à unidades de 2'fluoro DNA, letra minúscula se refere ao DNA. Os oligos acima podem, em uma modalidade, ser totalmente fosforotioato, mas outras

ligações de nucleobase, conforme aqui descrito, podem ser usadas. Em uma modalidade, as ligações de nucleobase são todas fosfodiéster. Considera-se que, para uso dentro da coluna espinhal/cérebro, é preferível usar ligações de fosfodiéster, por exemplo, para o uso dos antimirRs que objetivam miR21.

- 5 Os oligonucleotídeos de acordo com a invenção podem, em uma modalidade, ter uma seqüência de nucleobases 5' – 3' selecionada do grupo consistindo em:

LdLddLLddLdLdLL (Novo design)

LdLdLLLddLLLdLL (Novo design intensificado)

- 10 LMLMMLLMMMLMMLL (Novo design – 2'MOE)

LMLMLLLMMLLLMLL (Novo design intensificado– 2'MOE)

LFLFFLLFFLFLFLL (Novo design – 2' Fluoro)

LFLFLLLFFLLLFL (Novo design intensificado– 2' Fluoro)

LddLddLddL(d)(d)(L)(d)(d)(L)(d) 'A cada três'

- 15 dLddLddLdd(L)(d)(d)(L)(d)(d)(L) 'A cada três'

ddLddLddLd(d)(L)(d)(d)(L)(d)(d) 'A cada três'

LMMLMMLMML(M)(M)(L)(M)(M)(L)(M) 'A cada três'

MLMMLMMLMM(L)(M)(M)(L)(M)(M)(L) 'A cada três'

MMLMMLMMLM(M)(L)(M)(M)(L)(M)(M) 'A cada três'

- 20 LFFFLFFLFFL(F)(F)(L)(F)(F)(L)(F) 'A cada três'

FLFFLFFLFF(L)(F)(F)(L)(F)(F)(L) 'A cada três'

FFLFFLFFLF(F)(L)(F)(F)(L)(F)(F) 'A cada três'

dLdLdLdLdL(d)(L)(d)(L)(d)(L)(d) 'A cada dois'

LdLdLdLdL(d)(L)(d)(L)(d)(L)(d)(L) 'A cada dois'

- 25 MLMLMLMLML(M)(L)(M)(L)(M)(L)(M) 'A cada dois'

LMLMLMLML(M)(L)(M)(L)(M)(L)(M)(L) 'A cada dois'

FLFLFLFLFL(F)(L)(F)(L)(F)(L)(F) 'A cada dois'

LFLFLFLFL(F)(L)(F)(L)(F)(L)(F)(L) 'A cada dois'

- em que L = unidade de LNA, d = unidades de DNA, M = 2'MOE RNA, F =

- 30 2'Fluoro e resíduos entre parênteses são opcionais

Exemplos específicos dos oligonucleotídeos de acordo com a presente invenção podem ser selecionados do grupo consistindo em tg-

CatGgaTttGcaCa (SEQ ID NO 82), tgCatGgaTttGcaC (SEQ ID NO 83),
 CatGgaTttGcaC (SEQ ID NO 84), tGcAtGgAtTtGcAc (SEQ ID NO 85), cAtG-
 gAtTtGcAc (SEQ ID NO 86), CatGGatTtGcAC (SEQ ID NO 87), TgCatG-
 GatTtGcAC (SEQ ID NO 88), TgCaTgGaTTtGcACa (SEQ ID NO 89),
 5 cCatTgtCacActCca (SEQ ID NO 90), cCatTgtAacTctCca (SEQ ID NO 91),
 ccAttGtcAcaCtcCa (SEQ ID NO 92), cCatTgtCacActCc (SEQ ID NO 93),
 atTgtCacActCc (SEQ ID NO 94), ccAttGtcAcaCtcC (SEQ ID NO 95), AttGt-
 cAcaCtcC (SEQ ID NO 96), aTtGtCaCaCtCc (SEQ ID NO 97), AttGTca-
 CaCtCC (SEQ ID NO 98), CcAttGTcaCaCtCC (SEQ ID NO 99), CcaTtgTca-
 10 cActcCa (SEQ ID NO 100), CCAttgtcacacTCCa (SEQ ID NO 101), tCacGat-
 TagCatTaa (SEQ ID NO 102), aTcaCgaTtaGcaTta (SEQ ID NO 103), TcAc-
 GaTtAgCaTtAa (SEQ ID NO 104), AtcAcGaTtAgCaTta (SEQ ID NO 105),
 gAgcCgaAacAaAa (SEQ ID NO 106), gcCgaAacAaAa (SEQ ID NO 107),
 GaGcCgAaCgAaCaA (SEQ ID NO 108), e GcCgAaCgAaCaA (SEQ ID NO
 15 109); em que a letra minúscula identifica a base nitrogenosa de uma unidade
 de DNA e uma letra maiúscula identifica a base nitrogenosa de uma unidade
 de LNA, com a letra maiúscula C se referindo a ^{Me}C.

Será reconhecido que o design de nucleobases de LNA/DNA
 nos exemplos específicos acima pode ser aplicado a outros oligonucleotí-
 20 deos de acordo com a invenção.

Conjugados

A invenção também proporciona conjugados compreendendo o
 oligonucleotídeo de acordo com a invenção.

Em uma modalidade da invenção, o composto oligomérico está
 25 ligado a ligantes/conjugados, os quais podem ser usados, por exemplo, para
 aumentar a captação celular dos oligonucleotídeos anti-sentido. Essa conju-
 gação pode ocorrer nas posições terminais 5'/3'-OH, mas os ligantes podem
 também ocorrer nos açúcares e/ou nas bases. Em particular, o fator de cres-
 cimento ao qual o oligonucleotídeo anti-sentido pode ser conjugado pode
 30 compreender transferrina ou folato. Complexos de transferrina – polilisina –
 oligonucleotídeo ou complexos de folato – polisina - ou semelhante podem
 ser preparados para captação por células expressando altos níveis do recep-

tor de transferrina ou folato. Outros exemplos de conjugados/ ligantes são porções de colesterol, intercaladores de dupla tais como acridina, poli-L-lisina, "revestimento de extremidade" com um ou mais grupos de ligação resistentes à nuclease, tal como fosforomonotioato e semelhantes. A invenção

5 também proporciona um conjugado compreendendo o composto de acordo com a invenção conforme descrito aqui e pelo menos uma porção de não-nucleotídeo ou não polinucleotídeo covalentemente presa ao referido composto. Portanto, em uma modalidade onde o composto da invenção consiste

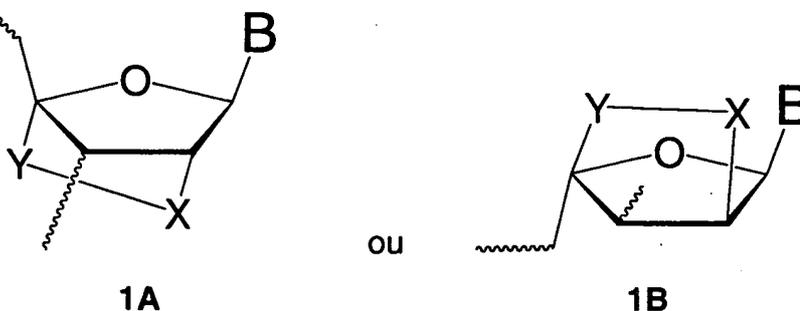
10 de um ácido nucléico especificado conforme divulgado aqui, o composto pode também compreender pelo menos uma porção de não-nucleotídeo ou não polinucleotídeo (por exemplo, não compreendendo um ou mais nucleotídeos ou análogos de nucleotídeo) covalentemente ligada ao referido composto. A porção de não-nucleobase pode, por exemplo, ser ou compreender um esterol, tal como colesterol.

15 Portanto, será reconhecido que o oligonucleotídeo da invenção, tal como o oligonucleotídeo usado em formulações farmacêuticas (terapêuticas) pode compreender outros componentes de não-nucleobase, tais como os conjugados aqui definidos.

A unidade de LNA

20 Em uma modalidade preferida, a unidade de LNA tem a estrutura química geral mostrada no Esquema 1 abaixo:

Esquema 1



25 em que

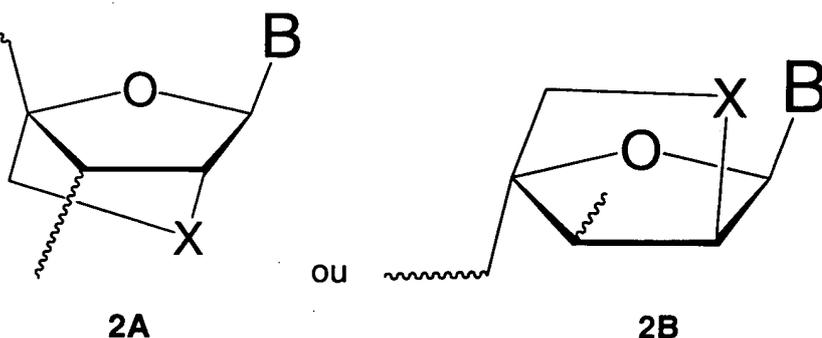
X é selecionado do grupo consistindo em O, S e NR^{H} , onde R^{H} é H ou C_{1-4} -alquila;

Y é $(-\text{CH}_2)_r$, onde r é um número inteiro de 1-4; e

B é uma base nitrogenosa.

Em uma modalidade preferida da invenção, r é 1 ou 2, em particular 1, isto é, uma unidade de LNA preferida tem a estrutura química mostrada no Esquema 2 abaixo:

5 Esquema 2

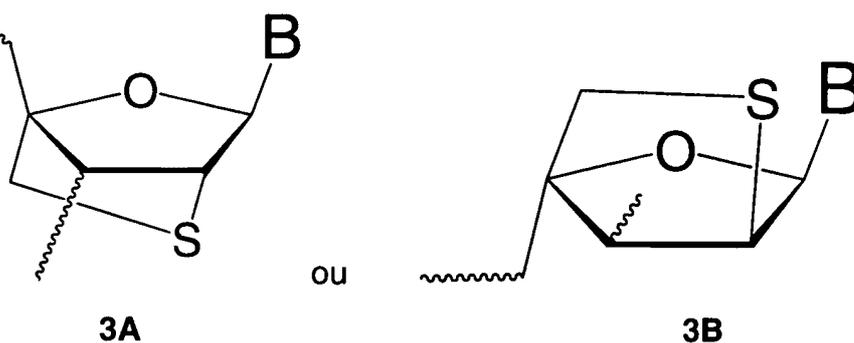


em que X e B são conforme definido acima.

Em uma modalidade interessante, as unidades de LNA incorporadas nos oligonucleotídeos da invenção são independentemente selecionadas do grupo consistindo em unidades de tio-LNA, unidades de amino-LNA e unidades de óxi-LNA.

Assim, a unidade de tio-LNA pode ter a estrutura química mostrada no Esquema 3 abaixo:

15 Esquema 3



em que B é conforme definido acima.

De preferência, a unidade de tio-LNA está em sua forma beta-D-, isto é, tendo a estrutura mostrada em 3A acima.

Da mesma forma, a unidade de amino-LNA pode ter a estrutura química mostrada no Esquema 4 abaixo:

5 ciano, nitro, hidróxi, Prot-O-, Act-O-, mercapto, Prot-S-, Act-S-, C₁₋₆-alquilatio, amino, Prot-N(R^H)-, Act-N(R^H)-, mono- ou di(C₁₋₆-alquila)amino C₁₋₆-alcóxi, opcionalmente substituído, C₁₋₆-alquila opcionalmente substituída, C₂₋₆-alquinila opcionalmente substituída, C₂₋₆-alquienilóxi opcionalmente substituído, C₂₋₆-alquinila opcionalmente substituída, C₂₋₆-alquienilóxi opcionalmente substituída, monofosfato incluindo monofosfato protegido, monotiofosfato incluindo monotiofosfato protegido, difosfato incluindo difosfato protegido, ditiofosfato incluindo ditiofosfato protegido, trifosfato incluindo trifosfato protegido, tritiofosfato incluindo tritiofosfato protegido, onde Prot é um grupo de
10 proteção para -OH, -SH e -NH(R^H), e Act é um grupo de ativação para -OH, -SH, e -NH(R^H), e R^H é hidrogênio ou C₁₋₆-alquila.

Exemplos de grupos de proteção fosfato incluem S-acetiltioetila (SATE) e S-pivaloiltioetila (*t*-butil-SATE).

15 Ainda outros exemplos de grupos terminais incluem intercaladores de DNA, grupos fotoquimicamente ativos, grupos de quelação, grupos repórter, ligantes, carbóxi, sulfono, hidroximetila, Prot-O-CH₂-, Act-O-CH₂-, aminometila, Prot-N(R^H)-CH₂-, Act-N(R^H)-CH₂-, carboximetila, sulfonometila, onde Prot é um grupo de proteção -OH, -SH e -NH(R^H), e Act é um grupo de proteção para -OH, -SH, e -NH(R^H), e R^H é hidrogênio ou C₁₋₆-alquila.

20 Exemplos de grupos de proteção para -OH e -SH incluem arila substituída, tritila, tal como 4,4'-dimetoxitritilóxi (DMT), 4-monometoxitritilóxi (MMT); tritilóxi, opcionalmente substituída 9-(9-fenil)xantenilóxi (pixil), opcionalmente substituída metoxitetrahidropiranilóxi (mthp); sililóxi, tal como trimetil-sililóxi (TMS), triisopropil-sililóxi (TIPS), *terc*-butildimetil-sililóxi (TBDMS), trietil-sililóxi, fenildimetilsililóxi; *terc*-butiléteres; acetais (incluindo
25 dois grupos hidróxi); acilóxi, tal como acetila ou acetilas halogênio-substituídas, por exemplo cloroacetilóxi ou fluoroacetilóxi, isobutirilóxi, pivaloilóxi, benzoilóxi e benzoílas, metoximetilóxi (MOM), benzil éteres ou benzil éteres tal como 2,6-diclorobenzilóxi (2,6-Cl₂Bzl). Além disso, quando Z ou Z*
30 é hidroxila, eles podem ser protegidos através de fixação a um suporte sólido, opcionalmente através de um ligante.

Exemplos de grupo de proteção amina incluem fluorenilmetoxi-

carbonilamino (Fmoc), *terc*-butiloxicarbonilamino (BOC), trifluoroacetilamino, aliloxicarbonilamino (alloc, AOC), Z-benziloxicarbonilamino (Cbz), benziloxicarbonilamino substituído, tal como 2-cloro benziloxicarbonilamino (2-ClZ), monometoxitritilamino (MMT), dimetoxitritilamino (DMT), ftaloilamino, e 9-(9-fenil)xantenilamino (pixila).

O grupo de ativação, de preferência media acoplamentos a outros resíduos e/ou monômeros de nucleotídeo e, após o acoplamento ter terminado, o grupo de ativação é, tipicamente, convertido a uma ligação internucleosídeo. Exemplos de tais grupos de ativação incluem O-fosforamidita opcionalmente substituída, O-fosfotriéster opcionalmente substituído, O-fosfodiéster opcionalmente substituído, H-fosfonato opcionalmente substituído e O-fosfonato opcionalmente substituído. No presente contexto, o termo "fosforamidita" significa um grupo da fórmula $-P(OR^x)-N(R^y)_2$, em que R^x designa um grupo alquila opcionalmente substituído, por exemplo metila, 2-cianoetila, ou benzila e cada R^y designa grupos alquila opcionalmente substituídos, por exemplo etila ou isopropila ou o grupo $-N(R^y)_2$ forma um grupo morfolino ($-N(CH_2CH_2)_2O$). R^x , de preferência, designa 2-cianoetila e os dois R^y são, de preferência, idênticos e designam isopropila. Conseqüentemente, uma fosforoamidita particularmente é N,N- diisopropila -O - (2-cianoetila) fosforamidita.

Os grupos terminais preferidos são hidróxi, mercapto e amino, em particular hidróxi.

Terapia e composições farmacêuticas

Conforme explicado inicialmente, os oligonucleotídeos da invenção constituirão fármacos adequados com propriedades aperfeiçoadas. O design de um fármaco potente e seguro requer sintonização de vários parâmetros, tais como afinidade/especificidade, estabilidade em fluidos biológicos, captação celular, modo de ação, propriedades farmacocinéticas e toxicidade.

Conseqüentemente, em um outro aspecto, a presente invenção se refere a uma composição farmacêutica compreendendo um oligonucleotídeo de acordo com a invenção e um diluente, veículo ou adjuvante farma-

ceuticamente aceitável. De preferência, o referido veículo é solução salina ou solução tamponada.

Em ainda um outro aspecto, a presente invenção se refere a um oligonucleotídeo de acordo com a presente invenção para uso como um medicamento.

Conforme será compreendido, a dosagem é dependente da gravidade e responsividade do estado doentio a ser tratado e do curso de tratamento durando de vários dias a vários meses ou até que uma cura seja obtida ou uma diminuição do estado doentio seja obtida. Esquemas de dosagem ótimos podem ser calculados a partir de medições do acúmulo de fármaco no corpo do paciente. Dosagens ótimas podem variar, dependendo da potência relativa dos oligonucleotídeos individuais. Geralmente, elas podem ser estimadas baseado nas EC50s verificadas como sendo eficazes em modelos com animais *in vitro* e *in vivo*. Em geral, a dosagem é de 0,01 µg a 1 g por kg de peso corporal e pode ser fornecida uma vez ou mais ao dia, semanalmente, mensalmente ou anualmente ou mesmo uma vez a cada 2 a 10 anos ou através de infusão contínua durante horas até vários meses. As taxas de repetição para dosagem podem ser estimadas baseado nos tempos de residência medidos e nas concentrações do fármaco em fluidos corporais ou tecidos. Após tratamento com sucesso, pode ser desejável que o paciente sofra uma terapia de manutenção para prevenir a recorrência do estado doentio.

Composições farmacêuticas

Conforme indicado acima, a invenção também se refere a uma composição farmacêutica, a qual compreende pelo menos um oligonucleotídeo da invenção como um ingrediente ativo. Será compreendido que a composição farmacêutica de acordo com a invenção compreende opcionalmente um veículo farmacêutico e que a composição farmacêutico compreende opcionalmente outros compostos, tais como compostos quimioterapêuticos, compostos antiinflamatórios, compostos antivirais e/ou compostos para imunomodulação.

Os oligonucleotídeos da invenção podem ser usados "como es-

tão" ou na forma de uma variedade de sais farmacologicamente aceitáveis. Conforme usado aqui, o termo "sais farmacologicamente aceitáveis" se refere a sais que retêm a atividade biológica desejada dos oligonucleotídeos aqui acima identificados e exibem efeitos toxicológicos indesejados mínimos. Exemplos não limitativos de tais sais podem ser formados com aminoácido orgânico e sais de adição de base formados com cátions de metal, tais como zinco, cálcio bismuto, bário, magnésio, alumínio, cobre, cobalto, níquel, cádmio, sódio, potássio e semelhantes ou com um cátion formado a partir de amônia, *N,N*-dibenzietieno-diamina, *D*-glicosamina, tetraetilamônio ou etileno-diamina.

Em uma modalidade da invenção, o oligonucleotídeo pode estar na forma de um pró-fármaco. Os oligonucleotídeos são íons negativamente carregados. Em virtude da natureza lipofílica de membranas celulares, a captação celular de oligonucleotídeo é reduzida comparado com equivalentes neutros ou lipofílicos. Esse "impedimento" na polaridade pode ser evitado usando a abordagem de pró-fármaco (veja, por exemplo, Crooke, R. M. (1998) in Crooke, S. T. *Antisense research and Application*. Springer-Verlag, Berlin, Alemanha, vol. 131, páginas 103-140).

Agentes aglutinantes farmacologicamente aceitáveis e adjuvantes podem compreender parte do fármaco formulado.

Exemplos de métodos de distribuição para distribuição dos agentes terapêuticos descritos aqui, bem como detalhes de formulações farmacêuticas, sais, podem ser descritos em qualquer parte, por exemplo, nos Pedidos Provisórios U.S. 60/838,710 e 60/788,995, os quais são aqui incorporados por referência e Pedido Dinamarquês PA 2006 00615, o qual é também aqui incorporado por referência.

As composições farmacêuticas da presente invenção incluem, mas não estão limitadas a, soluções e formulações contendo lipossoma. Essas composições podem ser geradas de uma variedade de componentes que incluem, mas não estão limitados a, líquidos preformados, sólidos de auto-emulsificação e semi-sólidos de auto-emulsificação. A distribuição de fármaco ao tecido com tumor pode ser intensificada através de veículo-

mediada incluindo, mas não limitada a, lipossomas catiônicos, ciclodextrinas, derivados de porfirina, dendrímeros com cadeia ramificada, polímeros de polietilenimina, nanopartículas e microesferas (Dass CR. J Pharm Pharmacol 2002; 54(1):3-27). As formulações farmacêuticas da presente invenção, as
5 quais podem, convenientemente, ser apresentadas em uma forma de dosagem unitária, podem ser preparadas de acordo com métodos convencionais na indústria farmacêutica. Tais técnicas incluem a etapa de manterem associação os ingrediente ativos com o(s) veículo(s) farmacêutico(s) ou excipiente(s). Em geral, as formulações são preparadas mantendo em associação
10 uniforme e intimamente os ingredientes ativos com veículos líquidos ou veículos sólidos finamente divididos, ou ambos e, então, se necessário, formação do produto. As composições da presente invenção podem ser formuladas em qualquer uma de muitas formas de dosagem possíveis tais como, mas não limitado a, comprimidos, cápsulas, cápsulas de gel, xaropes líquidos,
15 géis macios e supositórios. As composições da presente invenção podem também ser formuladas como suspensões em meios aquosos, não-aquosos ou misturados. Suspensões aquosas podem ainda conter substâncias as quais aumentam a viscosidade da suspensão incluindo, por exemplo, por exemplo, carboximetil celulose de sódio, sorbitol e/ou dextrana. A sus-
20 pensão pode também conter estabilizantes. Os compostos da invenção podem também ser conjugados a substâncias de fármaco ativas, por exemplo, aspirina, ibuprofen, um fármaco de sulfa, um anti-diabético, uma antibacteriano ou um antibiótico.

Em outra modalidade, as composições da invenção podem con-
25 ter um ou mais compostos de oligonucleotídeo, objetivados a um primeiro micro-RNA e um ou mais compostos de oligonucleotídeo adicionais objetivados a um segundo micro-RNA alvo. Dois ou mais compostos combinados podem ser usados juntos ou seqüencialmente.

Os compostos divulgados aqui são úteis para uma série de apli-
30 cações terapêuticas, conforme indicado acima. Em geral, métodos terapêuticos da invenção incluem a administração de uma quantidade terapêuticamente eficaz de um oligonucleotídeo a um mamífero, particularmente um ser

humano. Em uma determinada modalidade, a presente invenção proporciona composições farmacêuticas contendo (a) um ou mais compostos da invenção e (b) um ou mais agentes quimioterapêuticos. Quando usados com os compostos da invenção, tais agentes quimioterapêuticos podem ser usados individualmente, seqüencialmente ou em combinação com um ou mais de outros desses agentes quimioterapêuticos ou em combinação com radioterapia. Todos os agentes quimioterapêuticos conhecidos por aqueles habilitados na técnica são aqui incorporados como tratamentos combinados com um composto de acordo com a invenção. Outros agentes ativos, tais como fármacos antiinflamatórios incluindo, mas não limitado a, fármacos antiinflamatórios não estereoidais e corticosteróides, fármacos antivirais e fármacos para imunomodulação, também podem ser combinados nas composições da invenção. Dois ou mais compostos combinados podem ser usados juntos ou seqüencialmente.

Exemplos de indicações terapêuticas as quais podem ser tratadas pelas composições farmacêuticas da invenção:

micro-RNA	Possíveis indicações médicas
miR-21	Glioblastoma, câncer de mama
miR-122	hipercolesterolemia, hepatite C, hemocromatose
miR-19b	Linfomas e outros tipos de tumor
miR-155	linfoma, câncer de mama e pulmão
miR-375	diabetes, distúrbios metabólicos
miR-181	Diferenciação de mioblasto, distúrbios auto-ímmunes

O mRNA do gene supressor tropomiosina 1 (TPM1) foi indicado como um miR-21 alvo. mRNA de miotropina (mtpn) foi indicado como um miR 375 alvo.

Em ainda um outro aspecto, a presente invenção se refere ao uso de um oligonucleotídeo de acordo com a invenção para a fabricação de um medicamento para o tratamento de uma doença selecionada do grupo consistindo em: aterosclerose, hipercolesterolemia e hiperlipidemia; câncer, glioblastoma, câncer de mama, linfoma, câncer de pulmão; diabetes, distúrbios metabólico; diferenciação de mioblasto; distúrbios imunes.

A invenção ainda refere-se a um oligonucleotídeo de acordo com a invenção para o uso no tratamento de uma doença selecionada do grupo consistindo em: aterosclerose, hipercolesterolemia e hiperlipidemia; câncer, glioblastoma, câncer de mama, linfoma, câncer de pulmão, diabetes, distúrbios metabólicos; diferenciação de mioblasto; distúrbios imunes.

A invenção proporciona um método de tratamento de um indivíduo sofrendo de uma doença ou condição selecionada do grupo consistindo em: aterosclerose, hipercolesterolemia e hiperlipidemia; câncer, glioblastoma, câncer de mama, linfoma, câncer de pulmão, diabetes, distúrbios metabólicos; diferenciação de mioblasto; distúrbios imunes, o método compreendendo a etapa de administração de um oligonucleotídeo ou composição farmacêutica da invenção ao indivíduo que precisa da mesma.

Câncer

Em ainda um outro aspecto, a presente invenção se refere ao uso de um oligonucleotídeo de acordo com a invenção ou um conjugado do mesmo para a fabricação de um medicamento para o tratamento de câncer. Em outro aspecto, a presente invenção se refere a um método para o tratamento de ou profilaxia contra câncer, o referido método compreendendo administração de um oligonucleotídeo da invenção ou um conjugado do mesmo ou uma composição farmacêutica da invenção a um paciente que precisa da mesma.

Tais cânceres podem incluir neoplasia linfo-reticular, leucemia linfoblástica, tumores cerebrais, tumores gástricos, plasmacitomas, mieloma múltiplo, leucemia, tumores do tecido conectivo, linfomas e tumores sólidos.

No uso de um composto da invenção ou um conjugado do mesmo para a fabricação de um medicamento para o tratamento de câncer, o referido câncer pode, adequadamente estar na forma de um tumor sólido. Analogamente, no método para tratamento de cancer divulgado aqui, o referido cancer pode, adequadamente, estar na forma de um tumor sólido.

Além disso, o referido cancer também é, adequadamente, um carcinoma. O carcinoma é, tipicamente, selecionado do grupo consistindo em melanoma maligno, carcinoma de células basais, carcinoma ovariano,

carcinoma de mama, câncer de pulmão de células não pequenas, carcinoma de células renais, carcinoma da bexiga, câncer de bexiga superficial recorrente, carcinoma de estômago, carcinoma prostático, carcinoma pancreático, carcinoma de pulmão, carcinoma cervical, displasia cervical, papilomatose laringeal, carcinoma de cólon, carcinoma colorretal e tumores sólidos. Mais tipicamente, o referido carcinoma é selecionado do grupo consistindo em melanoma maligno, câncer de pulmão de células não pequenas, carcinoma de mama, carcinoma de cólon e carcinoma de células renais. O melanoma maligno é, tipicamente, selecionado do grupo consistindo em melanoma de dispersão superficial, melanoma nodular, melanoma maligno lentigo, melanoma acral, melanoma amelanótico e melanoma desmoplástico.

Alternativamente, o câncer pode ser, adequadamente, um sarcoma. O sarcoma está, tipicamente, na forma selecionada do grupo consistindo em osteosarcoma, sarcoma de Ewing, condrosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, fibrosarcoma e sarcoma de Kaposi.

Alternativamente, o câncer pode ser, adequadamente, um glioma.

Uma outra modalidade é dirigida ao uso de um oligonucleotídeo de acordo com a invenção ou um conjugado do mesmo para a fabricação de um medicamento para o tratamento de câncer, em que o referido medicamento ainda compreende um agente quimioterapêutico selecionado do grupo consistindo em adrenocorticosteróides, tais como prednisona, dexametasona ou decadron; altretamina (Hexalen, hexametilmelamina (HMM)); amifostina (Ethyol); aminoglutetimida (Cytadren); amsacrina (M-AMSA); anastrozola (Arimidex); androgênios, tal como testosterona; asparaginase (Elspar); bacillus de Calmette-Gurin; bicalutamida (Casodex); bleomicina (blenoxano); busulfan (Myleran); carboplatina (paraplatina); carmustina (BCNU, BiCNU); clorambucila (Leukeran); clorodeoxiadenosina (2-CDA, cladribina, leustatina); cisplatina (platinol); arabinosídeo de citosina (citarabina); dacarbazina (DTIC); dactinomicina (actinomicina-D, Cosmegen); daunorubicina (cerubidina); docetaxel (taxotero); doxorubicina (adriamicina); epirubicina; estramustina (Emcyt); estrogênios, tal como dietil-estilbestrol (DES); etoposídeo (VP-16, VePesid, Etopophos); fludarabina (Fludara); flutamida (Eule-

xin); 5-FUDR (floxuridina); 5-fluorouracila (5-FU); gemcitabina (Gemzar); go-
 serelina (Zodalex); herceptina (Trastuzumab); hidróxiuréia (Hydrea); idarubi-
 cina (idamicina); ifosfamida; IL-2 (proleucina, aldesleucina); interferon alfa
 (Intron A, Roferon A); irinotecan (Camptosar); leuprolida (Lupron); levamisola
 5 (ergamisola); lomustina (CCNU); mecloratamina (Mustargen, mostarda de
 nitrogênio); melphalan (Alkeran); mercaptopurina (Purinethol, 6-MP); meto-
 trexato (mexato); mitomicina-C (mutamucina); mitoxantrona (novantrona);
 octreotida (sandostatina); pentostatina (2-deoxicoformicina, Nipent); plicami-
 cina (mitramicina, mitracina); prorocarbazina (matulano); estreptozocina; ta-
 10 moxifina (Nolvadex); taxol (Paclitaxel); teniposídeo (Vumon, VM-26); tiotepa;
 topotecan (Hycamtin); tretinoína (Vesanoid, ácido all-trans-retinóico); vinblas-
 tina (Valban); vincristina (Oncovin) e vinorelbina (Navelbine). Aequadamente,
 o referido tratamento ainda ocmpreende a administração de um outro agente
 quimioterapêutico selecionado de taxanos, tais como Taxol, Paclitaxel ou
 15 Docetaxel.

Similarmente, a invenção ainda é dirigida ao uso de um oligonu-
 cleotídeo de acordo com a invenção ou um conjugado do mesmo para a fa-
 bricação de um medicamento para o tratamento de câncer, em que o referi-
 do tratamento ainda compreende a administração de um outro agente quimi-
 20 oterapeutico selecionado do grupo consistindo em adrenocorticosteróides,
 tais como prednisona, dexametasona ou decadron; altretamina (Hexalen,
 hexametilmelamina (HMM)); amifostina (Ethyol); aminoglutetimida (Cyta-
 dren); amsacrina (M-AMSA); anastrozola (Arimidex); androgênios, tal como
 testosterona; asparaginase (Elspar); bacillus de Calmette-Gurin; bicalutami-
 25 da (Casodex); bleomicina (blenoxano); busulfan (Myleran); carboplatina (pa-
 raplatina); carmustina (BCNU, BiCNU); clorambucila (Leukeran); clorodeoxi-
 adenosina (2-CDA, cladribina, leustatina); cisplatina (platinol); arabinosídeo
 de citosina (citarabina); dacarbazina (DTIC); dactinomicina (actinomicina-D,
 Cosmegen); daunorrubicina (cerubidina); docetaxel (taxotero); doxorubicina
 30 (adriamicina); epirubicina; estramustina (Emcyt); estrogênios, tal como dietil-
 estilbestrol (DES); etoposídeo (VP-16, VePesid, Etopophos); fludarabina
 (Fludara); flutamida (Eulexin); 5-FUDR (floxuridina); 5-fluorouracila (5-FU);

gemcitabina (Gemzar); goserelina (Zodalex); herceptina (Trastuzumab); hidróxiuréia (Hydrea); idarubicina (idamicina); ifosfamida; IL-2 (proleucina, aldesleucina); interferon alfa (Intron A, Roferon A); irinotecan (Camptosar); leuprolida (Lupron); levamisola (ergamisola); lomustina (CCNU); mecloramina (Mustargen, mostarda de nitrogênio); melphalan (Alkeran); mercaptopurina (Purinethol, 6-MP); metotrexato (mexato); mitomicina-C (mutamucina); mitoxantrona (novantrona); octreotida (sandostatina); pentostatina (2-deoxicoformicina, Nipent); plicamicina (mitramicina, mitracina); prorocarbazina (matulano); estreptozocina; tamoxifina (Nolvadex); taxol (Paclitaxel); teniposídeo (Vumon, VM-26); tiotepa; topotecan (Hycamtin); tretinoína (Vesanoïd, ácido all-trans retinóico); vinblastina (Valban); vincristina (Oncovin) e vinorelbina (Navelbine). Aequadamente, o referido tratamento ainda ocm-preende a administração de um outro agente quimioterapeutico selecionado de taxanos, tais como Taxol, Paclitaxel ou Docetaxel.

15 Alternativamente estabelecido, a invenção é ainda dirigida a um método para o tratamento de câncer, o referido método compreendendo administração de um oligonucleotídeo da invenção ou um conjugado do mesmo ou uma composição farmacêutica de acordo com a invenção a um paciente que precisa da mesma e ainda compreendendo a administração de
20 um outro agente quimioterapeutico. A referida administração adicional pode ser tal que o outro agente quimioterapeutico esteja conjugado ao composto da invenção, esteja presente na composição farmacêutica ou seja administrado em uma formulação distinta.

Doenças infecciosas

25 Considera-se que os compostos da invenção podem ser amplamente aplicáveis a uma ampla faixa de doenças infecciosas, tais como difetaria, tétano, coqueluche, pólio, hepatite B, hepatitce C, hemophilus influenza, sarampo, caxumba e rubéola.

30 Hsa-miR122 é indicado em infecção por hepatite C e, como tal, o oligonucleotídeo de acordo com a invenção o qual objetiva miR-122 alvo pode ser usado para tratar infecção por hepatite C.

Conseqüentemente, em ainda outro aspecto, a presente inven-

ção se refere ao uso de um oligonucleotídeo de acordo com a invenção ou um conjugado do mesmo para a fabricação de um medicamento para o tratamento de uma doença infecciosa, bem como a um método para o tratamento de uma doença infecciosa, o referido método compreendendo administração de um oligonucleotídeo de acordo com a invenção ou um conjugado do mesmo ou uma composição farmacêutica de acordo com a invenção a um paciente que precisa da mesma.

Doenças inflamatórias

A resposta inflamatória é um mecanismo essencial de defesa do organismo contra o ataque de agentes infecciosos e também está implicada na patogênese de muitas doenças agudas e crônicas, incluindo distúrbios auto-imunes. Apesar de ser necessária para combater patógenos, os efeitos de uma explosão inflamatória podem ser devastadores. Portanto, frequentemente é necessário restringir a sintomatologia da inflamação com o uso de fármacos antiinflamatórios. A inflamação é um processo complexo normalmente disparado por lesão tecidual que inclui ativação de um grande conjunto de enzimas, o aumento na permeabilidade vascular e extravasamento de fluidos sanguíneos, migração celular e liberação de mediadores químicos, todos objetivados para destruir e reparar o tecido lesado.

Em ainda outro aspecto, a presente invenção se refere ao uso de um oligonucleotídeo de acordo com a invenção ou um conjugado do mesmo para a fabricação de um medicamento para o tratamento de uma doença inflamatória, bem como a um método para o tratamento de uma doença inflamatória, o referido método compreendendo administração de um oligonucleotídeo de acordo com a invenção ou um conjugado do mesmo ou uma composição farmacêutica de acordo com a invenção a um paciente que precisa da mesma.

Em uma modalidade preferida da invenção, a doença inflamatória é uma doença reumática e/ou uma doença do tecido conectivo, tal como artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico (SLE) ou lúpus, escleroderma, polimiosite, doença inflamatória do intestino, dermatomiosite, colite ulcerativa, doença de Crohn, vasculite, artrite psoriática, dermatite psoriática es-

foliativa, pênfigo vulgaris e síndrome de Sjorgren, em particular doença inflamatória do intestino e doença de Crohn.

Alternativamente, a doença inflamatória pode ser uma inflamação não reumática, tal como bursite, sinovite, capsulite, tendinite e/ou outras lesões inflamatórias de origem traumática e/ou esportiva.

Doenças metabólicas

Uma doença metabólica é um distúrbio causado pelo acúmulo de produtos químicos produzidos naturalmente pelo corpo. Essas doenças são usualmente graves, algumas mesmo ameaçam a vida. Outras podem diminuir o desenvolvimento físico ou causar retardo mental. A maioria dos bebês com esses distúrbios, a princípio, não mostram sinais óbvios da doença. Busca apropriada ao nascimento pode, freqüentemente, descobrir esses problemas. Com diagnóstico e tratamento precoces, as doenças metabólicas podem ser freqüentemente tratadas eficazmente.

Em ainda outro aspecto, a presente invenção se refere ao uso de um oligonucleotídeo de acordo com a invenção ou um conjugado do mesmo para a fabricação de um medicamento para o tratamento de uma doença metabólica, bem como a um método para o tratamento de uma doença metabólica, o referido método compreendendo administração de um oligonucleotídeo de acordo com a invenção ou um conjugado do mesmo ou uma composição farmacêutica de acordo com a invenção a um paciente que precisa da mesma.

Em uma modalidade preferida da invenção, a doença metabólica é selecionada do grupo consistindo em Amiloidose, Biotinidase, OMIM (Hereditariedade Mendelina Online no Homem), síndrome de Crigler Najjar, Diabetes, Grupo de Suporte & Informação de Fabry, distúrbios de oxidação de ácido graxo, Galactosemia, deficiência de desidrogenase de glicose-6-fosfato (G6PD), aciduria glutárica, Organização Internacional de Acidemia Glutárica, Acidemia glutárica do tipo I, Acidemia glutárica do tipo II, acidemia glutárica do tipo I, acidemia glutárica do tipo II, Hipofosfatemia familiar F-HYPDRR, Rickets resistente à vitamina D, doença de Krabbe, deficiência de desidrogenase de 3 hidroxiacil CoA de cadeia longa (LCHAD), grupos com

Manosidose, doença urinária de xarope de bordo, distúrbios mitocondriais, síndromes de mucopolissacaridose: Niemann Pick, acidemias orgânicas, PKU, doença de Pompe, Porfíria, síndrome metabólica, Hiperlipidemia e distúrbios de lipídios hereditários, Trimetilaminúria: a síndrome do mal-odor de peixe e distúrbios do ciclo de uréia.

Distúrbios do fígado

Em ainda outro aspecto, a presente invenção se refere ao uso de um oligonucleotídeo de acordo com a invenção ou um conjugado do mesmo para a fabricação de um medicamento para o tratamento de um distúrbio do fígado, bem como a um método para o tratamento de um distúrbio do fígado, o referido método compreendendo administração de um oligonucleotídeo de acordo com a invenção ou um conjugado do mesmo ou uma composição farmacêutica de acordo com a invenção a um paciente que precisa da mesma.

Em uma modalidade preferida da invenção, o distúrbio do fígado é selecionado do grupo consistindo em atresia biliar, síndrome de Alagille, Alfa-1 Antitripsina, Tirosinemia, hepatite neonatal e doença de Wilson.

Outros usos

Os oligonucleotídeos da presente invenção podem ser utilizados como reagentes de pesquisa para produtos diagnósticos, terapêuticos e profiláticos. Em pesquisa, o oligonucleotídeo pode ser usado para inibir especificamente a síntese de genes alvo em células e animais experimentais, desse modo, facilitando a análise funcional do alvo ou uma apreciação de sua utilidade como um alvo para intervenção terapêutica. Em diagnóstico, os oligonucleotídeos podem ser usados para detectar e quantificar expressão do alvo em células e tecidos através de Northern blotting, hibridização *in situ* ou técnicas similares. Para produtos terapêuticos, um animal ou ser humano suspeito de ter uma doença ou distúrbio, o qual pode ser tratado através de modulação da expressão do alvo, é tratado através de administração dos compostos de oligonucleotídeo de acordo com a presente invenção. Ainda proporcionados são métodos de tratamento de um animal, em particular camundongo e rato, e tratamento de um ser humano suspeito de ter ou estar

propenso a ter uma doença ou condição associada à expressão do alvo através de administração de uma quantidade terapêutica ou profilaticamente eficaz de um ou mais dos compostos ou composições de oligonucleotídeo da invenção.

5 Uso terapêutico de oligonucleotídeo objetivando miR-122a

Na seção exemplos, é demonstrado que um LNA-antimiR[®], tal como SPC3372, objetivando miR-122a, reduz os níveis de colesterol no plasma. Portanto, outro aspecto da invenção é o uso do oligonucleotídeo acima descrito objetivando miR-122a como um medicamento.

10 Ainda outro aspecto da invenção é o uso do oligonucleotídeo descrito acima objetivando miR-122a para o preparo de um medicamento para o tratamento de níveis aumentados de colesterol no plasma. Aqueles habilitados na técnica apreciarão que níveis aumentados de colesterol no plasma são indesejáveis, uma vez que isso aumenta o risco de várias condi-
15 ções, por exemplo, aterosclerose.

Ainda outro aspecto da invenção é o uso do oligonucleotídeo acima descrito que objetiva miR-122a para super-regulação dos níveis de mRNA de Nrdg3, Aldo A, Bckdk ou CD320.

Outras modalidades:

20 As modalidades a seguir podem ser combinadas com as outras modalidades da invenção, conforme descrito aqui.

1. Um oligonucleotídeo tendo um comprimento de 12 a 26 nucleotídeos tendo uma seqüência de DNA central das posições dois a sete ou das posições três a oito, contando a partir da extremidade 3': acgttt, em que
25 pelo menos uma, tal como uma, de preferência pelo menos duas, tal como duas ou três unidades de DNA na referida seqüência foram substituídas por sua unidade de LNA correspondente; ou um conjugado do mesmo.

2. Um oligonucleotídeo tendo um comprimento de 12 a 26 nucleotídeos tendo uma seqüência de DNA central das posições dois a sete ou
30 das posições três a oito, contando a partir da extremidade 3': ctcaca, em que pelo menos uma, tal como uma, de preferência pelo menos duas, tal como duas ou três unidades de DNA na referida seqüência foram substituídas por

sua unidade de LNA correspondente; ou um conjugado do mesmo.

3. Um oligonucleotídeo tendo um comprimento de 12 a 26 nucleotídeos tendo uma seqüência de DNA central das posições dois a sete ou das posições três a oito, contando a partir da extremidade 3': ttacga, em que pelo menos uma, tal como uma, de preferência pelo menos duas, tal como duas ou três unidades de DNA na referida seqüência foram substituídas por sua unidade de LNA correspondente; ou um conjugado do mesmo.

4. Um oligonucleotídeo tendo um comprimento de 12 a 26 nucleotídeos tendo uma seqüência de DNA central das posições dois a sete ou das posições três a oito, contando a partir da extremidade 3': acaagc; em que pelo menos uma, tal como uma, de preferência pelo menos duas, tal como duas ou três unidades de DNA na referida seqüência foram substituídas por sua unidade de LNA correspondente; ou um conjugado do mesmo.

5. O oligonucleotídeo de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 4 ou um conjugado do mesmo, em que pelo menos duas, tal como duas ou três unidades de DNA das posições um a seis, dois a sete ou três a oito, contando a partir da extremidade 3', foram substituídas por sua unidade de LNA correspondente e em que as unidades de LNA são separadas por pelo menos uma unidade de DNA.

6. O oligonucleotídeo de acordo com a modalidade 5 ou um conjugado do mesmo, em que o número de unidades de DNA consecutivas das posições um a seis, dois a sete ou três a oito, contando a partir da extremidade 3', é de no máximo dois.

7. O oligonucleotídeo de acordo com a modalidade 6 ou um conjugado do mesmo, em que cada segundo nucleotídeo das posições um a seis, dois a sete ou três a oito, contando a partir da extremidade 3', é uma unidade de LNA.

8. O oligonucleotídeo de acordo com a modalidade 6 ou um conjugado do mesmo, em que cada terceiro nucleotídeo das posições um a seis, dois a sete ou três a oito, contando a partir da extremidade 3', é uma unidade de LNA.

9. O oligonucleotídeo de acordo com a modalidade 6 ou um con-

jugado do mesmo, em que o padrão de substituição para os nucleotídeos nas posições um a seis, dois a sete ou três a oito, contando a partir da extremidade 3', é selecionado do grupo consistindo em: X, x, x, x, x, X, x, X, e X; em que "X" denota uma unidade de LNA e "x" denota uma unidade de DNA.

10 10. O oligonucleotídeo de acordo com a modalidade 9 ou um conjugado do mesmo, em que o padrão de substituição para os nucleotídeos nas posições um a seis, dois a sete ou três a oito, contando a partir da extremidade 3', é selecionado do grupo consistindo em X, x, x, X, e x; em que "X" denota uma unidade de LNA e "x" denota uma unidade de DNA.

15 11. O oligonucleotídeo de acordo com a modalidade 1 ou um conjugado do mesmo tendo uma seqüência de DNA das posições um a sete, dois a oito ou três a nove, contando a partir da extremidade 3': acgttta, em que pelo menos uma, tal como uma, de preferência pelo menos duas, tal como duas, mais preferivelmente pelo menos três, tal como três ou quatro unidades de DNA na referida seqüência foram substituídas por sua unidade de LNA correspondente.

20 12. O oligonucleotídeo de acordo com a modalidade 2 ou um conjugado do mesmo tendo uma seqüência de DNA das posições um a sete, dois a oito ou três a nove, contando a partir da extremidade 3': ctcacac, em que pelo menos uma, tal como uma, de preferência pelo menos duas, tal como duas, mais preferivelmente pelo menos três, tal como três ou quatro unidades de DNA na referida seqüência foram substituídas por sua unidade de LNA correspondente.

25 13. O oligonucleotídeo de acordo com a modalidade 3 ou um conjugado do mesmo tendo uma seqüência de DNA das posições um a sete, dois a oito ou três a nove, contando a partir da extremidade 3': ttacgat, em que pelo menos uma, tal como uma, de preferência pelo menos duas, tal como duas, mais preferivelmente pelo menos três, tal como três ou quatro unidades de DNA na referida seqüência foram substituídas por sua unidade de LNA correspondente.

30 14. O oligonucleotídeo de acordo com a modalidade 4 ou um

conjugado do mesmo tendo uma seqüência de DNA das posições um a sete, dois a oito ou três a nove, contando a partir da extremidade 3': acaagca, em que pelo menos uma, tal como uma, de preferência pelo menos duas, tal como duas, mais preferivelmente pelo menos três, tal como três ou quatro unidades de DNA na referida seqüência foram substituídas por sua unidade de LNA correspondente.

15. O oligonucleotídeo de acordo com qualquer uma das modalidades 11 a 14 ou um conjugado do mesmo, em que pelo menos duas, tal como duas, três ou quatro unidades de DNA das posições um a sete, dois a oito ou três a nove, contando a partir da extremidade 3', foram substituídas por sua unidade de LNA correspondente e em que as unidades de LNA são separadas por pelo menos uma unidade de DNA.

16. O oligonucleotídeo de acordo com a modalidade 15 ou um conjugado do mesmo, em que o número de unidades de DNA consecutivas das posições um a sete, dois a oito ou três a nove, contando a partir da extremidade 3', é de no máximo dois.

17. O oligonucleotídeo de acordo com a modalidade 16 ou um conjugado do mesmo, em que cada segundo nucleotídeo das posições um a sete, dois a oito ou três a nove, contando a partir da extremidade 3', é uma unidade de LNA.

18. O oligonucleotídeo de acordo com a modalidade 16 ou um conjugado do mesmo, em que cada terceiro nucleotídeo das posições um a sete, dois a oito ou três a nove, contando a partir da extremidade 3', é uma unidade de LNA.

19. O oligonucleotídeo de acordo com a modalidade 16 ou um conjugado do mesmo, em que o padrão de substituição para os nucleotídeos nas posições um a sete, dois a oito ou três a nove, contando a partir da extremidade 3', é selecionado do grupo consistindo em Xx, e xX; em que "X" denota uma unidade de LNA e "x" denota uma unidade de DNA.

20. O oligonucleotídeo de acordo com a modalidade 19 ou um conjugado do mesmo, em que o padrão de substituição para os nucleotídeos

nas posições um a sete, dois a oito ou três a nove, contando a partir da extremidade 3', é selecionado do grupo consistindo em Xx, xx, xX, Xx, xX, e xx; em que "X" denota uma unidade de LNA e "x" denota uma unidade de DNA.

21. O oligonucleotídeo de acordo com a modalidade 11 ou um
5 conjugado do mesmo tendo uma seqüência de DNA das posições um a oito, dois a nove ou três a dez, contando a partir da extremidade 3': acgtttag, em que pelo menos uma, tal como uma, de preferência pelo menos duas, tal como duas, mais preferivelmente pelo menos três, tal como três ou quatro unidades de DNA na referida seqüência foram substituídas por sua unidade
10 de LNA correspondente.

22. O oligonucleotídeo de acordo com a modalidade 12 ou um
conjugado do mesmo tendo uma seqüência de DNA das posições um a oito, dois a nove ou três a dez, contando a partir da extremidade 3': ctcacact, em que pelo menos uma, tal como uma, de preferência pelo menos duas, tal
15 como duas, mais preferivelmente pelo menos três, tal como três ou quatro unidades de DNA na referida seqüência foram substituídas por sua unidade de LNA correspondente.

23. O oligonucleotídeo de acordo com a modalidade 13 ou um
conjugado do mesmo tendo uma seqüência de DNA das posições um a oito,
20 dois a nove ou três a dez, contando a partir da extremidade 3': ttacgatt, em que pelo menos uma, tal como uma, de preferência pelo menos duas, tal como duas, mais preferivelmente pelo menos três, tal como três ou quatro unidades de DNA na referida seqüência foram substituídas por sua unidade de LNA correspondente.

25 24. O oligonucleotídeo de acordo com a modalidade 14 ou um conjugado do mesmo tendo uma seqüência de DNA das posições um a oito, dois a nove ou três a dez, contando a partir da extremidade 3': acaagcaa, em que pelo menos uma, tal como uma, de preferência pelo menos duas, tal como duas, mais preferivelmente pelo menos três, tal como três ou quatro
30 unidades de DNA na referida seqüência foram substituídas por sua unidade de LNA correspondente.

25. O oligonucleotídeo de acordo com qualquer uma das moda-

lidades 21 to 24 ou um conjugado do mesmo, em que pelo menos duas, tal como duas, três ou quatro unidades de DNA das posições um a oito, dois a nove ou três a dez, contando a partir da extremidade 3', foram substituídas por sua unidade de LNA correspondente e em que as unidades de LNA são
5 separadas por pelo menos uma unidade de DNA.

26. O oligonucleotídeo de acordo com a modalidade 25 ou um conjugado do mesmo, em que o número de unidades de DNA consecutivas das posições um a oito, dois a nove ou três a dez, contando a partir da extremidade 3', é de no máximo dois.

10 27. O oligonucleotídeo de acordo com a modalidade 26 ou um conjugado do mesmo, em que cada segundo nucleotídeo das posições um a oito, dois a nove ou três a dez, contando a partir da extremidade 3', é uma unidade de LNA.

15 28. O oligonucleotídeo de acordo com a modalidade 26 ou um conjugado do mesmo, em que cada terceiro nucleotídeo das posições um a oito, dois a nove ou três a dez, contando a partir da extremidade 3', é uma unidade de LNA.

20 29. O oligonucleotídeo de acordo com a modalidade 26 ou um conjugado do mesmo, em que o padrão de substituição para os nucleotídeos nas posições um a oito, dois a nove ou três a dez, contando a partir da extremidade 3', é selecionado do grupo consistindo em Xxx, e xXx; em que "X" denota uma unidade de LNA e "x" denota uma unidade de DNA.

25 30. O oligonucleotídeo de acordo com a modalidade 29 ou um conjugado do mesmo, em que o padrão de substituição para os nucleotídeos nas posições um a oito, dois a nove ou três a dez, contando a partir da extremidade 3', é selecionado do grupo consistindo em Xxx, xxX, xXx, XxX, xXx, e xxX; em que "X" denota uma unidade de LNA e "x" denota uma unidade de DNA.

30 31. O oligonucleotídeo de acordo com a modalidade 21 ou um conjugado do mesmo tendo uma seqüência de DNA das posições um a nove, dois a dez ou três a onze, contando a partir da extremidade 3': acgttagg,

em que pelo menos uma, tal como uma, de preferência pelo menos duas, tal como duas, mais preferivelmente pelo menos três, tal como três, ainda mais preferivelmente pelo menos quatro, tal como quatro ou cinco unidades de DNA na referida seqüência foram substituídas por sua unidade de LNA correspondente.

5
32. O oligonucleotídeo de acordo com a modalidade 22 ou um conjugado do mesmo tendo uma seqüência de DNA das posições um a nove, dois a dez ou três a onze, contando a partir da extremidade 3': ctcacactg, em que pelo menos uma, tal como uma, de preferência pelo menos duas, tal como duas, mais preferivelmente pelo menos três, tal como três, ainda mais preferivelmente pelo menos quatro, tal como quatro ou cinco unidades de DNA na referida seqüência foram substituídas por sua unidade de LNA correspondente.

10
33. O oligonucleotídeo de acordo com a modalidade 23 ou um conjugado do mesmo tendo uma seqüência de DNA das posições um a nove, dois a dez ou três a onze, contando a partir da extremidade 3': ttacgatta, em que pelo menos uma, tal como uma, de preferência pelo menos duas, tal como duas, mais preferivelmente pelo menos três, tal como três, ainda mais preferivelmente pelo menos quatro, tal como quatro ou cinco unidades de DNA na referida seqüência foram substituídas por sua unidade de LNA correspondente.

15
34. O oligonucleotídeo de acordo com a modalidade 24 ou um conjugado do mesmo tendo uma seqüência de DNA das posições um a nove, dois a dez ou três a onze, contando a partir da extremidade 3': acaagcaag, em que pelo menos uma, tal como uma, de preferência pelo menos duas, tal como duas, mais preferivelmente pelo menos três, tal como três, ainda mais preferivelmente pelo menos quatro, tal como quatro ou cinco unidades de DNA na referida seqüência foram substituídas por sua unidade de LNA correspondente.

25
30
35. O oligonucleotídeo de acordo com qualquer uma das modalidades 21 to 24 ou um conjugado do mesmo, em que pelo menos duas, tal como duas, três, quatro ou cinco unidades de DNA das posições um a nove,

dois a dez ou três a onze, contando a partir da extremidade 3', foram substituídas por sua unidade de LNA correspondente e em que as unidades de LNA são separadas por pelo menos uma unidade de DNA.

36. O oligonucleotídeo de acordo com a modalidade 35 ou um
5 conjugado do mesmo, em que o número de unidades de DNA consecutivas das posições um a nove, dois a dez ou três a onze, contando a partir da extremidade 3', é de no máximo dois.

37. O oligonucleotídeo de acordo com a modalidade 36 ou um
10 conjugado do mesmo, em que cada segundo nucleotídeo das posições um a nove, dois a dez ou três a onze, contando a partir da extremidade 3', é uma unidade de LNA.

38. O oligonucleotídeo de acordo com a modalidade 36 ou um
15 conjugado do mesmo, em que cada terceiro nucleotídeo das posições um a nove, dois a dez ou três a onze, contando a partir da extremidade 3', é uma unidade de LNA.

39. O oligonucleotídeo de acordo com a modalidade 36 ou um
20 conjugado do mesmo, em que o padrão de substituição para os nucleotídeos nas posições um a nove, dois a dez ou três a onze, contando a partir da extremidade 3', é selecionado do grupo consistindo em XxxX, e xXxX; em que "X" denota uma unidade de LNA e "x" denota uma unidade de DNA.

40. O oligonucleotídeo de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes ou um conjugado do mesmo, em que o referido nucleotídeo tem um comprimento de 12 a 24 nucleotídeos, tal como um comprimento de 12 a 22 nucleotídeo, de preferência um comprimento de 12 a 20 nucleotídeos, tal como um comprimento de 12 a 19 nucleotídeos, mais preferivelmente um comprimento de 12 a 18 nucleotídeos, tal como um comprimento de 12 a 17 nucleotídeos, ainda mais preferivelmente um comprimento
30 de 12 a 16 nucleotídeos.

41. O oligonucleotídeo de acordo com a modalidade 1 tendo uma seqüência selecionada do grupo consistindo em tg^{Me}CatGgaTttGca^{Me}

Ca, tg^{Me}CatGgaTttGca^{Me}C, ^{Me}CatGgaTttGca^{Me}C, tGcAtGgAtTtGcAc, cAtGgAtTtGcAc, ^{Me}CatGGatTtGca^{Me}C, Tg^{Me}CatGGatTtGca^{Me}C, e Tg^{Me}CaTgGaTTtGcACa; em que a letra minúscula identifica a base nitrogenosa de uma unidade de DNA e uma letra maiúscula identifica a base nitrogenosa de uma unidade de LNA; ou um conjugado do mesmo. (SEQ IDs NO 82-89)

42. O oligonucleotídeo de acordo com a modalidade 2 tendo uma seqüência selecionada do grupo consistindo em c^{Me}CatTgtCacAct^{Me}Cca, c^{Me}CatTgtAacTct^{Me}Cca, ccAttGtcAca^{Me}Ctc^{Me}Ca, c^{Me}CatTgt^{Me}CacAct^{Me}Cc, atTgt^{Me}CacAct^{Me}Cc, ccAttGtcAca^{Me}Ctc^{Me}C, AttGtcAca^{Me}Ctc^{Me}C, aTtGt^{Me}CaCa^{Me}Ct^{Me}Cc, AttGTca^{Me}Ca^{Me}Ct^{Me}C^{Me}C, ^{Me}CcAttGTca^{Me}Ca^{Me}Ct^{Me}C^{Me}C, ^{Me}CcCaTtgTcacActc^{Me}Ca, e ^{Me}C^{Me}CAttgtcacact^{Me}C^{Me}Ca; em que a letra minúscula identifica a base nitrogenosa de uma unidade de DNA e uma letra maiúscula identifica a base nitrogenosa de uma unidade de LNA; ou um conjugado do mesmo. (SEQ IDs NO 90-101)

43. O oligonucleotídeo de acordo com a modalidade 3 tendo uma seqüência selecionada do grupo consistindo em t^{Me}CacGatTag^{Me}CatTaa, aTca^{Me}CgaTtaGcaTta, TcAcGaTtAg^{Me}CaTtAa, AtcAcGaTtAg^{Me}CaTta; em que a letra minúscula identifica a base nitrogenosa de uma unidade de DNA e uma letra maiúscula identifica a base nitrogenosa de uma unidade de LNA; ou um conjugado do mesmo. (SEQ IDs NO 102-105).

44. O oligonucleotídeo de acordo com a modalidade 4 tendo uma seqüência selecionada do grupo consistindo em gAgc^{Me}CgaAcgAacAa, gc^{Me}CgaAcgAacAa, GaGc^{Me}CgAa^{Me}CgAa^{Me}CaA, e Gc^{Me}CgAa^{Me}CgAa^{Me}CaA; em que a letra minúscula identifica a base nitrogenosa de uma unidade de DNA e uma letra maiúscula identifica a base nitrogenosa de uma unidade de LNA; ou um conjugado do mesmo. (SEQ IDs NO 106-109).

45. O oligonucleotídeo de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes ou um conjugado do mesmo, em que o oligonucleotídeo compreende pelo menos um grupo de ligação internucleosídeo o qual difere de fosfodiéster.

46. O oligonucleotídeo de acordo com a modalidade 45 ou um conjugado do mesmo, em que o referido grupo de ligação internucleosídeo o

qual difere de fosfodiéster é fosforotioato.

47. O oligonucleotídeo de acordo com a modalidade 46 ou um conjugado do mesmo, em que todos os grupos de ligação internucleosídeo são fosforotioato.

5 48. O oligonucleotídeo de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes ou um conjugado do mesmo, em que as referidas unidades de LNA são independentemente selecionadas do grupo consistindo em unidades de tio-LNA, unidades de amino-LNA e unidades de óxi-LNA.

10 49. O oligonucleotídeo de acordo com a modalidade 48 ou um conjugado do mesmo, em que as referidas unidades de LNA estão na forma beta-D.

50. O oligonucleotídeo de acordo com a modalidade 48 ou um conjugado do mesmo, em que as referidas unidades de LNA são unidades de óxi-LNA na forma beta-D.

15 51. O oligonucleotídeo de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes ou um conjugado do mesmo para uso como um medicamento.

20 52. Uma composição farmacêutica compreendendo um oligonucleotídeo de acordo com qualquer uma das modalidades 1-50 ou um conjugado do mesmo e um veículo farmacêuticamente aceitável.

53. A composição de acordo com a modalidade 52, em que o referido veículo é solução salina ou solução salina tamponada.

25 54. Uso de um oligonucleotídeo de acordo com qualquer uma das modalidades 1-50 ou um conjugado do mesmo ou uma composição de acordo com a modalidade 52 para a fabricação de um medicamento para o tratamento de câncer.

30 55. Método para o tratamento de câncer compreendendo a etapa de administração de um oligonucleotídeo de acordo com qualquer uma das modalidades 1-50 ou um conjugado do mesmo ou uma composição de acordo com a modalidade 52.

56. Uso de um oligonucleotídeo de acordo com qualquer uma das modalidades 1-50 ou um conjugado do mesmo ou uma composição de

acordo com a modalidade 52 para o preparo de um medicamento para o tratamento de níveis aumentados de colesterol no plasma.

57. Uso de um oligonucleotídeo de acordo com qualquer uma das modalidades 1-50 ou um conjugado do mesmo ou uma composição de acordo com a modalidade 52 para super-regulação dos níveis de mRNA de Nrdg3, Aldo A, Bckdk ou CD320.

EXPERIMENTAL

Exemplo 1: Síntese de monômero

Os blocos de construção monoméricos de LNA e derivados dos mesmos foram preparados seguindo procedimentos publicados e referências citadas nos mesmos; veja, por exemplo, WO 03/095467 A1 e D. S. Pedersen, C. Rosenbohm, T. Koch (2002) Preparation of LNA Phosphoramidites, Synthesis 6, 802-808.

Exemplo 2: Síntese de oligonucleotídeo

Oligonucleotídeos foram sintetizados usando a abordagem como fosforoamidita sobre um sintetizador Expedite 8900/MOSS (Multiple Oligonucleotide Synthesis System) em uma escala de 1 μ mol ou 15 μ moles. Para síntese em larga escala, um Äkta Oligo Pilot (GE Healthcare) foi usado. Ao final da síntese (DMT-on), os oligonucleotídeos foram clivados do suporte sólido usando amônia aquosa durante 1-2 horas em temperatura ambiente e ainda desprotegidos durante 4 horas a 65°C. Os oligonucleotídeos foram purificados através de HPLC de fase reversa HPLC (RP-HPLC). Após remoção do grupo DMT, os oligonucleotídeos foram caracterizados através de AE-HPLC, RP-HPLC e CGE e a massa molecular foi ainda confirmada através de ESI-MS. Veja abaixo para maiores detalhes.

Preparação do suporte sólido de LNA:

Preparação do hemiéster de succinila de LNA

Monômero de 5'-O-Dmt-3'-hidróxi-LNA (500 mg), anidrido succínico (1,2 eq.) e DMAP (1,2 eq.) foram dissolvidos em DCM (35 mL). A reação foi agitada em temperatura ambiente durante a noite. Após extrações com NaH_2PO_4 a 0,1 M, pH de 5,5 (2x) e salmoura (1x), a camada orgânica foi ainda seca com Na_2SO_4 anídrico, filtrada e evaporada. O derivado de

hemi-éster foi obtido em um rendimento de 95% e foi usado sem qualquer outra purificação.

Preparação do LNA-suporte

O derivado de hemiéster preparado acima (90 μ moles) foi dissolvido em uma quantidade mínima de DMF, DIEA e pyBOP (90 μ moles) foram adicionados e misturados juntos durante 1 min. Essa mistura pré-ativada foi combinada com LCAA-CPG (500 Å, tamanho de malha de 80-120, 300 mg) em um sintetizador manual e agitada. Após 1,5 hora em temperatura ambiente, o suporte foi filtrado e lavado com DMF, DCM e MeOH. Após secagem, o carregamento foi determinado como sendo de 57 μ moles/g (veja Tom Brown, Dorcas J.S. Brown. Modern machine-aided methods of oligodeoxyribonucleotide synthesis. Em: F. Eckstein, editor. Oligonucleotides and Analogues A Practical Approach. Oxford: IRL Press, 1991: 13-14).

Alongamento do oligonucleotídeo

O acoplamento de fosforoamiditas (A(bz), G(ibu), 5-metil-C(bz)) ou T- β -cianoetilfosforoamidita) é realizado usando uma solução de 0,1 M da amidita 5'-O-DMT-protégida em acetonitrilo e DCI (4,5-dicianoimidazola) em acetonitrilo (0,25 M) como ativador. A tiação é realizada usando cloreto de xantano (0,01 M em acetonitrilo:piridina a 10%). O resto dos reagentes são aqueles tipicamente usados para síntese de oligonucleotídeo.

Purificação através de RP-HPLC:

Coluna:	Xterra	RP ₁₈
Taxa de fluxo:	3	mL/min

Tampões: acetato de amônio a 0,1 M, pH de 8, e acetonitrila

25 Abreviações:

DMT:	Dimetoxitritila
DCI:	4,5-Dicianoimidazol
DMAP:	4-Dimetilaminopiridina
DCM:	Diclorometano
30 DMF:	Dimetilformamida
THF:	Tetrahidrofurano
DIEA:	<i>N,N</i> -diisopropiletilamina

PyBOP: Hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-óxi-tris-pirrolidino-fosfônio

Bz: Benzoíla

Ibu: Isobutirila

Exemplo 3: Design do oligonucleotídeo de LNA anti-miR e temperaturas de fusão

Micro-RNA alvo:

miR-122a: 5'-uggagugugacaauggguguuugu-3' SEQ ID NO: 1

miR-122a 3' a 5': 3'-uguuugugguaacagugugaggu-5' (SEQ ID NO: 1 orientação reversa)

10 Tabela 1: seqüências de oligonucleotídeo de LNA anti-miR e T_m:

SEQ ID NO:	Oligo ID		SEQ ID	Seqüência:		T _m (°C)
2	SPC3370	XxxX design	SEQ ID 56	5'-cCatTgtCacActCca-3'	Estrutura principal de PS	75
3	SPC3372	XxxX design	SEQ ID 57	5'-ccAttGtcAcaCtcCa-3'	Estrutura principal de PS	69
4	SPC3375	Gap-mero	SEQ ID 58	5'-CCAttgtcacacTCCa-3'	Estrutura principal de PS	69
5	SPC3549	15-mero	SEQ ID 59	5'-CcAttGTcaCaCtCC-3'	Estrutura principal de PS	78
6	SPC3550	Controle de combinação errônea	SEQ ID 60	5'-CcAtt <u>C</u> TgaCc <u>C</u> t <u>A</u> C-3'	Estrutura principal de PS	32
7	SPC3373	Controle de combinação errônea	SEQ ID 61	5'-ccAttGtc <u>T</u> ca <u>A</u> tcCa-3'	Estrutura principal de PS	46
8	SPC3548	13-mero	SEQ ID 62	5'-AttGTcaCaCtCC-3'	Estrutura principal de PS	

Letra minúscula: DNA, letra maiúscula: LNA (todos as C do LNA foram metiladas), sublinhado: combinação errônea.

As temperaturas de fusão foram avaliadas com relação à seqüência de miR-122a maduro, usando um oligonucleotídeo de RNA de miR-

122a sintético com ligação de fosforotioato.

O anti-miR da dupla LNA/miR-122a oligo foi diluído para 3 μM em 500 μl de H_2O isenta de RNase a qual foi, então, misturada com 500 μl de 2x tampão de dimerização (concentração final de oligo/dupla de 1,5 μM ,
5 2x tampão de T_m : NaCl a 200 mM, EDTA a 0,2 mM, NaP a 20 mM, pH de 7,0, tratada com DEPC para remover RNases). A mistura foi primeiro aquecida para 95 graus durante 3 minutos, então, deixada esfriar para a temperatura ambiente (RT) durante 30 minutos.

Após incubação em RT, a T_m foi medida sobre um Lambda 40
10 UV/VIS Spectrophotometer com um programador de temperatura Peltier PTP6 usando o software PE Templab (Perkin Elmer). A temperatura foi elevada de 20°C para 95°C e, então, diminuída novamente para 20°C, registrando continuamente a absorção a 260 nm. Primeiro derivado e máximos locais da temperatura de fusão e anelamento foram usados para avaliar o
15 ponto de fusão/anelamento (T_m), ambos proporcionando valores de T_m similares/semelhantes. Para o primeiro derivado, 91 pontos foram usados para calcular o declínio.

Substituindo o oligonucleotídeo antimir e a molécula de RNA complementar, o ensaio acima pode ser usado para determinar a T_m de outros oligonucleotídeos, tais como os oligonucleotídeos de acordo com a invenção.
20

Contudo, em uma modalidade, a T_m pode ser feita com uma molécula de DNA complementar (ligação de fosforotioato). Tipicamente, a T_m medida contra uma molécula complementar de DNA é cerca de 10°C menor
25 do que a T_m com um complemento de RNA equivalente. A T_m medida usando o complemento de DNA pode, portanto, ser usada em casos onde a dupla tem uma T_m muito alta.

Medições da temperatura de fusão (T_m):

Oligo ao complemento de RNA de miR-122	T_m
SPC3372 + miR-122a, RNA	69°C
SPC3648 + miR-122a, RNA	74°C
SPC3649 + miR-122a, RNA	79°C

oligo ao complemento de DNA	T_m
SPC3372 + 122R, DNA	57 °C
SPC3649 + 122R, DNA	66 °C

É reconhecido que, para oligonucleotídeos com T_m muito alta, os ensaios de T_m acima podem ser insuficientes para determinar a T_m . Em tal caso, o uso de uma molécula complementar de DNA fosforotioada pode diminuir adicionalmente a T_m .

O uso de formamida é rotina na análise de hibridização de oligonucleotídeo (veja Hutton 1977, NAR 4 (10) 3537-3555). No ensaio acima, a inclusão de formamida a 15%, tipicamente, diminui a T_m em cerca de 9°C e a inclusão de formamida a 50%, tipicamente, diminui a T_m em cerca de 30°C. Usando essas proporções, portanto, é possível determinar a T_m comparativa de um oligonucleotídeo contra sua molécula de RNA complementar (fosfodiéster), mesmo quando a T_m da dupla é, por exemplo, maior do que 95°C (na ausência de formamida).

Para oligonucleotídeos com uma T_m muito alta, um método alternativo de determinação da T_m é fazer titulações e operar sobre um gel para observar fita única versus dupla e, através dessas concentrações e proporções, determinar a K_d (a constante de dissociação) a qual está relacionada a ΔG e também à T_m .

Exemplo 4: Estabilidade de oligonucleotídeos de LNA em plasma humano ou de rato

A estabilidade do oligonucleotídeo de LNA foi testada em plasma de seres humanos ou rato (poderia ser também plasma de camundongo, macaco ou cão). Em 45 μ l de plasma, 5 μ l de oligonucleotídeo de LNA são adicionados (em uma concentração final de 20 μ M). Os oligonucleotídeos de

LNA são incubados em plasma durante tempos oscilando de 0 a 96 horas a 37 °C (o plasma é testado com relação à atividade de nuclease durante até 96 horas e não mostra diferença no padrão de clivagem de nuclease).

No tempo indicado, a amostra foi congelada em nitrogênio líquido. 2 µL (igual a 40 pmoles) de oligonucleotídeo de LNA no plasma foram diluídos através da adição de 15 µL de água e 3 µL 6x corante de carregamento (Invitrogen). Como marcador, um ladder de 10 bp (Invitrogen, EUA 10821-015) é usado. A 1 µl de ladder, 1 µl de 6x tampão da carregamento e 4 µl de água são adicionados. As amostras são misturadas, aquecidas para 65 °C durante 10 min e carregadas a um gel de pré-operação (acrilamida a 16%, UREIA a 7 M, 1x TBE, pré-operado a 50 Watt durante 1 h) e operado a 50-60 Watt durante 2½ horas. Subseqüentemente, o gel é corado com 1x SyBR gold (Molecular Probes) em 1x TBE durante 15 min. As bandas são visualizadas usando o Phosphoimager da BioRad.

15 Exemplo 5: Modelo *in vitro*: Cultura de célula

O efeito de oligonucleotídeos de LNA sobreexpressão do ácido nucléico alvo (quantidade) pode ser testado em qualquer um de uma variedade de tipos de célula, contanto que o ácido nucléico alvo esteja presente em níveis mensuráveis. O alvo pode ser expresso endogenamente ou através de transfecção transitória ou estável de um ácido nucléico que codifica o referido ácido nucléico.

O nível de expressão de ácido nucléico alvo pode ser rotineiramente determinado usando, por exemplo, análise de Northern blot (incluindo Northern de micro-RNA), PCR Quantitativa (incluindo qPCR de micro-RNA), ensaios de proteção de Ribonuclease. Os tipos de célula a seguir são fornecidos para fins ilustrativos, mas outros tipos de células podem ser rotineiramente usados, contanto que o alvo seja expresso no tipo de célula escolhido.

As células são cultivadas no meio apropriado conforme descrito abaixo e mantidas a 37°C em 95-98% de umidade e 5% de CO₂. As células foram rotineiramente passadas 2-3 vezes por semana.

15PC3: A linhagem de célula de câncer de próstata humano

15PC3 foi gentilmente doada pelo Dr. F. Baas, Neurozintuigen Laboratory, AMC, Países Baixos e cultivada em DMEM (Sigma) + soro bovino fetal a 10% (FBS) + Glutamax I + gentamicina.

5 PC3: A linhagem de célula de câncer de próstata humano PC3 foi adquirida da ATCC e foi cultivada em F12 Coon com glutamina (Gibco) + FBS a 10% + gentamicina.

10 518A2: A linhagem de célula de câncer de melanoma humano 518A2 foi gentilmente doada pelo Dr. B. Jansen, Section of Experimental Oncology, Molecular Pharmacology, Department of Clinical Pharmacology, University of Vienna e foi cultivada em DMEM (Sigma) + soro bovino fetal a 10% (FBS) + Glutamax I + gentamicina.

HeLa: A linhagem de célula de carcinoma cervical HeLa foi cultivada em MEM (Sigma) contendo soro bovino fetal a 10%, gentamicina, a 37°C, umidade de 95% e 5% de CO₂.

15 MPC-11: A linhagem de célula de mieloma de murino MPC-11 foi adquirida da ATCC e mantida em DMEM com Glutamax a 4 mM+ Soro de cavalo a 10%.

20 DU-145: A linhagem de célula de câncer de próstata humano DU-145 foi adquirida da ATCC e mantida em RPMI com Glutamax + FBS a 10%.

RCC-4 +/- VHL: A linhagem de célula de câncer renal humano RCC4 estavelmente transfectada com plasmídeo expressando VHL ou plasmídeo vazio foi adquirida da ECACC e mantida de acordo com as instruções dos fabricantes.

25 786-0: A linhagem de célula de carcinoma renal humano 786-0 foi adquirida da ATCC e mantida de acordo com as instruções do fabricante.

HUVEC: A linhagem de célula endotelial de via umbilical humana HUVEC foi adquirida da Camcrex e mantida em meio EGM-2.

30 K562: A linhagem de célula de leucemia mielogênica crônica humana K562 foi adquirida da ECACC e mantida em RPMI com Glutamax + FBS a 10%.

U87MG: A linhagem de linhagem de glioblastoma humano

U87MG foi adquirida da ATCC e mantida de acordo com as instruções do fabricante.

B16: A linhagem de célula de melanoma de murino B16 foi adquirida da ATCC e mantida de acordo com as instruções do fabricante.

5 LNCap: A linhagem de célula de cancer de próstata humano LNCap foi adquirida da ATCC e mantida em RPMI com Glutamax + FBS a 10%.

10 Huh-7: fígado humano, semelhante a epitelial, cultivada em Eagles MEM com FBS a 10 %, Glutamax I a 2 mM, 1x aminoácidos não essenciais, Gentamicina a 25 µg/ml.

15 L428: (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen (DSM, Braunschweig, Alemanha)): linfoma de células B humano mantido em RPMI 1640 suplementado com FCS a 10%, L-glutamina e antibióticos.

20 L1236: (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen (DSM, Braunschweig, Alemanha)): Linfoma de células B humano mantido em RPMI 1640 suplementado com FCS a 10%, L-glutamina e antibióticos.

Exemplo 6: Modelo in vitro: tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido anti-miR de LNA

25 A linhagem de célula Huh-7 expressando miR-122a foi transfectada com anti-miRs de LNA em concentrações de 1 e 100 nM de acordo com o protocolo otimizado com Lipofectamine 2000 (LF2000, Invitrogen) (como segue).

30 Células Huh-7 foram cultivadas em Eagles MEM com FBS a 10 %, Glutamax I a 2 mM, 1x aminoácidos não essenciais, Gentamicina a 25 µg/ml. As células foram cultivadas em lâminas com 6 cavidades (300000 células por cavidade), em um volume total de 2,5 ml um dia antes de transfecção. No dia da transfecção, uma solução contendo LF2000 diluída em Optimem (Invitrogen) foi preparada (1,2 ml de Optimem + 3,75 µl de LF2000 por cavidade, final de 2,5 µg de LF2000/ml, volume final total de 1,5 ml).

35 Oligonucleotídeos de LNA (anti-miRs de LNA) também foram diluídos em Optimem. 285 µl de Optimem + 15 µl de oligonucleotídeo de LNA (estoque de oligonucleotídeo a 10 µM para uma concentração final de

100 nM e 0,1 μ M para uma concentração final de 1 nM). As células foram lavadas uma vez em Optimem, então, a mistura de 1,2 ml de Optimem/LF2000 foi adicionada a cada cavidade. As células foram incubadas 7 min em temperatura ambiente na mistura LF2000 onde, após o que, 300 μ l de solução de oligonucleotídeo/Optimem foram adicionados.

As células foram ainda incubadas durante quatro horas com oligonucleotídeo e Lipofectamine2000 (em uma incubadora de células regular a 37 °C, 5% de CO₂). Após essas quatro horas, o meio/mistura foi removida e meio completo regular foi adicionado. As células foram deixadas crescer durante mais 20 horas. As células foram coletadas em Trizol (Invitrogen) 24 horas após transfecção. RNA foi extraído de acordo com um protocolo padrão com Trizol de acordo com as instruções do fabricante (Invitrogen), especialmente para reter o micro-RNA na extração de RNA total.

Exemplo 7: Modelo *in vitro* e *in vivo*: análise de inibição por oligonucleotídeo de expressão de miR através de PCR quantitativa micro-RNA-específica

Os níveis de miR-122a nas amostras de RNA foram avaliados em um instrumento de PCR em tempo real ABI 7500 Fast (Applied Biosystems, EUA) usando um kit de qRT-PCR miR-122a-específico, mirVana (Ambion, EUA) e primers ao miR-122a (Ambion, EUA). O procedimento foi conduzido de acordo com o protocolo dos fabricantes.

Resultados:

O novo design de oligonucleotídeo anti-miR de LNA miR-122a-específico (isto é, SPC3349 (também referido como SPC 3549)) era mais eficiente na inibição de miR-122a a 1 nM comparado com os modelos de design anterior, incluindo os motivos "cada-terceiro" e "gap-mero" (SPC3370, SPC3372, SPC3375) a 100 nM. Descobriu-se que o controle de combinação errônea não inibe o miR-122a (SPC3350). Os resultados são mostrados na figura 1.

Exemplo 8: Avaliação de especificidade de knock-down de LNA antago-mir usando caracterização de perfil por expressão em microarranjo de miRNA

A) Rotulação de RNA para caracterização de perfil por microarranjo de miRNA

RNA total foi extraído usando reagente Trizol (Invitrogen) e a extremidade 3' rotulada usando RNA ligase T4 e ligante de RNA Cy3- ou Cy5-rotulado (5'-PO4-rUrUrU-Cy3/dT-3' ou 5'-PO4-rUrUrU-Cy5/dT-3'). As reações de rotulação continham 2-5 µg de RNA total, ligante de RNA a 15 µM, Tris-HCl a 50 mM (pH de 7,8), MgCl₂ a 10 mM, DTT a 10 mM, ATP a 1 mM, polietileno glicol a 16% e 5 unidades de RNA ligase T4 (Ambion, EUA) e foram incubadas a 30 °C durante 2 horas, seguido por inativação térmica da RNA ligase T4 a 80° C durante 5 minutos.

B) Hibridização de microarranjo e lavagens pós-hibridização

Sondas de captura de oligonucleotídeo LNA-modificadas compreendendo sondas para todos os miRNAs mencionados de camundongo (*Mus musculus*) e ser humano (*Homo sapiens*) no banco de dados miRBase Micro-RNA Release 7.1, incluindo um conjunto de sondas de controle positivo e negativo, foram adquiridas da Exiqon (Exiqon, Dinamarca) e usadas para imprimir os microarranjos para caracterização de perfil de miRNA. As sondas de captura contêm um ligante C6-amino modificado 5'-terminal e foram projetadas para ter uma T_m de 72° C contra miRNAs alvo complementares através de ajuste do teor de LNA e comprimento das sondas de captura. As sondas de captura foram diluídas para uma concentração final de 10 µM em tampão de fosfato de sódio a 150 mM (pH de 8,5) e colocadas em quadruplicata sobre lâminas Codelink (Amersham Biosciences) usando o instrumento MicroGrid II Arrayer da BioRobotics em uma umidade de 45% e em temperatura ambiente. As lâminas foram pós-processadas conforme recomendado pelo fabricante.

RNA rotulado foi hibridizado aos microarranjos de LNA durante a noite a 65° C em uma mistura de hibridização contendo 4x SSC, SDS a 0,1%, 1 µg/µl de DNA de Esperma de Salmão e formamida a 38%. As lâminas hibridizadas foram lavadas três vezes em 2x SSC, SDS a 0,025% a 65°C, seguido por três vezes em 0,08x SSC e, finalmente, três vezes em 0,4x SSC em temperatura ambiente.

C) Exploração de arranjo, análise de imagem e processamento de dados

Os microarranjos foram explorados usando o ArrayWorx Scanner (Applied Precision, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. As imagens exploradas foram importadas para o TIGR Spotfinder versão 5 3.1 (Saeed e outros, 2003) para a extração das intensidades médias de ponto e intensidades de base local mediana, excluindo pontos com intensidades abaixo da base local mediana + 4x desvios padrão. As intensidades base-correlacionadas foram normalizadas usando o pacote de normalização por estabilização de variância versão 1.8.0 (Huber e outros, 2002) para R 10 (www.r-project.org). A média das intensidades de pontos repetidos foi calculada usando o Microsoft Excel. Sondas mostrando um coeficiente de variância > 100% foram excluídas de análise adicional de dados.

Exemplo 9: Detecção de micro-RNAs através de hibridização *in situ*

15 Detecção de micro-RNAs em seções de tecido incrustadas em parafina fixadas com formalina através de hibridização *in situ*.

A) Preparação das seções incrustadas em parafina, fixadas em formalina para hibridização *in situ*

20 Amostras incrustadas em parafina guardadas foram recuperadas e divididas em seções de 5 a 10 mm e montadas em lâminas positivamente carregadas usando a técnica de flutuação. As lâminas são armazenadas a 4 °C até que os experimentos *in situ* sejam conduzidos.

B) hibridização *in situ*

25 Seções sobre as lâminas são desparafinizadas em xileno e, então, reidratadas através de uma série de diluições em etanol (de 100% a 25%). As lâminas são submersas em água DEPC-tratada e submetidas a um tratamento com HCl e glicina a 0,2%, refixadas em paraformaldeído a 4% e tratadas com anidrido acético/trietanolamina; as lâminas são enxaguadas em várias lavagens de 1X PBS entre os tratamentos. As lâminas são pré-hibridizadas em solução de hibridização (formamida a 50%, 5X SSC, 500 30 mg/mL de tRNA de levedo, 1X Denhardt) a 50 °C durante 30 min. Então, 3 pmoles de uma sonda de LNA FITC-rotulada (Exiqon, Dinamarca) complementar a cada miRNA selecionado é adicionada à solução de hibridização e

hibridizados durante uma hora em uma temperatura de 20-25 °C abaixo da T_m prevista da sonda (tipicamente, entre 45-55 °C, dependendo da sequência do miRNA). Após lavagens em 0,1X e 0,5X SCC a 65 °C, uma reação de amplificação de sinal com tiramida foi realizada usando o kit Genpoint Fluorescein (FITC) (DakoCytomation, Dinamarca) seguindo as recomendações do vendedor. Finalmente, as lâminas são montadas com solução Prolong Gold. A reação de fluorescência é deixada desenvolver durante 16-24 horas antes de documentação da expressão do miRNA selecionado usando um microscópio de epifluorescência.

5
10 Detecção de micro-RNAs através de hibridização *in situ* por montagem inteira de embriões de peixe-zebra, *Xenopus* e camundongos

Todas as etapas de lavagem e incubação são realizadas em tubos de Eppendorf de 2 ml. Os embriões são fixados durante a noite a 4 °C em paraformaldeído a 4 °C em PBS e subseqüentemente transferidos através de uma série graduada (MeOH a 25% em PBST (PBS contendo Tween-20 a 0,1%), MeOH a 50% em PBST, MeOH a 75% em PBST) a metanol a 100% e armazenados a -20 °C até vários meses. No primeiro dia da hibridização *in situ*, os embriões são reidratados através de incubações sucessivas durante 5 min em MeOH a 75% em PBST, MeOH a 50% em PBST, MeOH a 25% em PBST e PBST a 100% (4 x 5 min).

Primeiro, embriões de camundongo e *Xenopus* são tratados com proteinaseK (10 µg/ml em PBST) durante 45 min a 37 °C, refixados durante 20 min em paraformaldeído a 4% em PBS e lavados 3 x 5 min com PBST. Após uma curta lavagem em água, a atividade de fosfatase alcalina endógena é bloqueada através de incubação dos embriões em trietanolamina a 0,1 M e anidrido acético a 2,5% durante 10 min, seguido por uma curta lavagem em água e 5 lavagens x 5 min em PBST. Os embriões são, então, transferidos para tampão de hibridização (Formamida a 50%, 5x SSC, Tween a 0,1%, ácido cítrico a 9,2 mM, 50 µg/ml de heparina, 500 µg/ml de RNA de levedo) durante 2-3 horas na temperatura de hibridização. Hibridização é realizada em tampão de hibridização preaquecido contendo 10 nM de sonda de LNA 3' DIG-rotulada (Roche Diagnostics) complementar a cada miRNA

selecionado. Lavagens pós-hibridização são feitas na temperatura de hibridização através de incubações sucessivas durante 15 min em HM- (tampão de hibridização sem heparina e RNA de levedo), HM a 75%/-2x SSCT a 25% (SSC contendo Tween-20 a 0,1%), HM a 50%/-2x SSCT a 50%, HM a 25%/-2x SSCT a 75%, 2x SSCT a 100% e 2 x 30 min em 0,2x SSCT.

Subseqüentemente, os embriões são transferidos para PBST através de incubações sucessivas durante 10 min em 0,2x SSCT a 75%/PBST a 25%, 0,2x SSCT a 50%/PBST a 50%, 0,2x SSCT a 25%/PBST a 75% e PBST a 100%. Após bloqueio durante 1 hora em tampão de bloqueio (soro de ovelha a 2%/2 mg:ml de BSA em PBST), os embriões são incubados durante a noite a 4 °C em tampão de bloqueio contendo fragmentos FAB anti-DIG-AP (Roche, 1/2000). No dia seguinte, embriões de peixe-zebra são lavados 6 x 15 min em PBST, embriões de camundongo e *X. tropicalis* são lavados 6 x 1 hora em TBST contendo levamisola a 2 mM e, então, durante 2 dias a 4 °C com troca regular do tampão de lavagem.

Após as lavagens pós-anticorpo, os embriões foram lavados 3 x 5 min em tampão de coloração (Tris HCl a 100 mM, pH de 9,5, MgCl₂ a 50 mM, NaCl a 100 mM, Tween 20 a 0,1%). Coloração foi feita em tampão fornecido com 4,5 µl/ml de NBT (Roche, estoque a 50 mg/ml) e 3,5 µl/ml de BCIP (Roche, estoque a 50 mg/ml). A reação é cessada com EDTA a 1 mM em PBST e os embriões são armazenados a 4°C. Os embriões são montados em solução de Murray (benzoato de benzila:álcool benzílico a 2:1) via uma série crescente de metanol (MeOH a 25% em PBST, MeOH a 50% em PBST, MeOH a 75% em PBST, MeOH a 100%) antes de formação de imagem.

Exemplo 10: Modelo *in vitro*: isolamento e análise de expressão de mRNA (isolamento de RNA total e síntese de cDNA para análise de mRNA)

RNA total foi isolado usando o minikit RNeasy (Qiagen) ou usando o reagente Trizol (Invitrogen). Para isolamento de RNA total usando o minikit RNeasy (Qiagen), as células foram lavadas com PBS e Cell Lysis Buffer (RTL, Qiagen) suplementado com mercaptoetanol a 1% adicionado diretamente às cavidades. Após uns poucos minutos, as amostras foram processadas de acordo com as instruções do fabricante.

Para análise *in vivo* de expressão de mRNA, amostras de tecido foram primeiro homogeneizadas usando um homogeneizador Retsch 300MM e RNA total foi isolado usando o reagente Trizol ou o minikit RNeasy, conforme descrito pelo fabricante.

5 Síntese de primeira fita (cDNA a partir de mRNA) foi realizada usando o kit OmniScript Reverse Transcriptase ou Transcriptase Reversa M-MLV (essencialmente conforme descrito pelo fabricante (Ambion)) de acordo com as instruções do fabricante (Qiagen). Quando usando OmniScript Reverse Transcriptase, 0,5 µg de cada amostra de RNA total foram ajustados
10 para 12 µl e misturados com 0,2 µl de poly (dT)₁₂₋₁₈ (0,5 µg/µl) (Life Technologies), 2 µl de mistura de dNTP (5 mM cada), 2 µl de 10x tampão de RT, 0,5 µl de inibidor RNAguard[®] RNase (33 unidades/ml, Amersham) e 1 µl de OmniScript Reverse Transcriptase, seguido por incubação a 37°C durante 60 min e inativação térmica a 93°C durante 5 min.

15 Quando síntese de primeira fita foi realizada usando decâmeros aleatórios e Transcriptase Reversa M-MLV (essencialmente conforme descrito pelo fabricante (Ambion)), 0,25 µg de RNA total de cada amostra foram ajustados para 10,8 µl em H₂O. 2 µl de decâmeros e 2 µl de mistura de dNTP (2,5 mM cada) foram adicionados. As amostras foram aquecidas para
20 70°C durante 3 min e esfriadas imediatamente em água gelada e 3,25 µl de uma mistura contendo (2 µl de 10x tampão de RT; 1 µl de Transcriptase Reversa M-MLV; 0,25 µl de inibidor RNAase) adicionados. cDNA é sintetizado a 42°C durante 60 min, seguido por uma etapa de inativação por aquecimento a 95 °C durante 10 min e, finalmente, esfriado para 4°C. O cDNA pode
25 ainda ser usado para quantificação de mRNA, por exemplo, através de PCR quantitativa em tempo real.

Expressão de mRNA pode ser avaliada em uma variedade de formas conhecidas na técnica. Por exemplo, os níveis de mRNA podem ser quantificados, por exemplo, através de análise de Northern blot, reação em
30 cadeia de polimerase competitiva (PCR), ensaio de proteção de Ribonuclease (RPA) ou PCR em tempo real. PCR quantitativa em tempo real é presentemente preferida. Análise de RNA pode ser realizada sobre RNA celular

total ou mRNA.

Métodos de isolamento de RNA e análise de RNA, tal como análise de Northern blot, são rotina na técnica e ensinados, por exemplo, em *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons.

5 PCR quantitativa em tempo real (PCR) pode ser convenientemente realizada usando o iQ Multicolor Real Time PCR Detection System comercialmente disponível da BioRAD. PCR quantitativa em tempo real é um método bem conhecido na técnica e é ensinada, por exemplo, em Heid e outros Real time quantitative PCR, *Genome Research* (1996), 6: 986-994.

10 Exemplo 11: Captação e eficácia de oligonucleotídeo de LNA *in vivo*

Estudo *in vivo*: Seis grupos de animais (5 camundongos por grupo) foram tratados da seguinte maneira. Os animais do Grupo 1 foram injetados com 0,2 ml de solução salina através de i.v. em 3 dias sucessivos, o Grupo 2 recebeu 2,5 mg/kg de SPC3372, o Grupo 3 recebeu 6,25 mg/kg, o Grupo 4 recebeu 12,5 mg/kg e o Grupo 5 recebeu 25 mg/kg, enquanto que o Grupo 6 recebeu 25 mg/kg de SPC 3373 (oligonucleotídeo LNA-antimiR[®] de combinação errônea), todos da mesma maneira. Todas as doses foram calculadas a partir dos pesos corporais de cada animal no Dia 0.

20 Antes de dosagem (Dia 0) e 24 horas após a última dose (Dia 3), sangue retro-orbital foi coletado em tubos contendo EDTA e a fração plasmática coletada e armazenada congelada a -80°C para análise e colesterol. No sacrifício, os fígados foram dissecados e uma porção foi cortada em cubos de 5 mm e imersa em 5 volumes de RNAlater gelado. Uma segunda porção foi congelada em nitrogênio líquido e armazenada para criodivisão.

25 RNA total foi extraído de amostras de fígado conforme descrito acima e analisadas com relação aos níveis de miR-122a através de qPCR micro-RNA-específica. A Figura 5 demonstra uma dose-resposta clara obtida com SPC3372, com uma IC50 em aproximadamente 3-5 mg/kg, enquanto que nenhuma inibição de miR-122a foi detectada usando o LNA antago-mir de combinação errônea SPC 3373 para miR-122a.

Exemplo 12: Dose-resposta de LNA-antimiR-122a *in vivo* em camundongos fêmeas C57/BL/J

Estudo *in vivo*: Dez grupos de animais (C57/BL6 fêmeas; 3 camundongos por grupo) foram tratados da seguinte maneira. Os animais do Grupo 1 foram injetados com 0,2 ml de solução salina através de i.p. no dia 0, dia 2 e dia 4. Os Grupos 2-10 foram dosados através de i.p. com três diferentes concentrações (25 mg/kg, 5 mg/kg e 1 mg/kg) de LNA antimiR-122a/SPC3372 (grupo 2-4), LNA antimir-122a/SPC3548 (grupo 5-7) ou LNA antimir-122a/SPC3549 (grupo 8-10); as seqüências de LNA antimir-122a são fornecidas na Tabela 1. Todos os três oligonucleotídeos LNA antimiR-122a objetivam miR-122a fígado-específico. As doses foram calculadas a partir dos pesos corporais de cada animal no Dia 0.

Os animais foram sacrificados 48 horas após a última dose (Dia 6), sangue retro-orbital foi coletado em tubos contendo EDTA e a fração plasmática foi coletada e armazenada congelada a -80°C para análise de colesterol. No sacrifício, os fígados foram dissecados e uma porção foi cortada em cubos de 5 mm e imersa em 5 volumes de RNAlater gelado. Uma segunda porção foi congelada em nitrogênio líquido e armazenada para criodivisão.

RNA total foi extraído de amostras de fígado usando reagente Trizol de acordo com as recomendações do fabricante (Invitrogen, EUA) e analisados com relação aos níveis de miR-122a através de qPCR micro-RNA-específica de acordo com as recomendações do fabricante (Ambion, EUA). A Figura 2 demonstra uma dose-resposta clara obtida com todas as três moléculas de LNA antimir-122a (SPC3372, SPC3548, SPC3549). SPC3548 e SPC3549 mostram eficácia significativamente aperfeiçoada *in vivo* no silenciamento de miR-122a (conforme observado a partir dos níveis reduzidos de miR-122a) comparado com SPC3372, com SPC3549 sendo mais potente (IC_{50} de aproximadamente 1 mg/kg).

O exemplo acima foi repetido usando SPC3372 e SPC 3649 usando 5 camundongos por grupo e os dados combinados (total de oito camundongos por grupo) são mostrados na Figura. 2b.

Exemplo 12a: Northern Blot

Northern blot micro-RNA-específica mostrou bloqueio intensificado de miR-122 pelo SPC3649 comparado com o SPC3372 em fígados de camundongos tratados com LNA-antimiR.

5 Oligos usados nesse exemplo:

SPC3649: 5'-CcAttGTcaCaCtCC-3'(SEQ ID 59)	Novo design
SPC3372: 5'-CcAttGtcAcaCtcCa-3'(SEQ ID 57)	Design antigo

Decidiu-se avaliar o efeito de SPC3649 sobre os níveis de mRNA de miR-122 nos fígados de camundongos tratados com SPC3649. Os LNA-antimiRs SPC3649 e SPC3372 foram administrados a camundongos através de três injeções i.p. dia sim, dia não durante um período de seis dias nas doses indicadas, seguido por sacrifício dos animais 48 horas após a última dose. RNA total foi extraído dos fígados. Os níveis de miR-122 foram avaliados através de Northern blot micro-RNA-específica (figura 6).

Tratamento de camundongos normais com SPC3649 resultou em uma redução dose-dependente dramaticamente aperfeiçoada de miR-122. Northern blot micro-RNA-específica comparando SPC3649 com SPC3372 foi realizada (figura 6). SPC3649 bloqueou completamente o miR-122 em 5 e 25 mg/kg, conforme observado pela ausência de miR-122 fita única maduro e apenas a presença da banda dupla entre o LNA-antimiR e miR-122. Comparando a banda da dupla versus maduro sobre a Northern blot, o SPC3649 parece igualmente eficiente a 1 mg/kg, assim como o SPC3372 a 25 mg/kg.

Exemplo 13: Avaliação dos níveis de colesterol no plasma em camundongos tratados com anti-miR de LNA122

O nível de colesterol total foi medido no plasma usando um ensaio colorimétrico Cholesterol CP da ABX Pentra. O colesterol foi medido acompanhando a hidrólise enzimática e oxidação (2,3). 21,5 µl de água foram adicionados a 1,5 µl de plasma. 250 µl de reagente foram adicionados e, dentro de 5 min, o teor de colesterol medido em um comprimento de onda de 540 nM. Medições sobre cada animal foram feitas em duplicata. A sensibilidade e linearidade foram testadas com composto de controle diluído 2 vezes (controle ABX Pentra N). O nível de colesterol foi determinado subtra-

indo-se a base e o apresentado com relação aos níveis de colesterol no plasma de camundongos tratados com solução salina.

A Figura 3 demonstra um nível acentuadamente diminuído de colesterol no plasma nos camundongos que receberam SPC3548 e SPC3549, comparado com o controle de solução salina no Dia 6.

Exemplo 14: Avaliação dos níveis de mRNA de miR-122a alvo em camundongos tratados com LNA antimir-122a

Os animais tratados com controle de solução salina e diferentes LNA-antimir-122a foram sacrificados 48 horas após a última dose (Dia 6) e RNA total foi extraído de amostras de fígado usando reagente Trizol de acordo com as recomendações do fabricante (Invitrogen, EUA). Os níveis de mRNA foram avaliados através de RT-PCR quantitativa em tempo real para dois genes de miR-122a alvo, Bckdk (quinase de desidrogenase de cetóácido com cadeia ramificada, ENSMUSG00000030802) e aldolase A (aldoA, ENSMUSG00000030695), respectivamente, bem como para GAPDH como controle, usando ensaios Taqman de acordo com as instruções do fabricante (Applied biosystems, EUA). As Figuras 4a e 4b demonstram uma super-regulação dose-dependente clara dos dois genes de miR-122a alvo, Bckdk e AldoA, respectivamente, como uma resposta ao tratamento com todas as três moléculas de LNA antimir-122a (SPC3372, SPC3548, SPC3549). Em contraste, os ensaios de qPCR para controle GAPDH não revelaram quaisquer diferenças significativas nos níveis de mRNA de GAPD nos camundongos tratados com LNA-antimir-122a comparado com os animais de controle com solução salina (figura 4c). Os níveis de mRNA de Bckdk e AldoA eram significativamente maiores nos camundongos tratados com SPC3548 e SPC3549 comparado com os camundongos tratados com SPC3372 (figuras 4a e 4b), desse modo, demonstrando sua eficácia aperfeiçoada *in vivo*.

Exemplo 15: Duração de ação de oligonucleotídeo de LNA *in vivo*

Estudo *in vivo*: Dois grupos de animais (21 camundongos por grupo) foram tratados da seguinte maneira. Os animais do Grupo 1 foram injetados com 0,2 ml de solução salina através de i.v em 3 dias sucessivos, o Grupo 2 recebeu 25 mg/kg de SPC3372 da mesma maneira. Todas as do-

ses foram calculadas a partir dos pesos corporais de cada animal no Dia 0.

Após a última dose (Dia 3), 7 animais de cada grupo foram sacrificados no Dia 9, Dia 16 e Dia 23, respectivamente. Antes disso, em cada dia, sangue retro-orbital foi coletado em tubos contendo EDTA e a fração plasmática coletada e armazenada congelada a -80°C para análise de colesterol de cada dia. No sacrifício, os fígados foram dissecados e uma porção foi cortada em cubos de 5 mm e imersa em 5 volumes de RNAlater gelado. Uma segunda porção foi congelada em nitrogênio líquido e armazenada para criodivisão.

RNA total foi extraído de amostras do fígado conforme descrito acima e analisados com relação aos níveis de miR-122a através de qPCR micro-RNA-específica. A Figura 7 (Sacrifício nos dias 9, 16 ou 23 correspondem ao sacrifício 1, 2 ou 3 semanas após a última dose) demonstra uma inibição de duas vezes nos camundongos que receberam SPC3372 comparado com o controle de solução salina e essa inibição ainda pôde ser detectada no Dia 16, enquanto que, no Dia 23, os níveis de miR-122a se aproximaram daqueles do grupo com solução salina.

Exemplo 16: Duração de ação de oligonucleotídeo de LNA *in vivo*

Estudo *in vivo*: Dois grupos de animais (21 camundongos por grupo) foram tratados da seguinte maneira. Animais do Grupo 1 foram injetados com 0,2 ml de solução salina através de i.v. durante 3 dias sucessivos, o Grupo 2 recebeu 25 mg/kg de SPC3372 da mesma maneira. Todas as doses foram calculadas a partir dos pesos corporais de cada animal no Dia 0.

Após a última dose (Dia 3), 7 animais de cada grupo foram sacrificados no Dia 9, Dia 16 e Dia 23, respectivamente. Antes disso, em cada dia, sangue retro-orbital foi coletado em tubos contendo EDTA e a fração plasmática coletada e armazenada congelada a -80°C para análise de colesterol de cada dia. No sacrifício, os fígados foram dissecados e uma porção foi cortada em cubos de 5 mm e imersa em 5 volumes de RNAlater gelado. Uma segunda porção foi congelada em nitrogênio líquido e armazenada para criodivisão.

RNA total foi extraído de amostras de fígado conforme descrito

acima e analisados com relação aos níveis de miR-122a através de qPCR micro-RNA-específica. A Figura 8 demonstra uma inibição de duas vezes nos camundongos que receberam SPC3372 comparado com o controle de solução salina e essa inibição ainda pôde ser detectada no Dia 16, enquanto
5 que no Dia 23, os níveis de miR-122a se aproximaram daqueles no grupo com solução salina.

Conforme os exemplos 17-22, os seguintes procedimentos se aplicam:

Camundongos NMRI foram administrados intravenosamente
10 com SPC3372 usando doses diárias oscilando de 2,5 a 25 mg/kg durante três dias consecutivos. Os animais foram sacrificados 24 horas, 1, 2 ou 3 semanas após a última dose. Os fígados foram coletados, divididos em pedaços e submersos em RNAlater (Ambion) ou congelado aos pedaços. RNA foi extraído com reagente Trizol de acordo com as instruções do fabricante
15 (Invitrogen) a partir do tecido RNAlater, exceto que o RNA precipitado foi lavado em etanol a 80% e não submetido a turbilhonamento. O RNA foi usado para qPCR de mRNA TaqMan de acordo com o fabricante (Applied biosystems) ou Northern blot (veja abaixo). Os pedaços congelados foram criodivididos para hibridizações *in situ*.

20 Ainda, conforme as figuras 9-14, SPC3372 é designado LNA-antimiR e SPC3373 (o controle de combinação errônea) é designado "mm" ao invés de usar o número de SPC.

Exemplo 17: Indução de mRNA de miR-122a alvo dose-dependente pelo SPC3372

25 Camundongos foram tratados com diferentes doses de SPC3372 durante três dias consecutivos, conforme descrito acima, e sacrificados 24 horas após a última dose. RNA total extraído de fígado foi submetido à qPCR. Genes com sítio de miR-122 alvo previsto e observados como estando super-regulados através de análise em microarranjo foram investigados com
30 relação à indução dose-dependente através de aumento das doses de SPC3372 usando qPCR. RNA de fígado total de 2 a 3 camundongos por grupo sacrificados 24 horas após a última dose foi submetido à qPCR para

os genes indicados. São mostrados na figura 9 os níveis de mRNA com relação ao grupo com solução salina, n = 2-3 (2,5 – 12,5 mg/kg/dia: n = 2, sem SD). Também é mostrado o controle de combinação errônea (mm, SPC3373).

5 Genes ensaiados: Nrdg3 Aldo A, Bckdk, CD320 com sítio de miR-122 alvo previsto. Aldo B e Gapdh não têm um sítio de miR-122a alvo previsto.

Uma indução dose-dependente clara foi observada dos genes de miR-122a alvo após tratamento com diferentes doses de SPC3372.

10 Exemplo 18: Indução transitória de mRNAs de miR-122a alvo após tratamento com SPC3372

Camundongos fêmeas NMRI foram tratados com 25 mg/kg/dia de SPC3372, junto com controle de solução salina durante três dias consecutivos e sacrificados 1, 2 ou 3 semanas após a última dose, respectivamente. RNA foi extraído dos fígados e os níveis de mRNA de mRNAs de miR-122a alvo previsto, selecionado através de dados de microarranjo, foram investigados através de qPCR. Três animais de cada grupo foram analisados.

20 Genes ensaiados: Nrdg3 Aldo A, Bckdk, CD320 com sítio de miR-122 alvo previsto. Gapdh não tem um sítio de miR-122a alvo previsto.

Uma indução transitória, seguido por uma restauração dos níveis normais de expressão em analogia à restauração dos níveis normais de miR-122a foi observada (figura 10).

25 Os níveis de mRNA foram normalizados para os níveis de GAPDH individuais e para a média do grupo tratado com solução salina em cada ponto de tempo individual. Também são incluídos os valores dos animais sacrificados 24 horas após a última dose. São mostrados a média e o desvio padrão, n = 3 (24h n = 3).

Exemplo 19: Indução de Vldlr no fígado através de tratamento com SPC3372

30 As mesmas amostras de RNA de fígado conforme no exemplo anterior foram investigadas com relação à indução de Vldlr.

Uma super-regulação transitória foi observada após tratamento com SPC3372, conforme com os outros mRNAs de miR-122a alvo previstos

(figura 11).

Exemplo 20: Estabilidade da dupla miR-122a/ SPC3372 em plasma de camundongo

5 A estabilidade do SPC3372 e da dupla SPC3372/miR-122a foi testada em plasma de camundongo a 37°C durante 96 horas. É mostrado na figura 12 um PAGE corado com SYBR-Gold.

SPC3372 era completamente estável durante 96 horas. A dupla SPC3372/miR-122a foi imediatamente truncada (degradação da região de miR-122a fita única não abrangida pelo SPC3372) mas, depois, era quase
10 que completamente estável durante 96 horas.

O fato de que uma dupla SPC3372/miR-122 pré-formada mostrou estabilidade no soro durante 96 horas junto com a elevada estabilidade térmica da dupla da molécula de SPC3372 sustentou nossa observação de que inibição de miR-122a pelo SPC3372 era em virtude de formação estável
15 de dupla entre as duas moléculas, o que também tinha sido reportado em cultura de célula (Naguibneva e outros 2006).

Exemplo 21: Captura de miR-122a maduro pelo SPC3372 leva à formação de dupla

O RNA do fígado foi também submetido a uma Northern blot de
20 micro-RNA. É mostrada na figura 13 uma membrana hibridizada com uma sonda miR-122a-específica (painel superior) e re-hibridizada com uma sonda Let-7-específica (painel inferior). Com a sonda de miR-122, duas bandas puderam ser detectadas, uma correspondendo ao miR-122 maduro e uma correspondendo a uma dupla entre o SPC3372 e miR-122.

25 Para confirmar o silenciamento de miR-122, amostras de RNA de fígado foram submetidas à análise de Northern blot de pequeno RNA, a qual mostrou níveis significativamente reduzidos de miR-122 maduro detectável, de acordo com nossos resultados de RT-PCR em tempo real. Por comparação, os níveis de controle let-7a não foram alterados. De modo interessante, observa-se um acúmulo dose-dependente de uma banda de heterodupla de miR-122/ SPC3372 desviada, sugerindo que o SPC3372 não objetiva o miR-122 para degradação, mas antes, se liga ao micro-RNA, desse
30

modo, impedindo estericamente sua função.

Análise por Northern foi realizada como segue:

Preparo de membranas para Northern foi feito conforme descrito em Sempere e outros 2002, exceto quanto às seguintes alterações: RNA total, 10 µg por fileira, em tampão de carregamento de formamida (formamida a 47,5%, EDTA a 9 mM, Azul de Bromofenol a 0,0125%, Cianol de Xileno a 0,0125%, SDS a 0,0125%) foi carregado sobre um gel de poliacrilamida de Uréia-TBE a 15% Novex de desnaturação (Invitrogen) sem preaquecimento do RNA. O RNA foi eletroforicamente transferido para GeneScreen plus Hybridization Transfer Membrane (PerkinElmer) a 200 mA durante 35 min. As membranas foram hibridizadas com oligonucleotídeos LNA-modificados 32P-rotulados complementares aos micro-RNAs maduros*. Os oligonucleotídeos de LNA foram rotulados e hibridizados às membranas conforme descrito em (Válóczi e outros 2004) exceto quanto às seguintes alterações: as soluções de pré-hibridização e hibridização continham formamida a 50%, SDS a 0,5%, 5x SSC, 5x solução de Denhardt e 20 µg/ml de DNA de esperma de salmão desnaturado cisalhado. As hibridizações foram realizadas a 45°C. As blots foram visualizadas através de exploração em um Storm 860 Scanner. O sinal da membrana de base foi subtraído dos sinais radioativos originários das bandas de miRNA. Os valores dos sinais de miR-122 foram corrigidos para as diferenças de carregamento baseado no sinal de let-7a. Para determinar o tamanho dos sinais radioativos, o Decade Marker System (Ambion) foi usado de acordo com as recomendações dos fornecedores.

Exemplo 22: Captura de miR-122a pelo SPC3372 junto com distribuição de SPC3372 avaliada através de hibridização *in situ* de seções de fígado

Crio-seções de fígado de animais tratados foram submetidas à hibridizações *in situ* para deleção e localização de miR-122 e SPC3372 (figura 14). Uma sonda complementar ao miR-122 pôde detectar o miR-122a. Uma segunda sonda era complementar ao SPC3372. É mostrada na figura 14 uma sobreposição; em verde está a distribuição e quantidades evidentes de miR-122a e SPC3372 e em azul está o corante nuclear DAPI, em uma ampliação de 10x. Ampliações de 100x revelam a distribuição intranuclear

de miR-122a e SPC3372 dentro de células de fígado de camundongo.

As seções de fígado da animais de controle com solução salina mostraram um forte padrão de coloração de miR-122 por toda a seção do fígado, enquanto que as seções de camundongos tratados com SPC3372 mostraram um padrão de coloração esparsa significativamente reduzido. Em contraste, a molécula SPC3372 foi prontamente detectada no fígado tratado com SPC3372, mas não no fígado com controle de solução salina não tratado. Maior ampliação localizou o miR-122a no citoplasma, onde o padrão de miR-122 *in situ* estava completamente compartimentalizado, enquanto que a molécula de SPC3372 estava uniformemente distribuída por todo o citoplasma.

Exemplo 23: Análise de microarranjo

Nós realizamos caracterização de perfil de expressão ampla em genoma de amostras de RNA total de fígados de camundongos tratados com solução salina, LNA-antimiR-122 e controle de combinação errônea de LNA 24 horas após a última dose usando arranjos Affymetrix Mouse Genome 430 2.0. Análise dos dados de arranjo revelou 455 transcritos que eram super-regulados nos fígados de camundongos tratados com LNA-antimiR comparado com os camundongos tratados com solução salina e controle de combinação errônea de LNA, enquanto que 54 transcritos eram sub-regulados (figura 15a). Um total de 415 dos transcritos super-regulados e 53 dos sub-regulados pôde ser identificado no banco de dados Ensembl. Subseqüentemente, nós examinamos as regiões não traduzidas 3' (UTRs) dos mRNAs diferencialmente expressos com relação à presença da seqüência de 6 nt, CACTCC, correspondendo ao complemento reverso da região de cultura dos nucleotídeos 2–7 em miR-122 maduro. O número de transcritos tendo pelo menos uma seqüência de reconhecimento de miR-122 era de 213 (51 %) dentre os transcritos super-regulados e 10 (19 %) dentro dos transcritos sub-regulados, enquanto que a freqüência em uma população de seqüência aleatória era de 25 %, implicando que um reservatório significativo dos mRNAs super-regulados representa miR-122 alvos diretos no fígado (figura 15b).

O tratamento com LNA-antimiR mostrou redução máxima dos níveis de miR-122 em 24 horas, redução de 50% em uma semana e controles com solução salina equivalentes em três semanas após a última dose de LNA (Exemplo 12 "design antigo"). Isso coincidia com um número acentua-

5 damente reduzido de genes diferencialmente expressos entre os dois grupos de camundongos nos pontos de tempo posteriores. Comparado com os 509 mRNAs 24 horas após a última dose de LNA, nós identificamos 251 genes diferencialmente expressos após uma semana, mas apenas 18 genes após três semanas pós-tratamento (figuras 15c e 15d). Em geral, genes super-

10 regulados 24 horas após tratamento com LNA-antimiR, então, reverteram para os níveis de controle durante as próximas duas semanas (figura 15d).

Em conclusão, uma grande porção de genes super-regulados/reversamente reprimidos após tratamento com LNA-antimiR eram miR-122 alvos, indicando um efeito muito específico para bloqueio de miR-122. Tam-

15 bém, genes super-regulados/reversamente reprimidos se aproximam dos níveis normais 3 semanas após o final de tratamento, sugerindo um efeito terapêutico relativamente longo mas, contudo, não causando uma alteração permanente, isto é, o efeito é reversível.

MÉTODOS:

20 Caracterização de expressão de gene de camundongos tratados com LNA-antimiR

Os perfis de expressão nos fígados de camundongos tratados com solução salina e LNA-antimiR foram comparados. Camundongos fêmeas NMRI foram tratados com 25 mg/kg/dia de LNA-antimiR, junto com

25 controle de solução salina durante três dias consecutivos e sacrificados 24 h, 1, 2 ou 3 semanas após a última dose. Adicionalmente, os perfis de expressão de fígados de camundongos tratados com oligonucleotídeo de controle de LNA erroneamente combinado 24 h após a última dose foram obtidos. Três camundongos de cada grupo foram analisados, proporcionando um

30 total de 21 perfis de expressão. A qualidade e concentração de RNA foram medidas usando um Agilent 2100 Bioanalyzer e Nanodrop ND-1000, respectivamente. RNA total foi processado seguindo as instruções do kit de síntese

de cDNA GeneChip Expression 3'-Amplification Reagents One-cycle (Affymetrix Inc, Santa Clara, CA, EUA) para produzir cDNA fita dupla. Esse foi usado como um *template* para gerar cRNA rotulado com biotina seguindo as especificações do fabricante. Quinze microgramas de cRNA rotulado com biotina foram fragmentados em fitas entre 35 e 200 bases de comprimento, das quais 10 microgramas foram hibridizados sobre arranjos Affymetrix Mouse Genome 430 2.0 durante a noite no forno GeneChip Hybridisation 6400 usando procedimentos padrão. Os arranjos foram lavados e corados em um GeneChip Fluidics Station 450. Exploração foi realizada usando o GeneChip Scanner 3000 e análise de imagem foi realizada usando o Software GeneChip Operating. Normalização e análise estatística foram feitas usando o pacote de software LIMMA para o ambiente de programação R27. Sondas reportadas como ausentes pelo software GCOS em todas as hibridizações foram removidas do conjunto de dados. Adicionalmente, um filtro de intensidade foi aplicado ao conjunto de dados para remover sondas mostrando intensidades interferência-corrigidas abaixo de 16. Os dados foram normalizados usando o Quantile Normalization²⁸. Expressão diferencial foi avaliada usando um método de modelo linear. Os P valores foram ajustados para testagem múltipla usando o Benjamini e Hochberg. Testes foram considerados como sendo significativos se os p valores ajustados eram $p < 0,05$. Agrupamento e visualização dos dados de arranjo Affymetrix foram feitos usando o software MultiExperiment Viewer²⁹.

Previsão de sítio alvo

Transcritos com 3' UTRs anotadas foram extraídos do banco de dados Ensembl (Release 41) usando a ferramenta EnsMart Data Mining³⁰ e pesquisados com relação à presença da seqüência CACTCC, a qual é o complemento reverso do nucleotídeo 2-7 de cultura na seqüência do miR-122 maduro. Como um controle de interferência, um conjunto de 1000 seqüências com um comprimento de 1200 nt, correspondendo ao comprimento médio da 3' UTR dos transcritos super- e sub-regulados a 24 h após a última dose de LNA-antimiR, foram pesquisados com relação às combinações com miR-122 de 6 nucleotídeos de cultura. Isso foi realizado 500 vezes e a conta-

gem média foi usada para comparação.

Exemplo 24: Inibição dose-dependente de miR-122 em fígado de camundongo pelo LNA-antimiR é intensificada quando comparado com a inibição de miR-122 pelo antagomir

5 Camundongos fêmeas NMRI foram tratados com as doses indicadas de LNA-antimiR (SPC3372) junto com um controle de combinação errônea (mm, SPC3373), solução salina e antagomir (SPC3595) durante três dias consecutivos e sacrificados 24 horas após a última dose (conforme no exemplo 11 "design antigo", n = 5). Os níveis de miR-122 foram analisados
10 através de qPCR e normalizados para o grupo tratado com solução salina. Genes com um sítio previsto de miR-122 alvo e super-regulados na caracterização de perfil de expressão (AldoA, Nrdg3, Bckdk e CD320) mostraram uma reversão de repressão dose-dependente através de aumento das doses de LNA-antimiR, medido através de qPCR.

15 A reversão de repressão foi consistentemente maior em todos os mRNAs de miR-122 alvo testados (AldoA, Bckdk, CD320 e Nrdg3; figuras 17, 18, 19, 20) em camundongos tratados com LNA-antimiR comparado com camundongos tratados com antagomir. Isso também foi indicado quando de análise da inibição de miR-122 através de qPCR miR-122-específica (figura
20 16). Conseqüentemente, LNA-antimiRs proporcionam uma inibição funcional mais potente de miR-122 do que o antagomir em uma dose correspondente.

Exemplo 25: Inibição de miR-122 por LNA-antimiR em camundongos hipercolesterolêmicos junto com redução de colesterol e reversão de repressão de mRNA de miR-122 alvo

25 Camundongos fêmeas C57BL/6J foram alimentados com uma dieta com elevado teor de gordura durante 13 semanas antes de início de tratamento com SPC3649. Isso resultou em um peso aumentado para 30-35 g comparado com o peso de camundongos normais, o qual era de apenas 20 g, quando pesados no início do tratamento com LNA-antimiR. Os camun-
30 dongs sob a dieta com elevado teor de gordura tiveram um nível total de colesterol no plasma significativamente aumentado de cerca de 130 mg/dl, assim, tornando os camundongos hipercolesterolêmicos comparado com o

nível normal de cerca de 70 mg/dl. Camundongos hipercolesterolêmicos e normais foram tratados i.p. duas vezes por semana com 5 mg/kg de SPC3649 e o controle de combinação errônea correspondente SPC3744 durante um período de estudo de 5 ½ semanas. Amostras de sangue foram coletadas semanalmente e o colesterol total no plasma foi medido durante todo o curso do estudo. Quando de sacrifício dos camundongos, amostras de fígado e sangue foram preparadas para extração de RNA total, quantificação de miRNA e mRNA, avaliação dos níveis de transaminase no sangue e histologia do fígado.

Tratamento de camundongos hipercolesterolêmicos com SPC3649 resultou em redução do colesterol total no plasma para cerca de 30 % comparado com os camundongos de controle com solução salina já após 10 dias e sustentaram esse nível durante todo o estudo (Figura 21). O efeito não foi tão pronunciado quanto nos camundongos com dieta normal. Em contraste, o controle de combinação errônea SPC3744 não afetou os níveis de colesterol no plasma, nem nos camundongos hipercolesterolêmicos, nem nos normais.

Quantificação de inibição de miR-122 e reversão de repressão de gene de miR-122 alvo (AldoA e Bckdk) após o tratamento a longo prazo com SPC3649 revelaram um perfil comparável em camundongos hipercolesterolêmicos e normais (Figuras 22, 23, 24), desse modo, demonstrando a potência do SPC3649 no antagonismo de miR-122 em ambos os grupos de animais. O ensaio de qPCR de miR-122 indicou que também o controle de combinação errônea SPC3744 tinha um efeito sobre os níveis de miR-122 nos fígados de camundongos tratados, embora em um grau menor comparado com o SPC3649. Isso poderia ser uma redução associada à qPCR "stem-loop". Consistente com essa observação, tratamento de camundongos com o controle de combinação errônea SPC3744 não resultou em qualquer reversão de repressão funcional dos genes de miR-122 alvo diretos (Figuras 23 e 24), nem redução de colesterol no plasma (Figura 21), implicando que o antagonismo SPC3649-mediado de miR-122 é altamente específico *in vivo*.

As enzimas no fígado em fígados de camundongos hipercoleste-

rolêmicos e normais foram avaliadas após tratamento a longo prazo com SPC3649. Nenhuma alteração nos níveis de aminotransferase de alanina e aspartato (ALT e AST) foram detectadas nos camundongos hipercolesterolêmicos tratados com SPC3649 comparado com os camundongos de controle com solução salina (Figuras 25 e 26). Um nível de ALT possivelmente elevado foi observado nos camundongos normais após tratamento a longo prazo com SPC3649 (Figura 26).

Exemplo 26: Métodos para realização do experimento e análise de LNA-antimiR/hipercolesterolêmico

10 Camundongos e dosagem

Camundongos C57BL/6J fêmeas (Taconic M&B Laboratory Animals, Ejby, Dinamarca) foram usados. Todas as substâncias foram formuladas em solução salina fisiológica (NaCl a 0,9 %) para uma concentração final que permitia que os camundongos recebessem um volume de injeção intraperitoneal de 10 ml/kg.

No estudo de obesidade induzida pela dieta, os camundongos receberam uma dieta com elevado teor de gordura (60EN%) (D12492, Research Diets) durante 13 semanas para aumentar seu nível de colesterol no sangue antes da dosagem começar. O regime de dose foi prolongado para 5 ½ semanas de 5 mg/kg de LNA-antimiR® duas vezes por semana. O plasma sanguíneo foi coletado uma vez por semana durante todo o período de dosagem. Após término do experimento, os camundongos foram sacrificados e RNA extraído dos fígados para análise adicional. O soro foi também coletado para análise de enzimas no fígado.

25 Extração de RNA total

Os fígados dissecados de camundongos sacrificados foram imediatamente armazenados em RNA Later (Ambion). RNA total foi extraído com reagente Trizol de acordo com as instruções do fabricante (Invitrogen), exceto que a pelota de RNA precipitada foi lavada em etanol a 80% e não submetida a turbilhamento.

RT-PCR quantitativa micro-RNA-específica

Os níveis de miRNA miR-122 e let-7a foram quantificados com o

ensaio de micro-RNA TaqMan (Applied Biosystems) seguindo as instruções do fabricante. A reação de RT foi diluída dez vezes em água e subsequentemente usada para amplificação por PCR em tempo real de acordo com as instruções do fabricante. Uma série de diluições de cDNA de duas vezes a partir do RNA total de fígado de um animal tratado com solução salina ou reação de cDNA de células transfectadas com placebo (usando 2,5 vezes mais RNA total do que nas amostras) serviu como padrão para assegurar uma faixa linear (Ct versus número relativo de cópias) da amplificação. Um instrumento de RT-PCR em tempo real Applied Biosystems 7500 ou 7900 foi usado para amplificação.

RT-PCR quantitativa

Quantificação de mRNA de genes selecionados foi feita usando ensaios TaqMan padrões (Applied Biosystems). A reação de transcrição reversa foi realizada com decâmeros aleatórios, 0,5 µg de RNA total e a enzima M-MLV RT da Ambion de acordo com um protocolo padrão. cDNA de primeira fita foi subsequentemente diluído 10 vezes em água isenta de nuclease antes da adição da mistura de reação de RT-PCR. Uma série de diluições de cDNA de duas vezes de RNA total de fígado de um animal tratado com solução salina ou reação de cDNA de células transfectadas com placebo (usando 2,5 vezes mais RNA total do que nas amostras) serviu como padrão para assegurar uma faixa linear (Ct versus número relativo de cópias) da amplificação. Um instrumento de RT-PCR em tempo real Applied Biosystems 7500 ou 7900 foi usado para amplificação.

Medições metabólicas

Imediatamente antes de sacrifício, o sangue do sinus retro-orbital foi coletado em tubos revestidos com EDTA, seguido por isolamento da fração plasmática. O colesterol total no plasma foi analisado usando um ABX Pentra Cholesterol CP (Horiba Group, Horiba ABX Diagnostics) de acordo com as instruções do fabricante.

Medição de enzimas no fígado (ALT e AST)

Soro de cada camundongo individual foi preparado como segue: amostras de sangue foram armazenadas em temperatura ambiente durante

2 h antes de centrifugação (10 min, 3000 rpm em temperatura ambiente). Após centrifugação, o soro foi coletado e congelado a -20 °C.

Medição de ALT e AST foi realizada em lâminas com 96 cavidades usando reagentes ALT e AST da ABX Pentra de acordo com as instruções do fabricante. Em resumo, amostras de soro foram diluídas 2,5 vezes com H₂O e cada amostra foi avaliada em duplicata. Após a adição de 50 µl de amostra diluída ou padrão (Multical da ABX Pentra) a cada cavidade, 200 µl de mistura de reagente AST ou ALT a 37 °C foram adicionados a cada cavidade. Medições de cinética foram realizadas durante 5 min com um intervalo de 30s a 340 nm e 37 °C usando um espectrofotômetro.

Exemplo 27: Modulação de replicação de Hepatite C pelo LNA-antimiR (SPC3649)

Oligos usados nesse exemplo (letra maiúscula: LNA, letra minúscula DNA, LNA Cs são metila e LNAs são, de preferência, B-D-óxi (o subscrito após o resíduo de LNA):

SPC3649 (LNA-antimiR objetivando miR-122, estava na síntese em pequena escala inicial designado SPC3549)
5'- ^m C _s ^o c _s A _s ^o t _s t _s G _s ^o T _s ^o c _s a _s ^m C _s ^o a _s ^m C _s ^o t _s ^m C _s ^{om} C ^o -3'
SPC3648 (LNA-antimiR objetivando miR-122, estava na síntese em pequena escala inicial designado SPC3548)
5'-A _s ^o t _s t _s G _s ^o T _s ^o c _s a _s ^m C _s ^o a _s ^m C _s ^o t _s ^m C _s ^{om} C ^o -3'
SPC3550 (controle de combinação errônea com 4 nt ao SPC3649) SEQ ID 63
5'- ^m C _s ^o c _s A _s ^o t _s t _s ^m C _s ^o T _s ^o g _s a _s ^m C _s ^o c _s ^m C _s ^o t _s A _s ^{om} C ^o -3'
2'OMe anti-122: Oligo 2'OMe-modificado de comprimento total (23 nt) complementar ao miR-122
2'OMe Ctrl: controle 2'OMe-modificado misturado

Foi mostrado que replicação de hepatite C (HCV) é facilitada pelo miR-122 e, conseqüentemente, foi demonstrado que antagonização do miR-122 afeta a replicação de HCV em um modelo com células de hepatoma *in vitro*. Avalia-se a eficácia do SPC3649 na redução de replicação de

HCV no modelo baseado em células Huh-7. As diferentes moléculas de LNA-antimiR, junto com um 2' OMe oligonucleotídeo anti-sentido e misturado, são transfectadas em células Huh-7, o HCV é deixado se replicar durante 48 horas. Amostras de RNA total extraídas das células Huh-7 são submetidas à análise de Northern blot.

5

Exemplo 28: Oligonucleotídeo anti-sentido LNA-antimiR[®] intensificado objetivando miR-21

Seqüência do miR-21 maduro do Sanger Institute miRBase:

>hsa-miR-21 MIMAT0000076

10 UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA (SEQ ID NO 4)

>mmu-miR-21 MIMAT0000530

UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA (SEQ ID NO 64)

Seqüência de Compostos:

15 SPC3521 miR-21 5'-FAM TCAGtctgataaGCTa-3' (gap-mer design) – (SEQ ID NO 65)

SPC3870 miR-21(mm) 5'-FAM TCCgtcttagaaGATa-3' - (SEQ ID NO 66)

SPC3825 miR-21 5'-FAM TcTgtCAgaTaCgAT-3' (novo design) (SEQ ID NO 67)

SPC3826 miR-21(mm) 5'-FAM TcAgtCTgaTaAgCT-3'- (SEQ ID NO 68)

20 SPC3827 miR-21 5'-FAM TcAGtCTGaTaAgCT-3' (novo design intensificado) - (SEQ ID NO 69)

Todos os compostos têm uma parte principal total ou quase que totalmente tiolada e, aqui, tinham também um rótulo FAM na extremidade 5'.

Foi mostrado que o miR-21 é super-regulado em glioblastoma (Chan e outros, Cancer Research 2005, 65 (14), p6029) e câncer de mama (lorio e outros, Cancer Research 2005, 65 (16), p7065) e, conseqüentemente, ele foi considerado um micro-RNA "oncogênico" potencial. Chan e outros também mostram a indução de apoptose em células de glioblastoma através de antagonização do miR-21 com 2'OMe ou oligonucleotídeos anti-sentido LNA-modificados. Conseqüentemente, agentes que antagonizam o miR-21 têm o potencial para se tornarem produtos terapêuticos para o tratamento de glioblastoma e outros tumores sólidos, tal como câncer de mama. Apresen-

30

tou-se um oligonucleotídeo LNA-intensificado objetivando o miR-21, um LNA-antimiR[®], com propriedades surpreendentemente boas para inibir o miR-21 adequado para as finalidades terapêuticas acima mencionadas.

5 Vias de administração terapêuticas adequadas são, por exemplo, injeções intracranianas em glioblastomas, injeções intratumorais em glioblastoma e câncer de mama, bem como distribuição sistêmica em câncer de mama.

Inibição de miR-21 na linhagem de célula de glioblastoma U373 e na linhagem de célula de câncer de mama MCF-7.

10 A eficácia do presente LNA-antimiR[®] é avaliada através de transfecção em diferentes concentrações, junto com oligonucleotídeos de controle, nas linhagens de células U373 e MCF-7 conhecidas por expressar miR-21 (ou outras linhagens de células expressando miR-21 também). Transfecção é realizada usando um protocolo padrão com Lipofectamine2000 (Invitrogen). 24 horas pós-transfecção, as células são coletadas e o RNA total extraído usando o protocolo com Trizol (Invitrogen). Avaliação dos níveis de miR-21, dependendo do tratamento e da concentração usada, é feita através de RT-PCR em tempo real miR-21-específica "stem-loop" (Applied Biosystems) ou, alternativamente, através de análises de Northern blot
15 miR-21-específicas não radioativas. Os níveis de miR-21 detectados, comparado com o controle de veículo, refletem o potencial inibitório do LNA-antimiR[®].
20

Inibição funcional de miR-21 através de avaliação de super-regulação do gene de miR-21 alvo.

25 O efeito de antagonismo de miR-21 é investigado através de clonagem da seqüência do miR-21 alvo perfeitamente combinada por trás de um sistema repórter de luciferase *Renilla* padrão (entre a seqüência de codificação e a 3' UTR, psiCHECK-2, Promega) – veja Exemplo 29. A estrutura repórter e o LNA-antimiR[™] serão co-transfectados em linhagens de célula expressando miR-21 (f. ex. U373, MCF-7). As células são coletadas 24 horas pós-transfecção em tampão de lise passiva e a atividade de luciferase é medida de acordo com um protocolo padrão (Promega, Dual Luciferase Re-
30

porter Assay System). A indução de atividade de luciferase é usada para demonstrar o efeito funcional de antagonismo de miR-121 do LNA-antimiR®.

Exemplo 29: Ensaio com o repórter Luciferase para avaliação de inibição funcional de micro-RNA por LNA-antimiRs e outros oligos objetivando micro-

- 5 RNA: Generalização de novo design e novo design intensificado como designs preferidos para bloqueio de função de micro-RNA

Oligos usados nesse exemplo (letra maiúscula: LNA, letra minúscula: DNA) para avaliar o efeito de reversão de repressão de LNA-antimiR sobre o repórter luciferase com a seqüência do micro-RNA alvo a-

- 10 através de bloqueio do respectivo micro-RNA:

alvo: hsa-miR-122a MIMAT0000421	
uggagugugacaauggguguuugu	
Seleção na linhagem de célula HUH-7 expressando miR-122	
Oligo #, micro-RNA alvo, seqüência de oligo	Design
3962: miR-122 5'-ACAAacaccattgtcacacTCCA-3'	Complemento total, gap
3965: miR-122 5'-acaaacACCATTGTcactcca-3'	Complemento total, bloco
3972: miR-122 5'-acAaaCacCatTgtCacActCca-3'	Complemento total, LNA_3
3549 (3649):miR-122 5'-CcAttGTcaCaCtCC-3'	Novo design
3975: miR-122 5'-CcAtTGTcaCACtCC-3'	Novo design intensificado
alvo: hsa-miR-19b MIMAT0000074	
ugugcaaaucgaugcaaaacuga	
Seleção na linhagem de célula HeLa expressando miR-19b	
Oligo #, micro-RNA alvo, seqüência de oligo	Design
3963: miR-19b 5'-TCAGtttgcattgattgCACA-3'	Complemento total, gap
3967: miR-19b 5'-tcagttTTGCATGGattgcaca-3'	Complemento total, bloco
3973: miR-19b 5'-tcAgtTtGcaTggAttTgcAca-3'	Complemento total, LNA_3
3560: miR-19b 5'-TgCatGGatTtGcAC-3'	Novo design
3976: miR-19b 5'-TgCaTGGatTTGcAC-3'	Novo design intensificado

alvo: hsa-miR-155 MIMAT0000646	
uuaaugcuaaucgugauagggg	
Seleção na linhagem de célula 518A2 expressando miR-155	
Oligo #, micro-RNA alvo, seqüência de oligo	Design
3964: miR-155 5'-CCCCtatcacgattagcaTTAA-3'	Complemento total, gap
3968: miR-155 5'-cccctaTCACGATTtagcattaa-3'	Complemento total, bloco
3974: miR-155 5'-cCccTatCacGatTagCatTaa-3'	Complemento total, LNA_3
3758: miR-155 5'-TcAcgATtaGcAtTA-3'	Novo design
3818: miR-155 5'-TcAcGATtaGCAtTA-3'	Novo design intensificado

SEQ ID NOs conforme antes.

Um plasmídeo repórter (psiCheck-2 Promega) que codifica as variantes Renilla e Firefly de luciferase, foi manipulado de modo que a 3'UTR da luciferase Renilla incluísse uma única cópia de uma seqüência totalmente complementar ao miRNA sob investigação.

Células expressando endogenamente os miRNAs investigados (HuH-7 para miR-122a, HeLa para miR-19b, 518A2 para miR-155) foram co-transfectadas com LNA-antimiRs ou outros oligonucleotídeos de ligação a miR (o complemento total, isto é, comprimento total) e o plasmídeo repórter de micro-RNA alvo correspondente usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen). A transfecção e medição de atividade de luciferase foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante (kit Invitrogen Lipofectamine 2000/Promega Dual-luciferase) usando 150 000 to 300 000 células por cavidade em lâminas com 6 cavidades. Para compensar variação nas densidades de células e eficiências de transfecção, o sinal de luciferase Renilla foi normalizado com o sinal de luciferase Firefly. Todos os experimentos foram feitos em triplicata.

Surpreendentemente, o novo design e o novo design intensificado eram os inibidores mais funcionais para todos os três micro-RNAs alvo, miR-155, miR-19b e miR-122 (figuras 27, 28, 29). Os resultados são resumidos na tabela 3 a seguir.

Sumário dos Resultados:

Design	miR-155	miR-19b	miR-122a
Novo design intensificado	***	***	Sem dados
Novo design	***	***	***
Complemento total, LNA_3	**	***	**
Complemento total, bloco	**	**	**
Complemento total, gap	*	Não signif.	Não signif.

Tabela 3. Grau de reversão de repressão de função de miR-155, miR-19b e miR-122a endógenos por vários designs de LNA-antimiR's.

Referências

- Abelson, J.F. e outros 2005. *Science* 310: 317-20.
- Bartel, D.P. 2004. *Cell* 116: 281-297.
- Boehm, M., Slack, F. 2005. *Science*. 310:1954-7.
- 5 Brennecke, J. e outros 2003 *Cell* 113: 25-36.
- Calin, G.A. e outros 2002. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 15524– 15529.
- Calin, G. A. e outros 2004. *Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A.* 101: 2999-3004.
- 10 Calin, G.A. e outros 2005. *N. Engl. J. Med.* 353:1793-801
- Chan, J.A.e outros 2005. *Cancer Res.* 65:6029-33.
- Chen, C.Z., e outros 2004. *Science* 303: 83–86.
- Chen, J.F., e outros 2005. *Nat Genet.* Dec 25, publicação antecipada online.
- 15 Eis, P.S. e outros 2005. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102: 3627-32.
- Giraldez, A.J. e outros 2005. *Science* 308: 833–838.
- Griffiths-Jones, S. e outros 2004. *Nucleic Acids Res.* 32: D109–D111.
- Griffiths-Jones, S., e outros 2006. *Nucleic Acids Res.* 34: D140-4
- 20 He, L. e outros 2005. *Nature* 435: 828– 833.
- Hornstein, E. e outros 2005. *Nature* 438: 671-4.
- Hutvagner, G. e outros 2001. *Science* 293: 834–838.
- Hutvagner, G. e outros 2004. *PLoS Biology* 2: 1-11.
- Iorio, M.V. e outros 2005. *Cancer Res.* 65: 7065-70.
- 25 Jin, P. e outros 2004. *Nat Cell Biol.* 6: 1048-53.
- Johnson, S.M. e outros 2005. *Cell* 120: 635–647.
- Jopling, C.L. e outros 2005. *Science* 309:1577-81.
- Ketting, R.F. e outros 2001. *Genes Dev.* 15: 2654–2659.
- Kwon, C. e outros 2005. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102: 18986-30 91.
- Landthaler, M. e outros 2004. *Curr. Biol.* 14: 2162–2167.
- Leaman, D. e outros 2005. *Cell* 121: 1097-108.

- Lee, Y., e outros 2003. *Nature* 425: 415–419.
- Li, X. e Carthew, R.W. 2005. *Cell* 123: 1267-77.
- Lu. J. e outros 2005. *Nature* 435: 834–838.
- Michael, M.Z.e outros 2003. *Mol. Cancer Res.* 1: 882– 891.
- 5 Nelson, P. e outros 2003. *TIBS* 28: 534-540.
- Paushkin, S., e outros 2002.*Curr.Opin.Cell Biol.* 14: 305-312.
- Poy, M.N. e outros 2004. *Nature* 432: 226–230.
- Wienholds, E. e outros 2005. *Science* 309: 310-311.
- Yekta, S. e outros 2004. *Science* 304: 594-596.
- 10 Zhao, Y. e outros 2005. *Nature* 436: 214–220.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

<110> Santaris A/S

<120> COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA

<130> 16870PCT00

<160> 109

<170> PatentIn versão 3.3

<210> 1
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<400> 1
 uggaguguga caaugguguu ugu 23

<210> 2
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 ugugcaaauc caugcaaaac uga 23

<210> 3
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Homos sapiens

<400> 3
 uuaaugcuaa ucgugauagg gg 22

<210> 4
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 uagcuuauca gacugauguu ga 22

<210> 5
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> homo sapiens

<400> 5
 uuuguucguu cggcucgcu ga 22

<210> 6
 <211> 6
 <212> DNA
 <213> homo sapiens

<400> 6
 tttgca 6

<210> 7
 <211> 6
 <212> DNA
 <213> homo sapiens

 <400> 7
 acactc 6

<210> 8
 <211> 6
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 8
 agcatt 6

<210> 9
 <211> 6
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 9
 cgaaca 6

<210> 10
 <211> 6
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 10
 ataagc 6

<210> 11
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> artificial

 <220>
 <223> Gap-mero de complemento total, LNA nas posições 1-4 e 20-23

 <400> 11
 acaaacacca ttgtcacact cca 23

<210> 12
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> artificial

 <220>
 <223> Bloc-âmero de complemento total, LNA nas posições 7-14

 <400> 12
 acaaacacca ttgtcacact cca 23

<210> 13
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> artificial

 <220>

<223> Mix-âmero de LNA de complemento total na terceira posição e a cada três posições depois

<400> 13
 acaaacacca ttgtcacact cca 23

<210> 14
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> Unidades de LNA nas posições 1, 3, 6, 7, 10, 12, 14 e 15
 <400> 14
 ccattgtcac actcc 15

<210> 15
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> Unidades de LNA nas posições 1, 3, 5, 6, 7, 10, 11, 12, 14, 15
 <400> 15
 ccattgtcac actcc 15

<210> 16
 <211> 13
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> Unidades de LNA nas posições 1-5, 7-10, 12 & 13.
 <400> 16
 attgtcacac tcc 13

<210> 17
 <211> 11
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> LNA Unidades de LNA nas posições 1-3, 5-8, 10 & 11.
 <400> 17
 tgtcacactc c 11

<210> 18
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> Todos resíduos de LNA, exceto nas posições 2, 4, 5, 8, 9, 11, 13 as quais são 2'OME
 <400> 18
 ccattgtcac actcc 15

<210> 19
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> artificial

 <220>
 <223> Todos resíduos de LNA, exceto nas posições 2, 4, 5, 8, 9, 11, 13 as
 quais são 2'fluoro

 <400> 19
 ccattgtcac actcc 15

 <210> 20
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> artificial

 <220>
 <223> Gap-mero de complemento total, LNA nas posições 1-4 e 20-23

 <400> 20
 tcagttttgc atggatttgc aca 23

 <210> 21
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> artificial

 <220>
 <223> Bloc-âmero de complemento total, LNA nas posições 7-14

 <400> 21
 tcagttttgc atggatttgc aca 23

 <210> 22
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> artificial

 <220>
 <223> Full complement LNA mixmer- LNA at third position and every
 third position thereafter

 <400> 22
 tcagttttgc atggatttgc aca 23

 <210> 23
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> artificial

 <220>
 <223> LNA units at position 1, 3, 6, 7, 10, 12, 14 and 15

 <400> 23
 tgcattgatt tgcac 15

 <210> 24
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> LNA units at positions 1, 3, 5, 6, 7, 10, 11, 12, 14, 15

 <400> 24
 tgcattgatt tgcac 15

 <210> 25
 <211> 13
 <212> DNA
 <213> artificial

 <220>
 <223> LNA units at positions 1, 3-5, 7-10, 12 & 13.

 <400> 25
 catgatttg cac 13

 <210> 26
 <211> 11
 <212> DNA
 <213> artificial

 <220>
 <223> LNA Unidades de LNA nas posições 1-3, 5-8, 10 & 11.

 <400> 26
 tggatttgca c 11

 <210> 27
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> artificial

 <220>
 <223> Todos resíduos de LNA, exceto nas posições 2, 4, 5, 8, 9, 11, 13 as
 quais são 2'OME

 <400> 27
 tgcattgatt tgcac 15

 <210> 28
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> artificial

 <220>
 <223> Todos resíduos de LNA, exceto nas posições 2, 4, 5, 8, 9, 11, 13 as
 quais são 2'OME
 2'fluoro

 <400> 28
 tgcattgatt tgcac 15

 <210> 29
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> artificial

 <220>
 <223> Gap-mero de complemento total, LNA nas posições 1-4 e 20-23

<400> 29
 cccctatcac gattagcatt aa 22

<210> 30
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> Bloc-âmero de complemento total, LNA nas posições 7-14

<400> 30
 cccctatcac gattagcatt aa 22

<210> 31
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> Full complement LNA mixmer- LNA at third position and every
 third position thereafter

<400> 31
 cccctatcac gattagcatt aa 22

<210> 32
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> LNA units at positions 1, 3, 6, 7, 10, 12, 14, 15

<400> 32
 tcacgattag catta 15

<210> 33
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> LNA units at positions 1, 3, 5, 6, 7, 10, 11, 12, 14, 15

<400> 33
 tcacgattag catta 15

<210> 34
 <211> 13
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> LNA units at positions 1-5, 8-11, 12 & 13.

<400> 34
 acgattagca tta 13

<210> 35
 <211> 11

<212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> LNA units at positions 1-3, 5-7, and 9-11

<400> 35
 gattagcatt a 11

<210> 36
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> Todos resíduos de LNA, exceto nas posições 2, 4, 5, 8, 9, 11, 13 as
 quais são 2'OME

<400> 36
 tcacgattag catta 15

<210> 37
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> Todos resíduos de LNA, exceto nas posições 2, 4, 5, 8, 9, 11, 13 as
 quais são 2'OME
 2'fluoro

<400> 37
 tcacgattag catta 15

<210> 38
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> Gap-mero de complemento total, LNA nas posições 1-4 e 20-23

<400> 38
 tcaacatcag tctgataagc ta 22

<210> 39
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> Bloc-âmero de complemento total, LNA nas posições 7-14

<400> 39
 tcaacatcag tctgataagc ta 22

<210> 40
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> Full complement LNA mixmer- LNA at third position and every
 third position thereafter

<400> 40
 tcatcatcag tctgataagc tt 22

<210> 41
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> LNA units at position 1, 3, 6, 7, 10, 12, 14 and 15

<400> 41
 tcagtctgat aagct 15

<210> 42
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> LNA units at positions 1, 3, 5, 6, 7, 10, 11, 12, 14, 15

<400> 42
 tcagtctgat aagct 15

<210> 43
 <211> 13
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> Unidades de LNA nas posições 1-5, 7-10, 12 & 13.

<400> 43
 agtctgataa gct 13

<210> 44
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> LNA units at positions 1-3, 5, 7-11

<400> 44
 tcagtctgat aagct 15

<210> 45
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> Todos resíduos de LNA, exceto nas posições 2, 4, 5, 8, 9, 11, 13 as
 quais são 2'OME

<400> 45

tcagtctgat aagct 15

<210> 46
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> Todos resíduos de LNA, exceto nas posições 2, 4, 5, 8, 9, 11, 13 as
 quais são 2'OME
 2'fluoro

<400> 46
 tcagtctgat aagct 15

<210> 47
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> Gap-mero de complemento total, LNA nas posições 1-4 e 20-23

<400> 47
 tctcgcgtgc cgttcgttct tt 22

<210> 48
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> Blockmer, LNA at positions 7-14

<400> 48
 tctcgcgtgc cgttcgttct tt 22

<210> 49
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> Full complement LNA mixmer- LNA at third position and every
 third position thereafter

<400> 49
 tctcgcgtgc cgttcgttct tt 22

<210> 50
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> LNA at positions 1, 3, 6, 7, 10, 12, 14, 15

<400> 50
 gtgccgttcg ttctt 15

<210> 51

<211> 15
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> LNA at positions 1, 3, 5-7, 10-12, 14 & 15

<400> 51
 gtgccgttcg ttctt 15

<210> 52
 <211> 13
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> LNA at positions 1-5, 7, 9-13

<400> 52
 gccgttcggt ctt 13

<210> 53
 <211> 11
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> LNA at positions 1-4, 6-11

<400> 53
 cgttcgttct t 11

<210> 54
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> Todos resíduos de LNA, exceto nas posições 2, 4, 5, 8, 9, 11, 13 as
 quais são 2'OME

<400> 54
 gtgccgttcg ttctt 15

<210> 55
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> Todos resíduos de LNA, exceto nas posições 2, 4, 5, 8, 9, 11, 13 as
 quais são 2'OME
 2'fluoro

<400> 55
 gtgccgttcg ttctt 15

<210> 56
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> Phosphorothioate backbone, LNA at position 2 and every third thereafter.

 <400> 56
 ccattgtcac actcca 16

 <210> 57
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> artificial

 <220>
 <223> Phosphorothioate backbone, LNA at position 3 and every third thereafter.

 <400> 57
 ccattgtcac actcca 16

 <210> 58
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> artificial

 <220>
 <223> Phosphorothioate backbone - Gapmer design with LNA at positions 1-3, & 13-15

 <400> 58
 ccattgtcac actcca 16

 <210> 59
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> artificial

 <220>
 <223> Phosphorothioate backbone, LNA at positions 1, 3, 6, 7, 10, 12, 14 & 15

 <400> 59
 ccattgtcac actcc 15

 <210> 60
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> artificial

 <220>
 <223> Phosphorothioate backbone, LNA at positions 1, 3, 6, 7, 10, 12, 14 & 15, LNA cytosines are methylated

 <400> 60
 ccattctgac cctac 15

 <210> 61
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> artificial

 <220>

<223> Phosphorothioate backbone, LNA at position 3 and every third thereafter

<400> 61
ccattgtctc aatcca 16

<210> 62
<211> 13
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Phosphorothioate backbone, LNA at position 1, 4, 5, 8, 10, 12 & 13

<400> 62
attgtcacac tcc 13

<210> 63
<211> 15
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Fully phosphorothioate, LNA at positions 1, 3, 6, 7, 10, 12, 14 & 16, all C LNAs are methylated. LNA is preferably Beta-D-oxy LNA.

<400> 63
ccattctgac cctac 15

<210> 64
<211> 22
<212> RNA
<213> Homo sapiens

<400> 64
uagcuauca gacugauguu ga 22

<210> 65
<211> 16
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Gapmer design, Optional FAM label at 5' end, LNA at positions 1-3 and 13-15.

<400> 65
tcagtctgat aagcta 16

<210> 66
<211> 16
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Gapmer design, Optional FAM label at 5' end, LNA at positions 1-3 and 13-15.

<400> 66

tccgtcttag aagata 16

<210> 67
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> Optional FAM label at 5' end, LNA at positions 1, 3, 6, 7, 10, 12, 13 & 15

<400> 67
 tctgtcagat acgat 15

<210> 68
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> Optional FAM label at 5' end, LNA at positions 1, 3, 6, 7, 10, 12, 13 & 15

<400> 68
 tcagtctgat aagct 15

<210> 69
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> Optional FAM label at 5' end, LNA at positions 1, 3, 4 6, 7, 8, 10, 12, 14 & 15

<400> 69
 tcagtctgat aagct 15

<210> 70
 <211> 7
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 70
 atttgca 7

<210> 71
 <211> 8
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 71
 gatttgca 8

<210> 72
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 72

ggctttgca	9
<210> 73	
<211> 7	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 73	
cacactc	7
<210> 74	
<211> 8	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 74	
tcacactc	8
<210> 75	
<211> 9	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 75	
gtcacactc	9
<210> 76	
<211> 7	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 76	
tagcatt	7
<210> 77	
<211> 8	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 77	
ttagcatt	8
<210> 78	
<211> 9	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 78	
attagcatt	9
<210> 79	
<211> 7	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 79	
acgaaca	7
<210> 80	

<211> 8
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 80
 aacgaaca 8

<210> 81
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 81
 gaacgaaca 9

<210> 82
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> artificial

 <220>
 <223> DNA/LNA oligonucleotide, LNA at position 3 and every third base thereafter. Preferably phosphorothioate, preferably oxy-LNA. Preferably LNA Cs are methylated.

 <400> 82
 tgcattgatt tgcaca 16

<210> 83
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> DNA/LNA oligonucleotide, LNA at position 3 and every third base thereafter. Preferably phosphorothioate, preferably oxy-LNA. Preferably LNA Cs are methylated.

 <400> 83
 tgcattgatt tgcac 15

<210> 84
 <211> 13
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> DNA/LNA oligonucleotide, LNA at position 1 and every third base thereafter. Preferably phosphorothioate, preferably oxy-LNA. Preferably LNA Cs are methylated.

 <400> 84
 catgatttg cac 13

<210> 85
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> DNA/LNA oligonucleotide, LNA at position 2 and every other base thereafter. Preferably phosphorothioate, preferably oxy-LNA.

Preferably LNA Cs are methylated.

- <400> 85
tgcattgatt tgcac 15
- <210> 86
<211> 13
<212> DNA
<213> Artificial
- <220>
<223> DNA/LNA oligonucleotide, LNA at position 2 and every other base thereafter. Preferably phosphorothioate, preferably oxy-LNA. Preferably LNA Cs are methylated.
- <400> 86
catggatttg cac 13
- <210> 87
<211> 13
<212> DNA
<213> Artificial
- <220>
<223> DNA/LNA oligonucleotide, LNA at position 1, 4, 5, 8, 10, 12 & 13. Preferably phosphorothioate, preferably oxy-LNA. Preferably LNA Cs are methylated.
- <400> 87
catggatttg cac 13
- <210> 88
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial
- <220>
<223> DNA/LNA oligonucleotide, LNA at position 1, 3, 6, 7, 10, 12, 14 & 15. Preferably phosphorothioate, preferably oxy-LNA. Preferably LNA Cs are methylated.
- <400> 88
tgcattgatt tgcac 15
- <210> 89
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial
- <220>
<223> DNA/LNA oligonucleotide, LNA at position 1, 3, 5, 7, 9, 10, 14 & 15. Preferably phosphorothioate, preferably oxy-LNA. Preferably LNA Cs are methylated.
- <400> 89
tgcattgatt tgcaca 16
- <210> 90
<211> 16
<212> DNA
<213> artificial

- <220>
 <223> DNA/LNA oligonucleotide, LNA at position 2 and every other base thereafter. Preferably phosphorothioate, preferably oxy-LNA. Preferably LNA Cs are methylated.
- <400> 90
 ccattgtcac actcca 16
- <210> 91
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> artificial
- <220>
 <223> DNA/LNA oligonucleotide, LNA at position 2 and every thris base thereafter. Preferably phosphorothioate, preferably oxy-LNA. Preferably LNA Cs are methylated.
- <400> 91
 ccattgtaac tctcca 16
- <210> 92
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> artificial
- <220>
 <223> DNA/LNA oligonucleotide, LNA at position 3 and every third base thereafter. Preferably phosphorothioate, preferably oxy-LNA. Preferably LNA Cs are methylated.
- <400> 92
 ccattgtcac actcca 16
- <210> 93
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> artificial
- <220>
 <223> DNA/LNA oligonucleotide, LNA at position 2 and every third base thereafter. Preferably phosphorothioate, preferably oxy-LNA. Preferably LNA Cs are methylated.
- <400> 93
 ccattgtcac actcc 15
- <210> 94
 <211> 13
 <212> DNA
 <213> artificial
- <220>
 <223> DNA/LNA oligonucleotide, LNA at position 3 and every third base thereafter. Preferably phosphorothioate, preferably oxy-LNA. Preferably LNA Cs are methylated.
- <400> 94
 attgtcacac tcc 13
- <210> 95
 <211> 15

<212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> DNA/LNA oligonucleotide, LNA at position 3 and every third base thereafter. Preferably phosphorothioate, preferably oxy-LNA. Preferably LNA Cs are methylated.

<400> 95
 ccattgtcac actcc 15

<210> 96
 <211> 13
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> DNA/LNA oligonucleotide, LNA at position 1 and every third base thereafter. Preferably phosphorothioate, preferably oxy-LNA. Preferably LNA Cs are methylated.

<400> 96
 attgtcacac tcc 13

<210> 97
 <211> 13
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> DNA/LNA oligonucleotide, LNA at position 2 and every other base thereafter. Preferably phosphorothioate, preferably oxy-LNA. Preferably LNA Cs are methylated.

<400> 97
 attgtcacac tcc 13

<210> 98
 <211> 13
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> DNA/LNA oligonucleotide, LNA at position 1, 4, 5, 8, 10, 12 & 13. Preferably phosphorothioate, preferably oxy-LNA. Preferably LNA Cs are methylated.

<400> 98
 attgtcacac tcc 13

<210> 99
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> DNA/LNA oligonucleotide, LNA at position 1, 3, 6, 7, 10, 12, 14 & 15. Preferably phosphorothioate, preferably oxy-LNA. Preferably LNA Cs are methylated.

<400> 99
 ccattgtcac actcc 15

<210> 100
<211> 16
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> DNA/LNA oligonucleotide, LNA at position 1, 4, 7, 11, 15.
Preferably phosphorothioate, preferably oxy-LNA. Preferably LNA
Cs are methylated.

<400> 100
ccattgtcac actcca 16

<210> 101
<211> 16
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> DNA/LNA gapmer oligonucleotide, LNA at position 1-3, & 13-15,
Preferably phosphorothioate, preferably oxy-LNA. Preferably LNA
Cs are methylated.

<400> 101
ccattgtcac actcca 16

<210> 102
<211> 16
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> DNA/LNA oligonucleotide, LNA at position 2 and every third base
thereafter. Preferably phosphorothioate, preferably oxy-LNA.
Preferably LNA Cs are methylated.

<400> 102
tcacgattag catta 16

<210> 103
<211> 16
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> DNA/LNA oligonucleotide, LNA at position 3 and every third base
thereafter. Preferably phosphorothioate, preferably oxy-LNA.
Preferably LNA Cs are methylated.

<400> 103
atcagatta gcatta 16

<210> 104
<211> 16
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> DNA/LNA oligonucleotide, LNA at position 1 and every other base
thereafter. Preferably phosphorothioate, preferably oxy-LNA.
Preferably LNA Cs are methylated.

<400> 104
 tcacgattag cattaa 16

<210> 105
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> DNA/LNA oligonucleotide, LNA at position 1, 4, 6, 8, 10, 12, 14 & 16. Preferably phosphorothioate, preferably oxy-LNA. Preferably LNA Cs are methylated.

<400> 105
 atcacgatta gcatta 16

<210> 106
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> DNA/LNA oligonucleotide, LNA at position 2 and every third base thereafter. Preferably phosphorothioate, preferably oxy-LNA. Preferably LNA Cs are methylated.

<400> 106
 gagccgaacg aacaa 15

<210> 107
 <211> 13
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> DNA/LNA oligonucleotide, LNA at position 3 and every third base thereafter. Preferably phosphorothioate, preferably oxy-LNA. Preferably LNA Cs are methylated.

<400> 107
 gccgaacgaa caa 13

<210> 108
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> DNA/LNA oligonucleotide, LNA at position 1 and every other base thereafter. Preferably phosphorothioate, preferably oxy-LNA. Preferably LNA Cs are methylated.

<400> 108
 gagccgaacg aacaa 15

<210> 109
 <211> 13
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> DNA/LNA oligonucleotide, LNA at position 1 and every other base

thereafter. Preferably phosphorothioate, preferably oxy-LNA.
Preferably LNA Cs are methylated.

<400> 109
gccgaacgaa caa

REIVINDICAÇÕES

1. Composição farmacêutica compreendendo um oligonucleotídeo de fita única ou um conjugado do mesmo tendo um comprimento de 8 a 26 unidades de nucleobase e um diluente, veículo ou adjuvante farmacêuticamente aceitável, em que o oligonucleotídeo compreende uma seqüência de DNA central das posições dois a sete ou das posições três a oito, contando a partir da extremidade 3' de 3' acgttt 5' (SEQ ID NO 6) em que pelo menos uma, tal como uma, de preferência pelo menos duas, tal como duas ou três, unidades de DNA na referida seqüência foram substituídas por sua unidade de LNA correspondente.

2. Composição farmacêutica compreendendo um oligonucleotídeo de fita única ou um conjugado do mesmo, tendo um comprimento de 8 a 26 unidades de nucleobase e um diluente, veículo ou adjuvante farmacêuticamente aceitável, em que o oligonucleotídeo compreende uma seqüência de DNA central das posições dois a sete ou das posições três a oito, contando a partir da extremidade 3' de 3' ctaca 5' (SEQ ID NO 7) em que pelo menos uma, tal como uma, de preferência pelo menos duas, tal como duas ou três, unidades de DNA na referida seqüência foram substituídas por sua unidade de LNA correspondente.

3. Composição farmacêutica compreendendo um oligonucleotídeo de fita única ou um conjugado do mesmo, tendo um comprimento de 8 a 26 unidades de nucleobase e um diluente, veículo ou adjuvante farmacêuticamente aceitável, em que o oligonucleotídeo compreende uma seqüência de DNA central das posições dois a sete ou das posições três a oito, contando a partir da extremidade 3' de 3' ttacga 5' (SEQ ID NO 8) em que pelo menos uma, tal como uma, de preferência pelo menos duas, tal como duas ou três, unidades de DNA na referida seqüência foram substituídas por sua unidade de LNA correspondente.

4. Composição farmacêutica compreendendo um oligonucleotídeo de fita única ou um conjugado do mesmo, tendo um comprimento de 8 a 26 unidades de nucleobase e um diluente, veículo ou adjuvante farmacêuticamente aceitável, em que o oligonucleotídeo compreende uma seqüência

de DNA central das posições dois a sete ou das posições três a oito, contando a partir da extremidade 3' de 3' acaagc 5' (SEQ ID NO 9) em que pelo menos uma, tal como uma, de preferência pelo menos duas, tal como duas ou três, unidades de DNA na referida seqüência foram substituídas por sua
5 unidade de LNA correspondente.

5. Composição farmacêutica compreendendo um oligonucleotídeo de fita única ou um conjugado do mesmo, tendo um comprimento de 8 a 26 unidades de nucleobase e um diluente, veículo ou adjuvante farmacêuticamente aceitável, em que o oligonucleotídeo compreende uma seqüência
10 de DNA central das posições dois a sete ou das posições três a oito, contando a partir da extremidade 3' de 3' cgaata 5' (SEQ ID NO 10) em que pelo menos uma, tal como uma, de preferência pelo menos duas, tal como duas ou três, unidades de DNA na referida seqüência foram substituídas por sua unidade de LNA correspondente e em que o referido oligonucleotídeo não
15 compreende uma região de mais de 7 unidades contínuas de DNA.

6. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 – 5, em que a seqüência de nucleobase do oligonucleotídeo é complementar a uma seqüência de nucleotídeo presente em uma seqüência de micro-RNA humana selecionada do grupo consistindo em
20 (miR 19b) UGUGCAAUCCAUGCAAACUGA (SEQ ID 1)
(miR 122a) UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUGU (SEQ ID 2)
(miR 155) UUAAUGC UAAUCGUGAUAGGGG (SEQ ID 3)
(miR 375) UUUGUUCGUUCGGCUCGCGUGA (SEQ ID 4)
(miR 21) UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA (SEQ ID 5).

25 7. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 – 6, em que o oligonucleotídeo tem um comprimento de entre 10 – 17 nucleobases.

8. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 – 6, em que o oligonucleotídeo tem um comprimento de entre
30 10 – 16 nucleobases.

9. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 – 6, em que o oligonucleotídeo tem um comprimento de en-

tre 12 – 26 nucleobases.

10. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, em que pelo menos duas unidades de DNA das posições um a seis, dois a sete ou três a oito, do oligonucleotídeo, contando a partir da extremidade 3', foram substituídas por sua unidade de LNA correspondente e em que as unidades de LNA são separadas por pelo menos uma unidade de DNA.

11. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, em que pelo menos três unidades de DNA das posições um a seis, dois a sete ou três a oito, do oligonucleotídeo, contando a partir da extremidade 3', foram substituídas por sua unidade de LNA correspondente e em que as unidades de LNA são separadas por pelo menos uma unidade de DNA.

12. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 10 ou 11, em que o número de unidades consecutivas de DNA das posições um a seis, dois a sete ou três a oito, do oligonucleotídeo, contando a partir da extremidade 3', é no máximo dois.

13. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 12 em que cada segundo nucleotídeo das posições um a seis, dois a sete ou três a oito, do oligonucleotídeo, contando a partir da extremidade 3', é uma unidade de LNA.

14. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 12, em que cada três nucleotídeos das posições um a seis, dois a sete ou três a oito, do oligonucleotídeo, contando a partir da extremidade 3', é uma unidade de LNA.

15. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-14, em que o número total de unidades de LNA das posições um a seis, dois a sete ou três a oito, do oligonucleotídeo, contando a partir da extremidade 3' está entre 2 e 6 unidades de LNA.

16. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 - 15, em que a primeira nucleobase do oligonucleotídeo, contando a partir da extremidade 3', é um análogo de nucleotídeo, tal como

uma unidade de LNA.

17. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 - 16, em que a segunda nucleobase do oligonucleotídeo, contando a partir da extremidade 3', é um análogo de nucleotídeo, tal como
5 uma unidade de LNA.

18. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 - 17, em que o padrão de substituição para as nucleobases nas posições um a seis, dois a sete ou três a oito, do oligonucleotídeo, contando a partir da extremidade 3', é selecionado do grupo consistindo em
10 xxXxxX, xxXxXx, xXxxXx, xXxXxx, XxxXxx, xXxXxX, XxXxXx, XxxXxX e XxXxxX; xxXxxX, xXxxXx, XxxXxx, xXxXxX e XxXxXx; em que "X" denota um análogo de nucleotídeo tal como uma unidade de LNA e "x" denota uma unidade de DNA.

19. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 - 18, em que o padrão de substituição para as nucleobases nas posições um a sete, dois a oito ou três a nove, do oligonucleotídeo, contando a partir da extremidade 3', é selecionado do grupo consistindo em
15 xxXxxXx, xxXxXxx, xXxxXxx, xxXxXxX,, xXxxXxX, XxXxXxX e XxXxXxx; em que "X" denota um análogo de nucleotídeo tal como uma unidade de LNA e "x" denota uma unidade de
20 DNA.

20. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 - 19, em que o padrão de substituição para as nucleobases
25 nas posições um a oito, dois a nove ou três a dez, do oligonucleotídeo, contando a partir da extremidade 3', é selecionado do grupo consistindo em xxXxxXxx, XxXxXxXx; xxXxxXxx, xXxxXxxX, XxxXxxXx, xXxXxXxX, XxXxXxXx e XxXxXxxX; em que "X" denota um análogo de nucleotídeo tal como uma unidade de LNA e "x" denota uma unidade
30 de DNA.

21. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 - 20, em que o padrão de substituição para as nucleobases nas posições um a nove, dois a dez ou três a onze, do oligonucleotídeo, contando a partir da extremidade 3', é selecionado do grupo consistindo em
5 xxXxxXxxX, XxXxXxxXx e XxXxXxXxX; em que "X" denota um análogo de nucleotídeo tal como uma unidade de LNA e "x" denota uma unidade de DNA.
- 10 22. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 - 21, em que o oligonucleotídeo compreende uma região de seqüência de nucleobase contínua a qual é 100% complementar à região cultivada de micro-RNA humano.
- 15 23. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 - 22, em que o nono e/ou o décimo nucleotídeo do oligonucleotídeo, contando a partir da extremidade 3', é um análogo de nucleotídeo, tal como uma unidade de LNA.
- 20 24. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 - 23, em que o oligonucleotídeo não compreende uma região de mais de 5 unidades de nucleotídeo de DNA consecutivas.
- 25 25. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 - 24, em que o oligonucleotídeo compreende pelo menos uma região consistindo em pelo menos duas unidades análogas de nucleotídeo consecutivas, tal como pelo menos duas unidades consecutivas de LNA.
- 26 26. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 - 25, em que o oligonucleotídeo não compreende uma região de mais de 7 unidades análogas de nucleotídeo consecutivas, tais como unidades de LNA.
- 30 27. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 26, em que o oligonucleotídeo não compreende uma região de mais de 3 unidades análogas de nucleotídeo consecutivas, tais como unidades de LNA.
28. Composição farmacêutica de acordo com as reivindicações

1 - 27, em que a seqüência de nucleobase do oligonucleotídeo a qual é complementar à seqüência da região de cultura de micro-RNA, é selecionada do grupo consistindo em (X)Xxxxxx, (X)xXxxxx, (X)xxXxxx, (X)xxxXxx, (X)xxxxXx e (X)xxxxxX, conforme lido em uma direção 3'-5', em que "X" denota um análogo de nucleotídeo, (X) denota um análogo de nucleotídeo op-
 5 cional, tal como uma unidade de LNA, e "x" denota uma unidade de nucleotídeo de DNA ou RNA.

29. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 - 28, em que o oligonucleotídeo compreende pelo menos
 10 duas unidades análogas de nucleotídeo, tal como pelo menos duas unidades de LNA, nas posições as quais são complementares à região de cultura de miRNA.

30. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 29, em que a seqüência de nucleobase do oligonucleotídeo a qual é comple-
 15 mentar à seqüência da região de cultura de micro-RNA, é selecionada do grupo consistindo em (X)XXxxxx, (X)xxxXxX e (X)xxxxXX, em que "X" denota um análogo de nucleotídeo, tal como uma unidade de LNA, (X) denota
 20 um análogo de nucleotídeo opcional, tal como uma unidade de LNA e "x" denota uma unidade de nucleotídeo de DNA ou RNA.

31. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 - 28, em que o oligonucleotídeo compreende pelo menos
 25 três unidades análogas de nucleotídeo, tal como pelo menos três unidades de LNA, nas posições as quais são complementares à região de cultura de miRNA.

32. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 31, em que a seqüência de nucleobase do oligonucleotídeo a qual é comple-
 30 mentar à seqüência da região de cultura de micro-RNA, é selecionada do grupo consistindo em (X)XXXxxx, (X)xxXxXX,

(X)xXxXxX e (X)XxXxXx, em que "X" denota um análogo de nucleotídeo, tal como uma unidade de LNA, (X) denota um análogo de nucleotídeo opcional, tal como uma unidade de LNA e "x" denota uma unidade de nucleotídeo de DNA ou RNA.

5 33. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 - 28, em que o oligonucleotídeo de fita única compreende pelo menos quatro unidades análogas de nucleotídeo, tal como pelo menos quatro unidades de LNA, nas posições as quais são complementares à região de cultura de miRNA.

10 34. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 33, em que a seqüência de nucleobase do oligonucleotídeo a qual é complementar à seqüência da região de cultura de micro-RNA, é selecionada do grupo consistindo em (X)xxXXX, (X)xXxXXX, (X)xXXxXX, (X)xXXXxX, (X)xXXXXx, (X)XxxXXXX, (X)XxXxXX, (X)XxXXxX, (X)XxXXx, (X)XXxxXX, 15 (X)XXxXxX, (X)XXxXXx, (X)XXXxxX, (X)XXXxXx e (X)XXXXxx, em que "X" denota um análogo de nucleotídeo, tal como uma unidade de LNA, (X) denota um análogo de nucleotídeo opcional, tal como uma unidade de LNA e "x" denota uma unidade de nucleotídeo de DNA ou RNA.

20 35. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 - 28, em que o oligonucleotídeo compreende pelo menos cinco unidades análogas de nucleotídeo, tal como pelo menos cinco unidades de LNA, nas posições as quais são complementares à região de cultura de miRNA.

25 36. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 35, em que a seqüência de nucleobase do oligonucleotídeo a qual é complementar à seqüência da região de cultura de micro-RNA, é selecionada do grupo consistindo em (X)xXXXXX, (X)XxXXXX, (X)XXxXXX, (X)XXXxXX, (X)XXXXxX e (X)XXXXXx, em que "X" denota um análogo de nucleotídeo, tal como uma unidade de LNA, (X) denota um análogo de nucleotídeo opcional, tal como uma unidade de LNA e "x" denota uma unidade de nucleotídeo 30 de DNA ou RNA.

37. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das

reivindicações 1 - 28, em que o oligonucleotídeo compreende seis ou sete unidades análogas de nucleotídeo, tal como seis ou sete unidades de LNA, nas posições as quais são complementares à região de cultura de miRNA.

5 38. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 37, em que a seqüência de nucleobase do oligonucleotídeo a qual é complementar à seqüência da região de cultura de micro-RNA, é selecionada do grupo consistindo em XXXXXX, XxXXXXX, XXxXXXX, XXXxXXX, XXXXxXX, XXXXXxX e XXXXXXx, em que "X" denota um análogo de nucleotídeo, tal como uma unidade de LNA, tal como uma unidade de LNA e "x" denota uma unidade de nucleotídeo de DNA ou RNA.

10 39. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 - 38, em que os dois motivos de nucleobase nas posições 7 a 8, contando a partir da extremidade 3' do oligonucleotídeo de fita única são selecionados do grupo consistindo em xx, XX, xX e Xx, em que "X" denota um análogo de nucleotídeo, tal como uma unidade de LNA, tal como uma unidade de LNA e "x" denota uma unidade de nucleotídeo de DNA ou RNA.

15 40. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 - 39, em que o oligonucleotídeo compreende pelo menos 12 nucleobases e em que os dois motivos de nucleobase nas posições 11 a 12, contando a partir da extremidade 3' do oligonucleotídeo de fita única são selecionados do grupo consistindo em xx, XX, xX e Xx, em que "X" denota um análogo de nucleotídeo, tal como uma unidade de LNA, tal como uma unidade de LNA e "x" denota uma unidade de nucleotídeo de DNA ou RNA.

20 41. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 - 40, em que o oligonucleotídeo compreende pelo menos 13 nucleobases e em que os três motivos de nucleobase nas posições 11 a 13, contando a partir da extremidade 3', são selecionados do grupo consistindo em xxx, Xxx, xXx, xxX, XXx, XxX, xXX e XXX, em que "X" denota um análogo de nucleotídeo, tal como uma unidade de LNA, tal como uma unidade de LNA e "x" denota uma unidade de nucleotídeo de DNA ou RNA.

25 42. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 - 41, em que o oligonucleotídeo compreende pelo menos 14

nucleobases e em que os quatro motivos de nucleobase nas posições 11 a 14, contando a partir da extremidade 3', são selecionados do grupo consistindo em xxxx, XXxX e XXXX em que "X" denota um análogo de nucleotídeo, tal como uma unidade de LNA, tal como uma unidade de LNA e "x" denota uma unidade de nucleotídeo de DNA ou RNA.

43. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 – 42, em que o referido oligonucleotídeo compreende 15 nucleobases e os cinco motivos de nucleobase nas posições 11 a 15, contando a partir da extremidade 3', são selecionados do grupo consistindo em Xxxxx, xXxxx, xxXxx, xxxXx, xxxxxX, XXxxx, XxXXXX, xXXXX e XXXXX em que "X" denota um análogo de nucleotídeo, tal como uma unidade de LNA, tal como uma unidade de LNA e "x" denota uma unidade de nucleotídeo de DNA ou RNA.

44. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 – 43, em que o oligonucleotídeo compreende 16 nucleobases e os seis motivos de nucleobase nas posições 11 a 16, contando a partir da extremidade 3', são selecionados do grupo consistindo em Xxxxxx, XXXXXx e XXXXXX em que "X" denota um análogo de nucleotídeo, tal como uma unidade de LNA, tal como uma unidade de LNA e "x" denota uma unidade de nucleotídeo de DNA ou RNA.

45. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 44, em que o oligonucleotídeo consiste de entre 17 e 26 nucleobases, em que

as nucleobases 17-26, contando a partir da extremidade 3' são, cada uma, independentemente selecionadas do grupo consistindo em X e x, em que "X" denota um análogo de nucleotídeo, tal como uma unidade de LNA, tal como uma unidade de LNA e "x" denota uma unidade de nucleotídeo de DNA ou RNA.

46. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 – 45 em que o motivo de nucleobase para as três nucleobases mais 5' do oligonucleotídeo, é selecionado do grupo consistindo em Xxx, xXx, xxX, XXx, XxX, xXX e XXX, em que "X" denota um análogo de nucleotídeo, tal como uma unidade de LNA, tal como uma unidade de LNA e "x" denota uma unidade de nucleotídeo de DNA ou RNA.

47. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 - 46, em que "x" denota uma unidade de DNA.

48. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 - 47, em que o oligonucleotídeo de fita única compreende uma unidade análoga de nucleotídeo, tal como uma unidade de LNA, na extremidade 5'.

49. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 16 – 48, em que as unidades análogas de nucleotídeo, tal como X, são independentemente selecionadas do grupo consistindo em: 2'-unidade de O-alkila-RNA, unidade de 2'-OMe-RNA, unidade de 2'-amino-DNA, unidade de 2'-fluoro-DNA, unidade de LNA, unidade de PNA, unidade de HNA, unidade de INA.

50. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 49, em que todas as nucleobases são unidades análogas de nucleotídeo.

51. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 49 ou 50, em que as unidades análogas de nucleotídeo, tal como X, são independentemente selecionadas do grupo consistindo em: unidades de 2'-OMe-RNA, unidades de 2'-fluoro-DNA e unidades de LNA.

52. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 49 - 51, em que o oligonucleotídeo compreende a referida pelo menos uma unidade análoga de LNA e pelo menos uma outra unidade

análoga de nucleotídeo que não LNA.

53. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 52, em que a unidade ou unidades análogas de nucleotídeo de não LNA são independentemente selecionadas de unidades de 2'-OMe RNA e unidades de 2'-fluoro-DNA.

54. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 53, em que o oligonucleotídeo de fita única consiste de pelo menos uma seqüência XYX ou YXY, em que X é LNA e Y é uma unidade de 2'-OMe RNA e uma unidade de 2'-fluoro-DNA.

55. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 54, em que a seqüência de nucleobases do oligonucleotídeo de fita única consiste de unidades X e Y alternadas.

56. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 – 49, em que o oligonucleotídeo de fita única compreende unidades alternadas de LNA e DNA (Xx) ou (xX).

57. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 – 49, em que o oligonucleotídeo de fita única compreende um motivo de LNA alternado seguido por 2 unidades de DNA (Xxx), xXx ou xxX.

58. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 54 – 57, em que pelo menos uma das unidades análogas de nucleotídeo de DNA ou não LNA são substituídas por uma nucleobase de LNA em uma posição selecionada das posições identificadas como unidades de nucleobase de LNA em qualquer uma das reivindicações precedentes.

59. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 - 58, em que "X" denota uma unidade de LNA.

60. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 – 59, em que o oligonucleotídeo de fita única compreende pelo menos 5 unidades de LNA.

61. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 60, em que o oligonucleotídeo de fita única compreende pelo menos 7 unidades de LNA.

62. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 – 61, em que pelo menos uma das nucleobases de LNA é citosina ou guanina.

5 63. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 62, em que pelo menos três das nucleobases de LNA são independentemente selecionadas de citosina ou guanina.

64. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 16 - 63, em que os análogos de nucleotídeo têm uma estabilidade dúplice térmica maior por um nucleotídeo de RNA complementar do
10 que a estabilidade dúplice térmica de um nucleotídeo de DNA equivalentes ao referido nucleotídeo de RNA complementar.

65. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 16 - 64, em que os análogos de nucleotídeo conferem estabilidade intensificada no soro do oligonucleotídeo.

15 66. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 – 65 em que o oligonucleotídeo não media a clivagem baseada em RNaseH de uma molécula de RNA de fita única complementar.

67. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1- 66 em que o oligonucleotídeo é capaz de formação de uma
20 dúplice com uma molécula de ácido nucléico de RNA de fita única complementar com ligações internucleosídeo de fosfodiéster, em que o dúplice tem uma T_m de pelo menos cerca de 60°C.

68. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 67, em que o oligonucleotídeo é capaz de formar um dúplice com uma molécula
25 de ácido nucléico de RNA de fita única complementar com ligações internucleosídeo de fosfodiéster, em que o dúplice tem uma T_m de entre cerca de 70°C a cerca de 95°C.

69. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 68, em que o oligonucleotídeo é capaz de formar um dúplice com uma molécula
30 de ácido nucléico de RNA fita única complementar com ligações internucleosídeo de fosfodiéster, em que a dupla tem uma T_m de entre cerca de 70°C a cerca de 90°C, tal como entre cerca de 70°C e cerca de 85°C.

70. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 - 69, em que o oligonucleotídeo é capaz de formar um dúplice com uma molécula de ácido nucléico de RNA de fita única complementar com ligações internucleosídeo de fosfodiéster, em que o dúplice tem uma T_m de entre cerca de 50°C a cerca de 90°C.

71. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 - 70, em que o oligonucleotídeo de fita única tem um comprimento de entre 10 a 16, tal como um comprimento de 10, 11, 12, 13, 14, 15 ou 16 nucleobases.

72. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 71, em que o oligonucleotídeo de fita única tem um comprimento de 15 ou 16 nucleobases.

73. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 - 72, em que a unidade ou unidades de LNA são independentemente selecionadas do grupo consistindo em óxi-LNA, tio-LNA e amino-LNA, nas configurações D-β e L-α ou combinações das mesmas.

74. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 73, em que a unidade ou unidades de LNA são beta D óxi-LNA.

75. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 73, em que as unidades de LNA são alfa-L amino LNA.

76. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 - 75, em que o oligonucleotídeo de fita única compreende entre 3 e 17 unidades de LNA.

77. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 - 76, em que o oligonucleotídeo compreende pelo menos um grupo de ligação internucleosídeo o qual difere de fosfato.

78. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 77, em que o oligonucleotídeo compreende pelo menos uma ligação internucleosídeo de fosforotioato.

79. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 78, em que o oligonucleotídeo compreende ligações de fosfodiéster e fosforotioato.

80. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 77, em que todas as ligações internucleosídeo são ligações de fosforotioato.

81. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 - 79, em que o oligonucleotídeo compreende pelo menos
5 uma ligação internucleosídeo de fosfodiéster.

82. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 81, em que todas as ligações internucleosídeo são ligações de fosfodiéster.

83. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 – 82, em que o referido veículo é solução salina ou solução
10 salina tamponada.

84. Oligonucleotídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 – 75, em que o referido oligonucleotídeo de fita única compreende pelo menos uma ligação de fosforotioato e/ou em que pelo menos as primeira nucleobase 5' e/ou a última 3' é uma nucleobase de LNA.

85. Oligonucleotídeo compreendendo uma seqüência de nucleobase selecionada do grupo consistindo em SEQ ID NO 20, SEQ ID NO 21, SEQ ID NO 22, SEQ ID NO 23, SEQ ID NO 24, SEQ ID NO 25, SEQ ID NO 28, SEQ ID NO 26, SEQ ID NO 27, SEQ ID NO 82, SEQ ID NO 83, SEQ ID NO 84, SEQ ID NO 85, SEQ ID NO 86, SEQ ID NO 87, SEQ ID NO 88 e
15 SEQ ID NO 89; em que uma letra minúscula identifica a base nitrogenosa de uma unidade de DNA e uma letra maiúscula identifica a base nitrogenosa de uma unidade de LNA; e em que as citosinas de LNA são opcionalmente metiladas ou um conjugado do mesmo.

86. Oligonucleotídeo compreendendo uma seqüência de nucleobase selecionada do grupo consistindo em SEQ ID NO 11, SEQ ID NO 12, SEQ ID NO 13, SEQ ID NO 14, SEQ ID NO 15, SEQ ID NO 16, SEQ ID NO 17, SEQ ID NO 18, SEQ ID NO 19, SEQ ID NO 90, SEQ ID NO 91, SEQ ID NO 92, SEQ ID NO 93, SEQ ID NO 94, SEQ ID NO 95, SEQ ID NO 96, SEQ ID NO 97, SEQ ID NO 98, SEQ ID NO 99, SEQ ID NO 100 e SEQ ID NO
25 101; em que uma letra minúscula identifica a base nitrogenosa de uma unidade de DNA e uma letra maiúscula identifica a base nitrogenosa de uma unidade de LNA; e em que as citosinas de LNA são opcionalmente metiladas
30

ou um conjugado do mesmo.

87. Oligonucleotídeo compreendendo uma seqüência de nucleobase selecionada do grupo consistindo em SEQ ID NO 29, SEQ ID NO 30, SEQ ID NO 31, SEQ ID NO 32, SEQ ID NO 33, SEQ ID NO 34, SEQ ID NO 35, SEQ ID NO 36, SEQ ID NO 37, SEQ ID NO 102, SEQ ID NO 103, SEQ ID NO 104 e SEQ ID NO 105; em que uma letra minúscula identifica a base nitrogenosa de uma unidade de DNA e uma letra maiúscula identifica a base nitrogenosa de uma unidade de LNA; e em que as citosinas de LNA são opcionalmente metiladas ou um conjugado do mesmo.

88. Oligonucleotídeo compreendendo uma seqüência de nucleobase selecionada do grupo consistindo em SEQ ID NO 47, SEQ ID NO 48, SEQ ID NO 49, SEQ ID NO 50, SEQ ID NO 51, SEQ ID NO 52, SEQ ID NO 53, SEQ ID NO 54, SEQ ID NO 55, SEQ ID NO 106, SEQ ID NO 107, SEQ ID NO 108 e SEQ ID NO 109; em que uma letra minúscula identifica a base nitrogenosa de uma unidade de DNA e uma letra maiúscula identifica a base nitrogenosa de uma unidade de LNA; e em que as citosinas de LNA são opcionalmente metiladas ou um conjugado do mesmo.

89. Oligonucleotídeo compreendendo uma seqüência de nucleobase selecionada do grupo consistindo em SEQ ID NO 65, SEQ ID NO 66, SEQ ID NO 67, SEQ ID NO 68 e SEQ ID NO 69, SEQ ID NO 38, SEQ ID NO 39, SEQ ID NO 40, SEQ ID NO 41, SEQ ID NO 42, SEQ ID NO 43, SEQ ID NO 44, SEQ ID NO 45 e SEQ ID NO 46, em que uma letra minúscula identifica a base nitrogenosa de uma unidade de DNA e uma letra maiúscula identifica a base nitrogenosa de uma unidade de LNA; e em que as citosinas de LNA são opcionalmente metiladas ou um conjugado do mesmo.

90. Oligonucleotídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações 84 – 89, em que as ligações internucleobase são como definido em qualquer uma das reivindicações 77 – 82.

91. Oligonucleotídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações 84 – 90, em que as seqüências de nucleobase do oligonucleotídeo consistem na referida seqüência de nucleobase.

92. Conjugado compreendendo o oligonucleotídeo como defini-

do em qualquer uma das reivindicações 84 – 91 e pelo menos uma entidade de não-nucleobase covalentemente presa ao mesmo.

5 93. Conjugado de acordo com a reivindicação 92, em que a entidade de não-nucleobase consiste ou compreende em um esterol, tal como colesterol.

94. Composição farmacêutica compreendendo o oligonucleotídeo ou conjugado como definido em qualquer uma das reivindicações 84 – 93 e um diluente, veículo ou adjuvante farmacêuticamente aceitável.

10 95. Uso de um oligonucleotídeo de fita única ou conjugado como definido em qualquer uma das reivindicações 1-93 para a fabricação de um medicamento para o tratamento de uma doença ou distúrbio médico associado à presença ou superexpressão do micro-RNA, tal como uma doença selecionada do grupo consistindo em níveis aumentados de colesterol no plasma, aterosclerose, hipercolesterolemia ou hiperlipidemia, Hepatite C, 15 câncer e um distúrbio metabólico, tal como diabetes.

96. Método para o tratamento de uma doença ou distúrbio médico associado à presença ou superexpressão do micro-RNA, compreendendo a etapa de administração de uma composição como definida em qualquer uma das reivindicações 1-93 a uma pessoa que precisa de tratamento, tal 20 como uma pessoa sofrendo de uma doença selecionada do grupo consistindo em níveis aumentados de colesterol no plasma, aterosclerose, hipercolesterolemia ou hiperlipidemia, Hepatite C, câncer e um distúrbio metabólico, tal como diabetes.

97. Método para redução da quantidade eficaz de um alvo de 25 miRNA em uma célula ou um organismo compreendendo administração de uma composição ou um oligonucleotídeo de fita única como definido em qualquer uma das reivindicações 1-93 à célula ou organismo.

98. Método de acordo com a reivindicação 97, em que a redução da quantidade eficaz do alvo miRNA ocorre via um antagonismo *in vivo*.

30 99. Método para inversão de repressão de um mRNA alvo de um miRNA em uma célula ou organismo compreendendo administração de uma composição ou um oligonucleotídeo de fita única como definido em

qualquer uma das reivindicações 1-93 à célula ou organismo.

100. Método para a síntese de um oligonucleotídeo de fita única como definido em qualquer uma das reivindicações 1-93, o referido método compreendendo as etapas de:

- 5 a. Seleção de uma primeira nucleobase, contando a partir da extremidade 3', a qual é uma nucleobase de LNA.
- b. Opcionalmente seleção de uma segunda nucleobase, contando a partir da extremidade 3', a qual é uma nucleobase de LNA.
- c. Seleção de uma região do oligonucleotídeo de fita única a qual corresponde a qualquer uma das regiões identificadas nas reivindicações 1 – 5 ou a região de cultura do miRNA.
- 10 d. Opcionalmente seleção de mais duas nucleobases as quais são as sétima e oitava nucleobases conforme de acordo com a reivindicação 39.
- 15 e. Opcionalmente seleção de uma região 5' do oligonucleotídeo de fita única como definido em qualquer uma das reivindicações 40 – 45.
- f. Opcionalmente seleção entre 1 e 10 outras nucleobases as quais podem ser selecionadas do grupo consistindo em nucleotídeos e análogos de nucleotídeo, tal como LNA.
- 20 g. Opcionalmente seleção de uma extremidade 5' terminal do oligonucleotídeo de fita única como definido na reivindicação 46, em que a síntese é realizada através de síntese seqüencial das regiões definidas nas etapas a – f, em que a referida síntese pode ser realizada na direção 3'-5' (a a f) ou 5' – 3' (f a a) e em que o referido oligonucleotídeo de fita única é
- 25 complementar a uma seqüência encontrada dentro de uma seqüência selecionada do grupo consistindo em: SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4 e SEQ ID NO 5.

101. Método de acordo com a reivindicação 100, em que a síntese é realizada na direção 3' a 5' a - f.

- 30 102. Uso de um oligonucleotídeo de entre 8 – 16 nucleobases de comprimento para a fabricação de um medicamento para o tratamento de uma doença ou distúrbio médico associado à presença ou superexpressão

do micro-RNA, em que o oligonucleotídeo é complementar a uma seqüência correspondente presente em uma seqüência selecionada do grupo consistindo em SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4 e SEQ ID NO 5.

5 103. Uso de acordo com a reivindicação 102, em que a doença é selecionada do grupo consistindo em níveis aumentados de colesterol no plasma, aterosclerose, hipercolesterolemia ou hiperlipidemia, Hepatite C, câncer e um distúrbio metabólico, tal como diabetes.

10 104. Método para o tratamento de uma doença ou distúrbio médico associado à presença ou superexpressão do micro-RNA, compreendendo a etapa de administração de um oligonucleotídeo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 – 100 ou um conjugado do mesmo, a uma pessoa que precisa de tratamento.

15 105. Método de acordo com a reivindicação 104, em que a pessoa está sofrendo de uma doença selecionada do grupo consistindo em níveis aumentados de colesterol no plasma, aterosclerose, hipercolesterolemia ou hiperlipidemia, Hepatite C, câncer e um distúrbio metabólico, tal como diabetes.

20 106. Uso de um oligonucleotídeo como definido em qualquer uma das reivindicações 1-93 ou um conjugado do mesmo, para super-regulação dos níveis de mRNA de Nrdg3, Aldo A, Bckdk ou CD320.

25 107. Método para redução da quantidade eficaz de um alvo de miRNA em uma célula ou um organismo compreendendo administração de uma composição ou um oligonucleotídeo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 – 93 ou um conjugado do mesmo à célula ou organismo.

30 108. Método para reversão de repressão de um mRNA alvo de um miRNA em uma célula ou um organismo compreendendo administração de uma composição ou um oligonucleotídeo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 – 93 ou um conjugado do mesmo à célula ou organismo.

109. Tratamento de uma doença ou distúrbio médico associado

à presença ou superexpressão do micro-RNA compreendendo a etapa de administração de uma composição (tal como uma composição farmacêutica) compreendendo um oligonucleotídeo de fita única de entre 8– 16 nucleobases de comprimento a uma pessoa que precisa de tratamento, em que o oligonucleotídeo é complementar a uma seqüência correspondente presente em uma seqüência selecionada do grupo consistindo em SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4 e SEQ ID NO 5.

110. Método para redução da quantidade eficaz de um alvo de miRNA em uma célula ou um organismo compreendendo administração de uma composição (tal como uma composição farmacêutica) compreendendo um oligonucleotídeo de fita única de entre 8– 16 nucleobases à célula ou o organismo, em que o oligonucleotídeo é complementar a uma seqüência correspondente presente em uma seqüência selecionada do grupo consistindo em SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4 e SEQ ID NO 5.

111. Método para reversão de repressão de um mRNA alvo de um miRNA em uma célula ou organismo compreendendo um oligonucleotídeo de fita única de entre 8 – 16 nucleobases ou (ou uma composição compreendendo o referido oligonucleotídeo) à célula ou ao organismo, em que o oligonucleotídeo é complementar a uma seqüência correspondente presente em uma seqüência selecionada do grupo consistindo em SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4 e SEQ ID NO 5.

112. Composição farmacêutica compreendendo um oligonucleotídeo de fita única de um comprimento de entre 8 e 16 unidades de nucleobase, um diluente, veículo ou adjuvante farmacêuticamente aceitável, em que pelo menos uma das unidades de nucleobase do oligonucleotídeo de fita única é um análogo de nucleotídeo e em que o oligonucleotídeo de fita única é complementar a uma seqüência de micro-RNA humana, em que o oligonucleotídeo é complementar a uma seqüência correspondente presente em uma seqüência selecionada do grupo consistindo em SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4 e SEQ ID NO 5.

113. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 112, em que

a composição é para o tratamento de uma doença selecionada do grupo consistindo em níveis aumentados de colesterol no plasma, aterosclerose, hipercolesterolemia ou hiperlipidemia, Hepatite C, câncer e um distúrbio metabólico, tal como diabetes.

sub-regulação por LNA anti-miR122 de miR-122a, na linhagem de células Huh-7

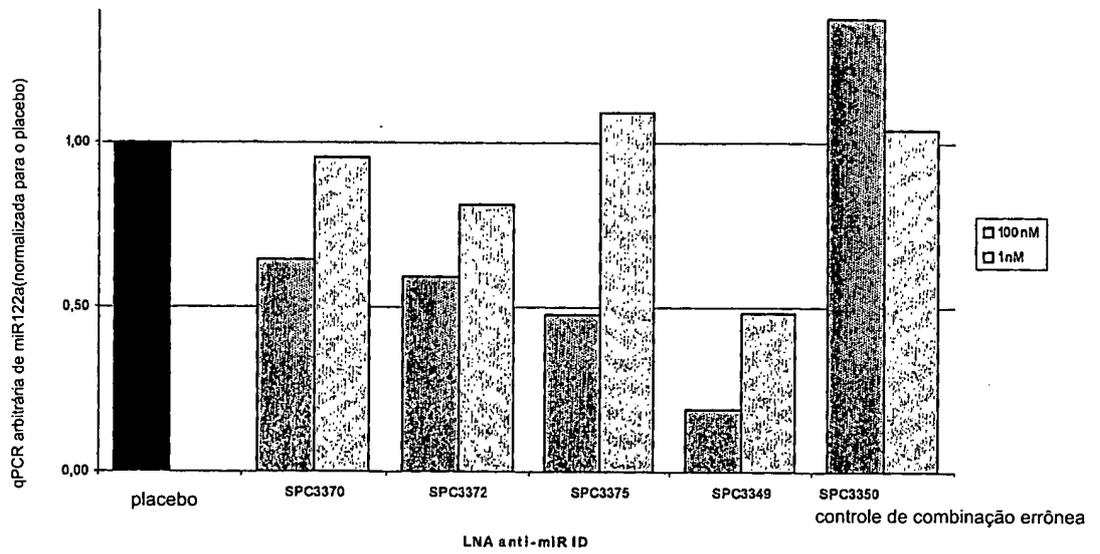


FIG. 1

níveis de miR122a em fígados de camundongo após tratamento com diferentes LNA-antimirs

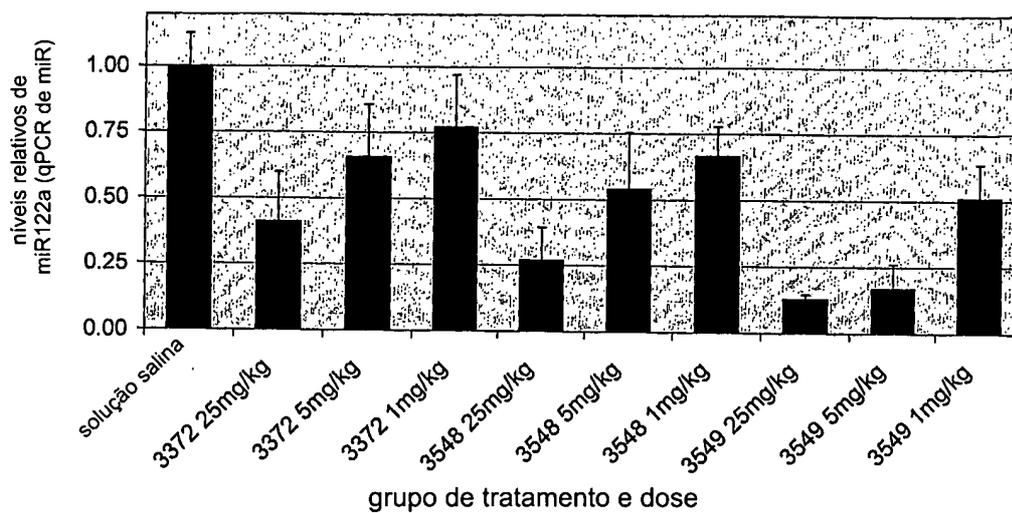


FIG. 2

inibição por LNA-antimir de miR122 in vivo, em fígado de camundongo (três doses i.p.(indicadas) em C57/BL6 dia sim dia não e sacrifício 48 horas após a última dose, PD-06-042/050, miR-06-014/026, média e SD, n = 8)

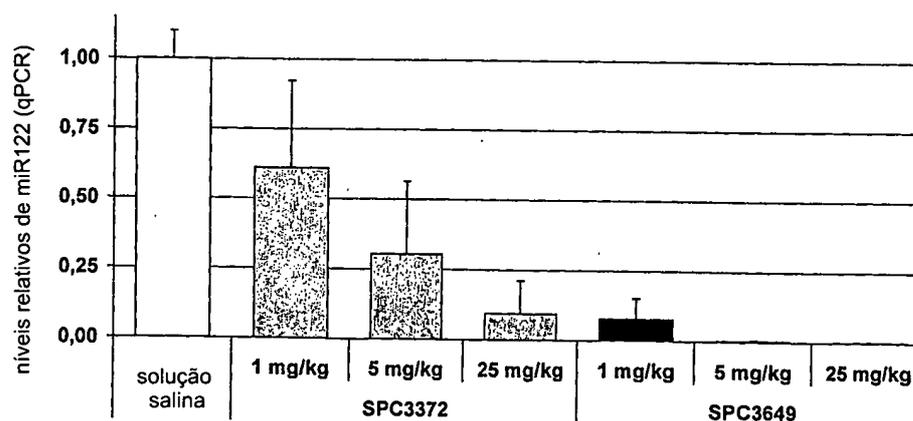


FIG. 2b

níveis de colesterol no plasma de camundongos após tratamento com diferentes LNA-antimirs

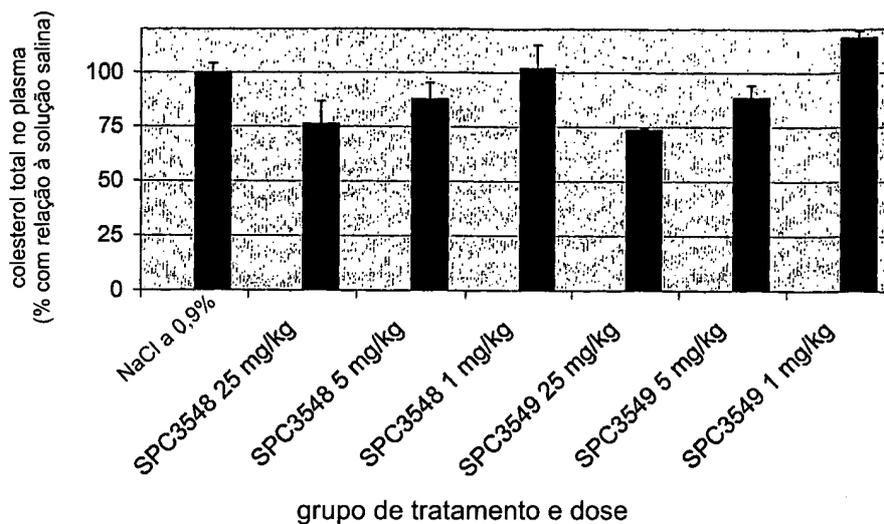


FIG. 3a

colesterol total no plasma em camundongos tratados com LNA-antimir (três doses i.p.(indicadas) em C57/BL6 dia sim dia não e sacrifício 48 horas após a última dose, PD-06-042/050, miR-06-014/026, média e SD, n = 8, colesterol total médio no grupo com solução salina: 78 mg/ dl)

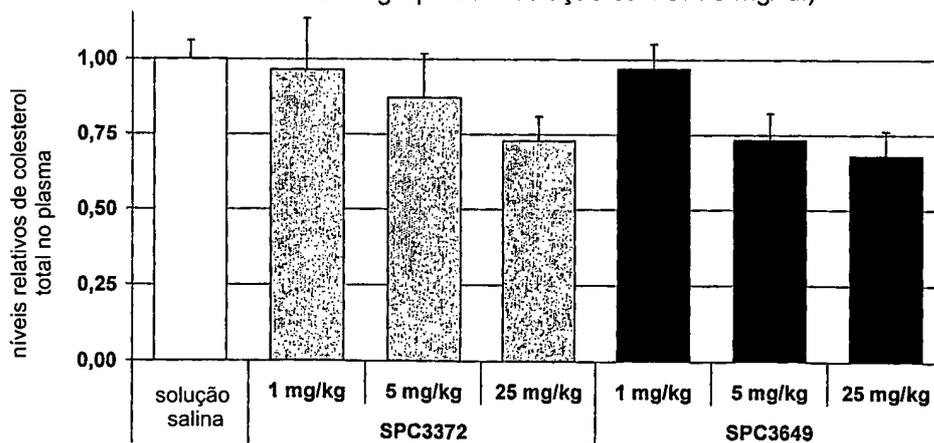


FIG. 3b

níveis relativos de mRNA de Bckdk

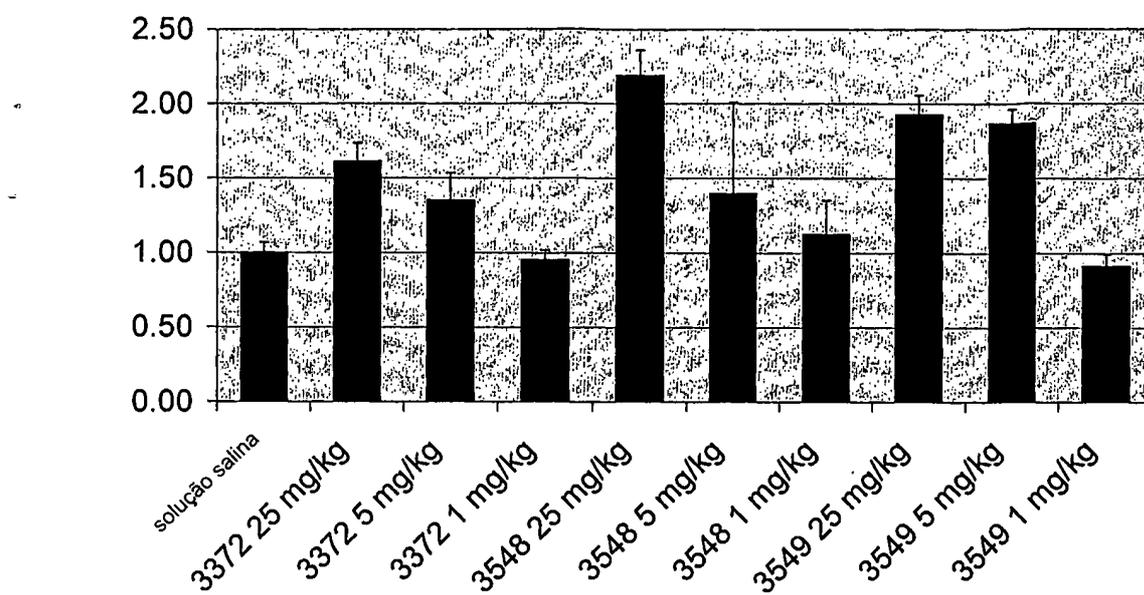


FIG. 4a

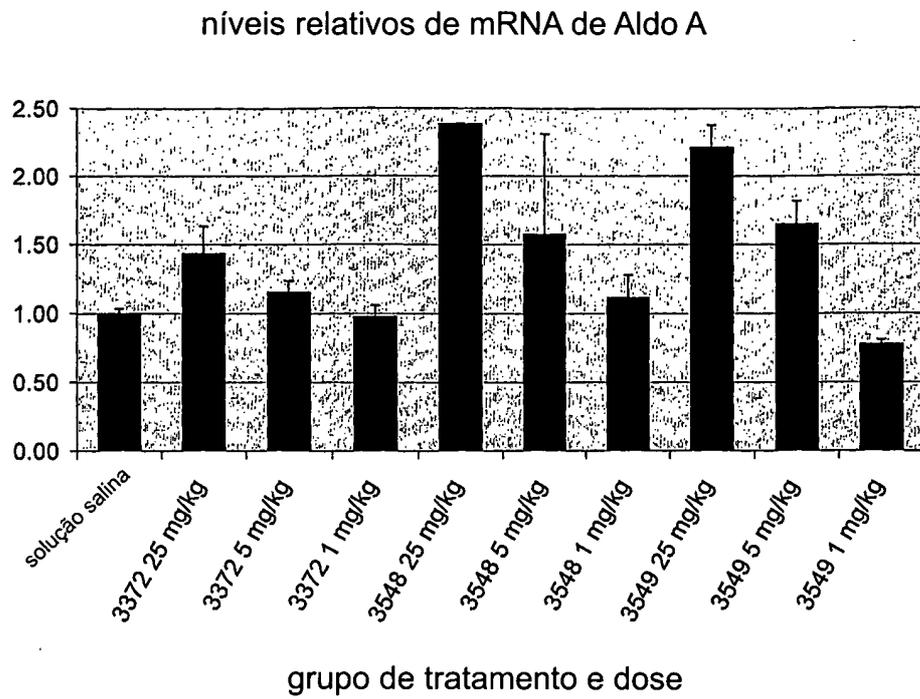


FIG. 4b

níveis de mRNA de GAPDH

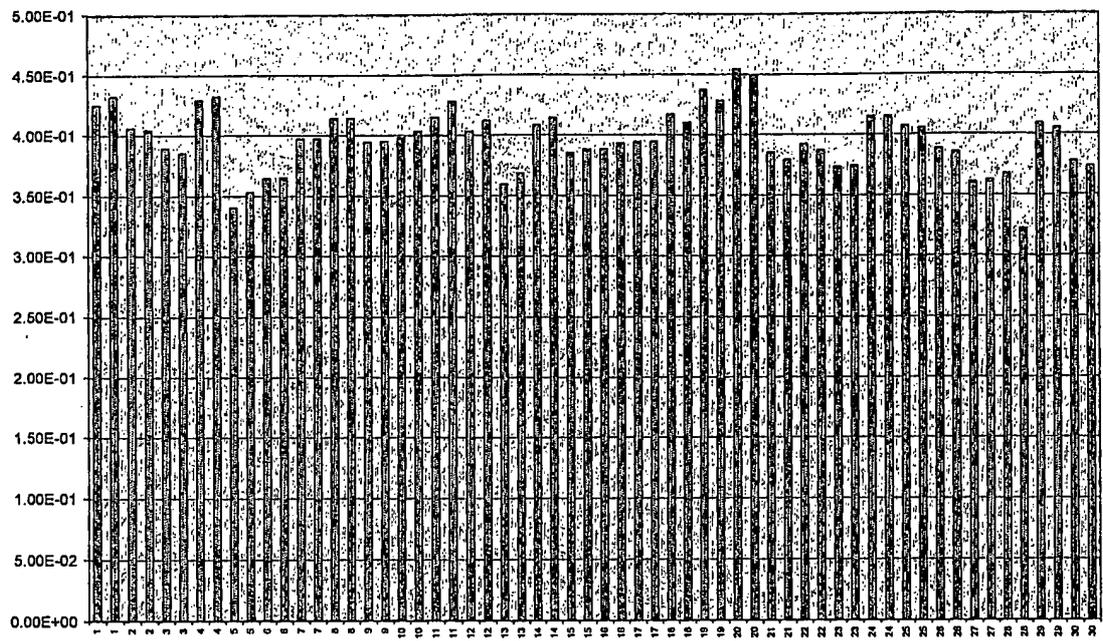


FIG. 4c

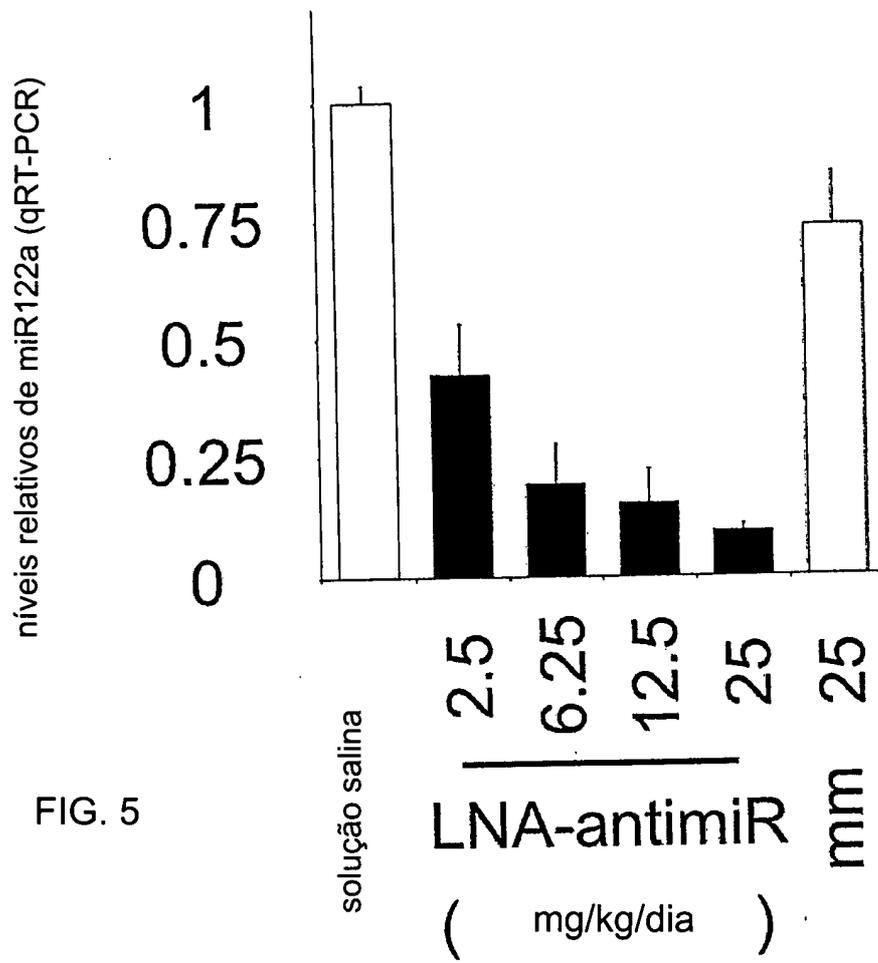


FIG. 5

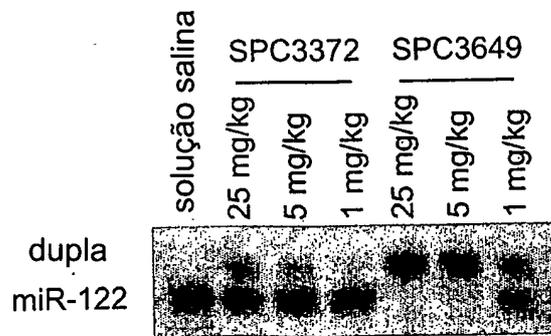


FIG. 6

níveis relativos de miR122a com relação à solução salina em cada ponto de tempo (qRT-PCR)

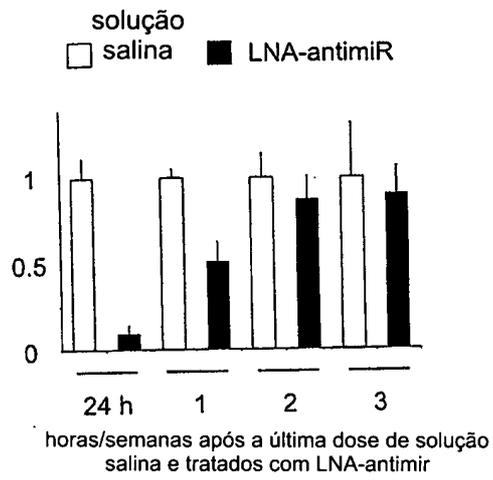


FIG. 7

níveis de colesterol no plasma com relação à solução salina em cada ponto de tempo (qRT-PCR)

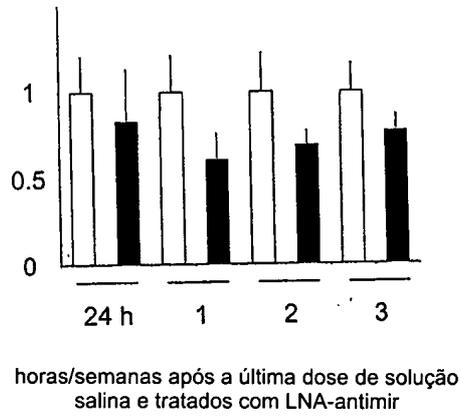


FIG. 8

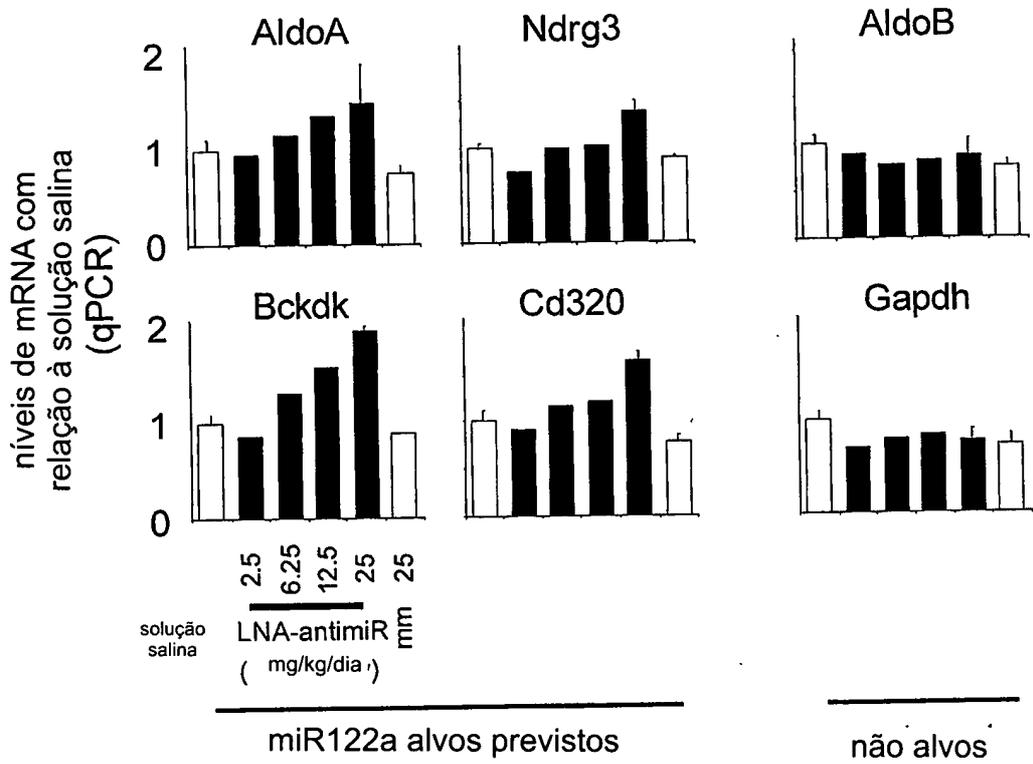


FIG. 9

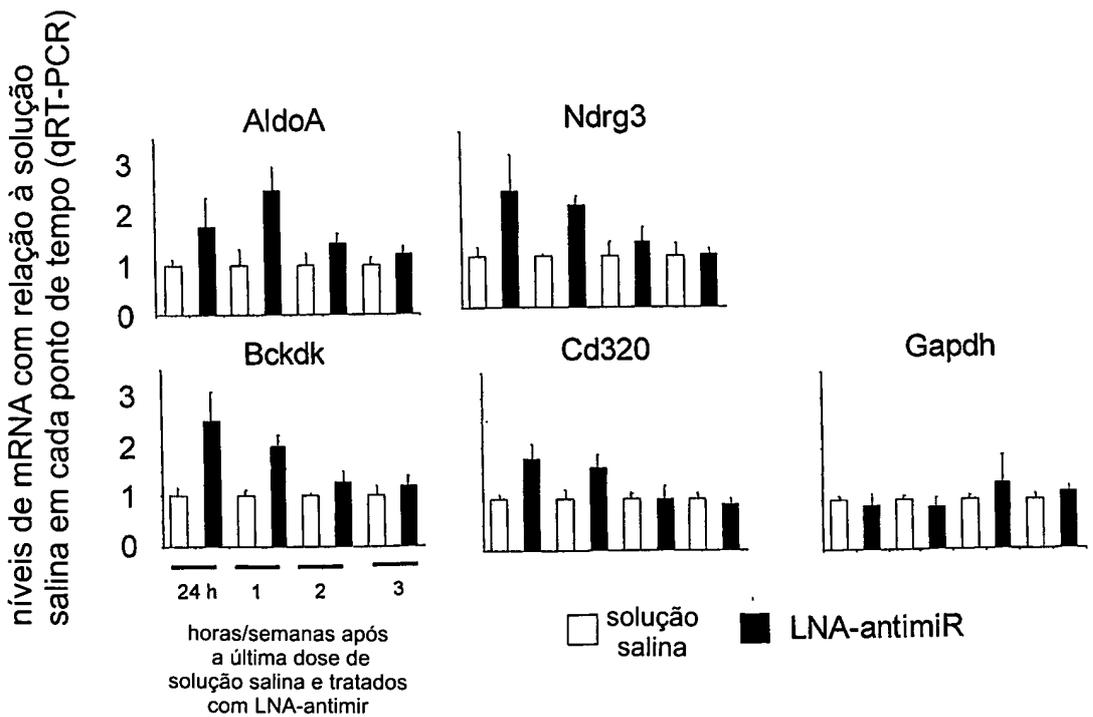


FIG. 10

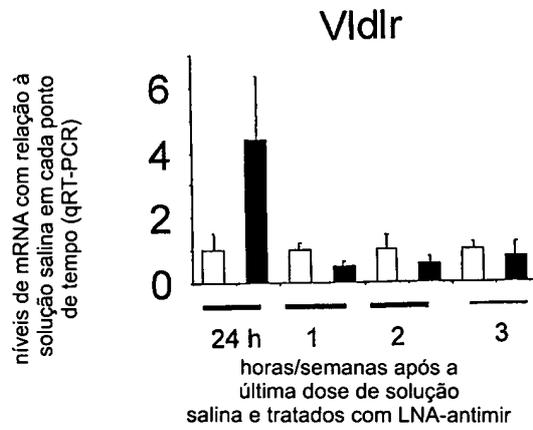


FIG. 11

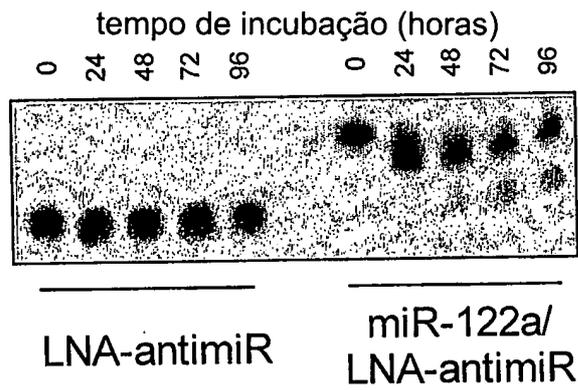


FIG. 12

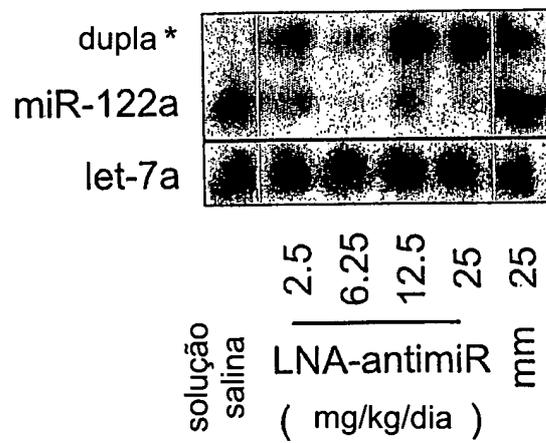


FIG. 13

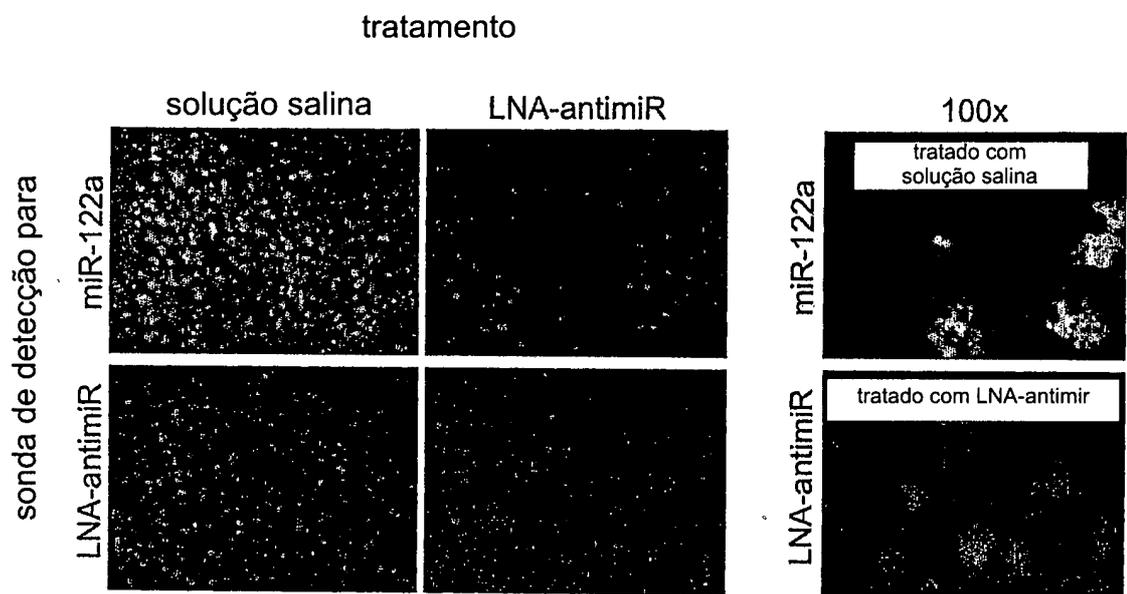


FIG. 14

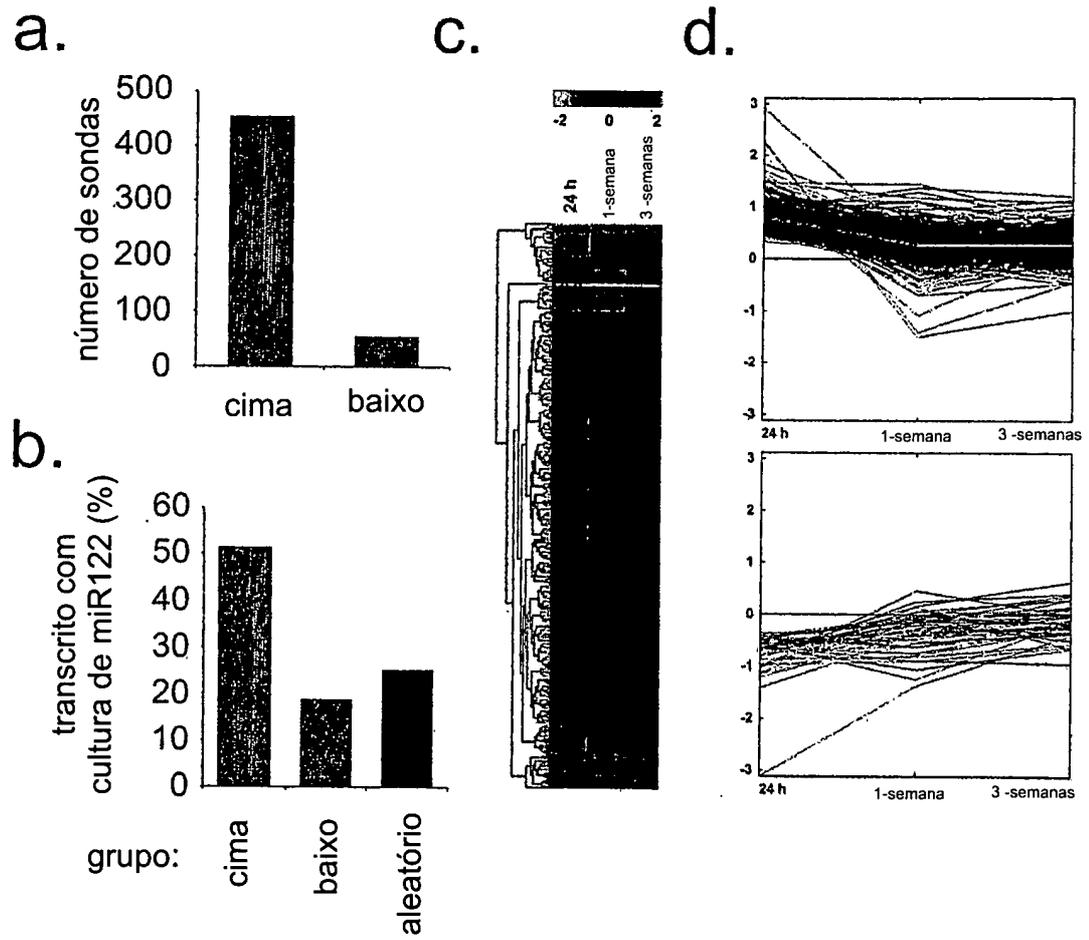


FIG. 15

níveis de miR122 em fígado de camundongo (LNA-antimir vs. Antagomir)

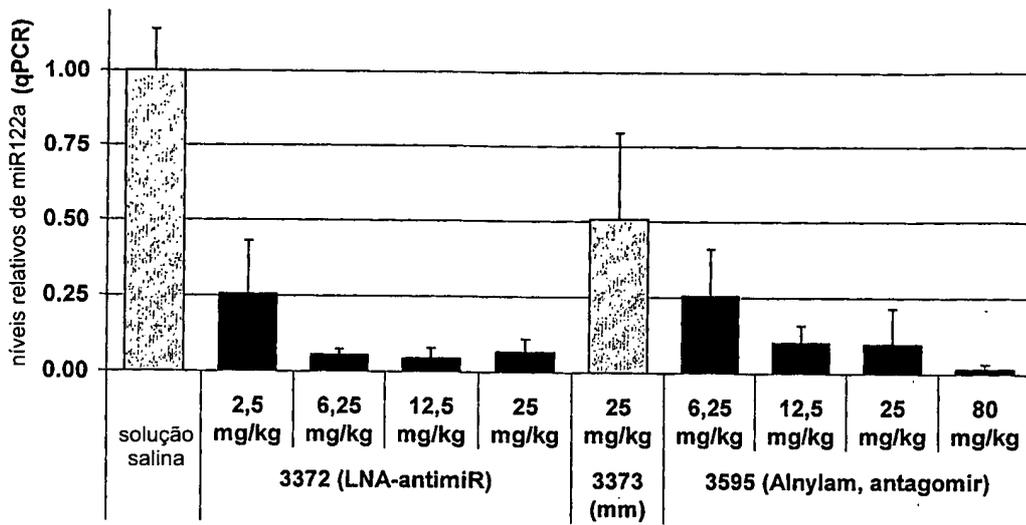


FIG. 18

indução de Aldo A por PD-06-030
(grupo com GAPDH normal, NaCl não normal)

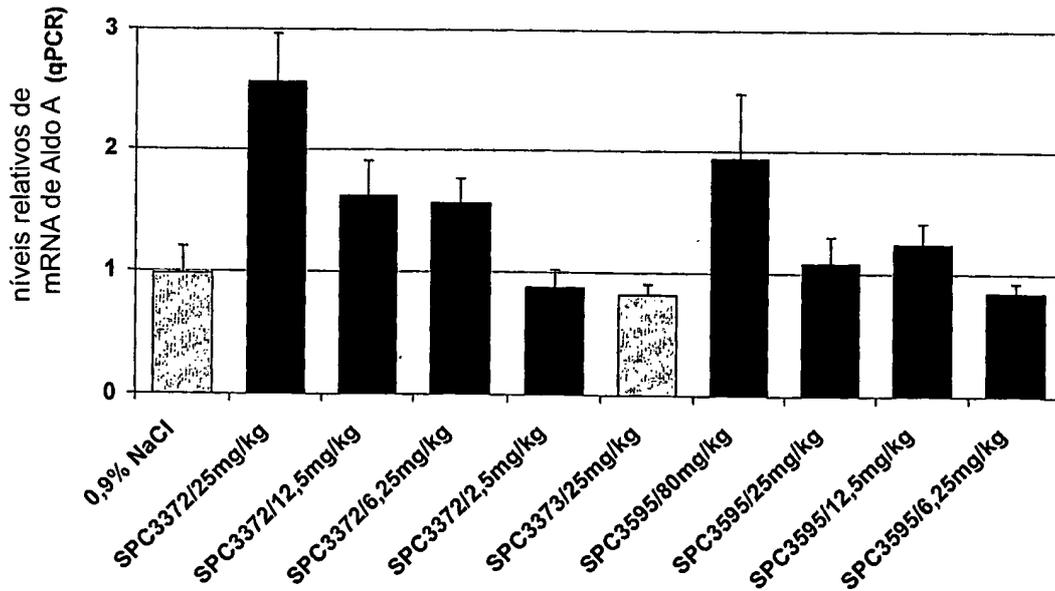


FIG. 17

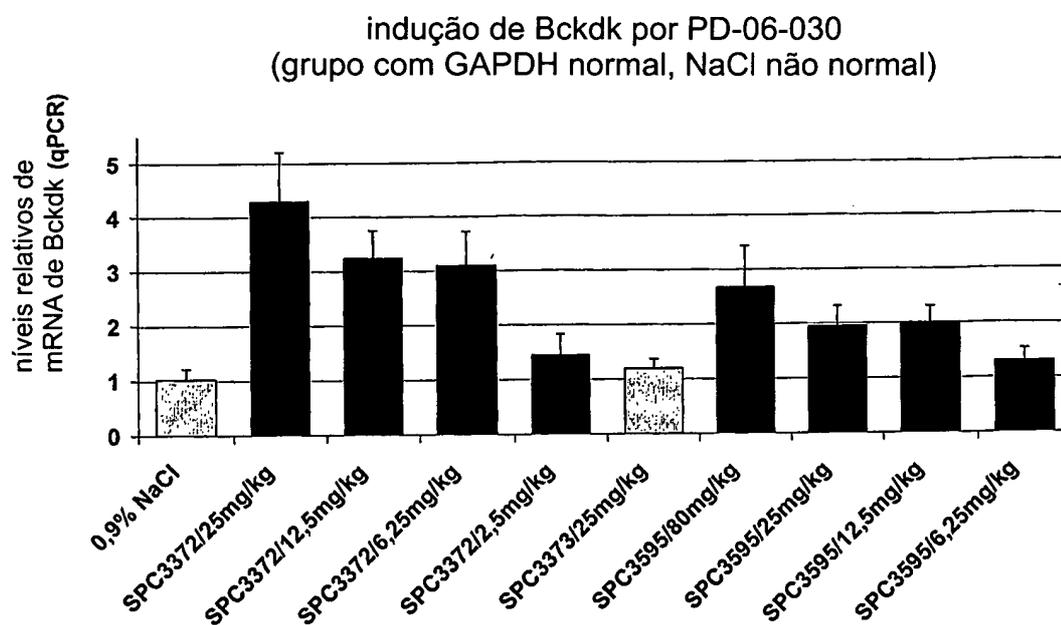


FIG. 18

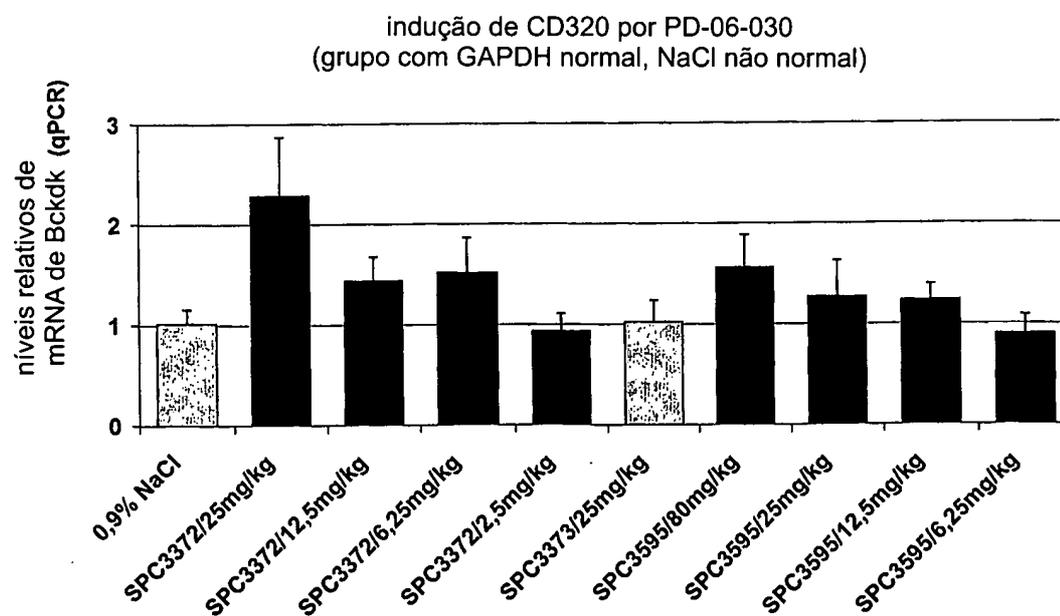


FIG. 19

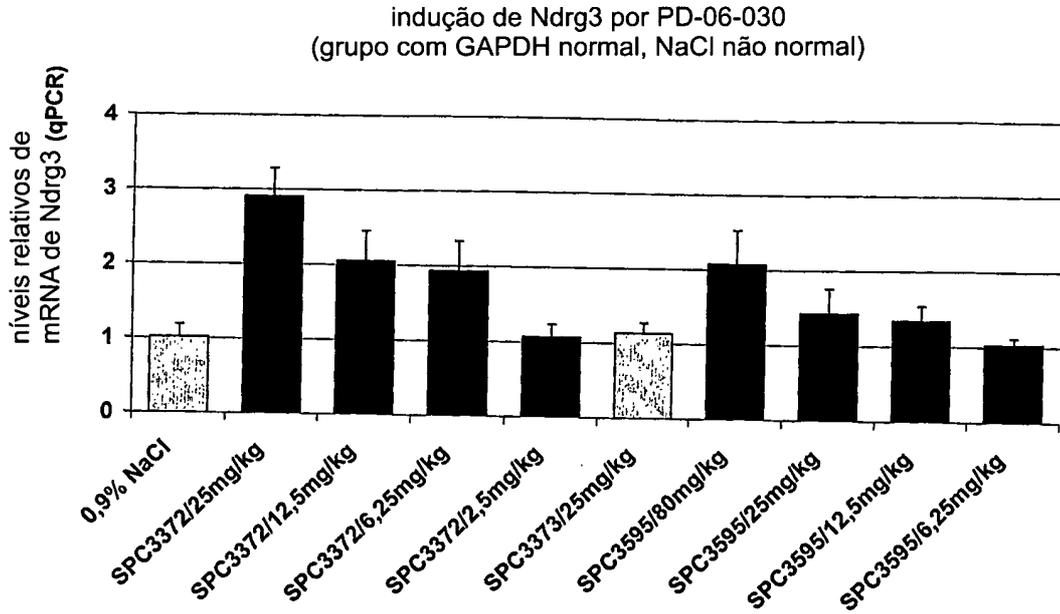


FIG. 20

níveis totais de colesterol no plasma durante o tempo em camundongos obesos dieta-induzidos tratados com LNA-antimir contra miR122 (SPC3649, mm controle SPC3744, PD-06-053/miR-06-036/IB-06-203, média e SD (NaCl e 3649 apenas), N = 10 para dieta induzida, N = 5 para dieta normal)

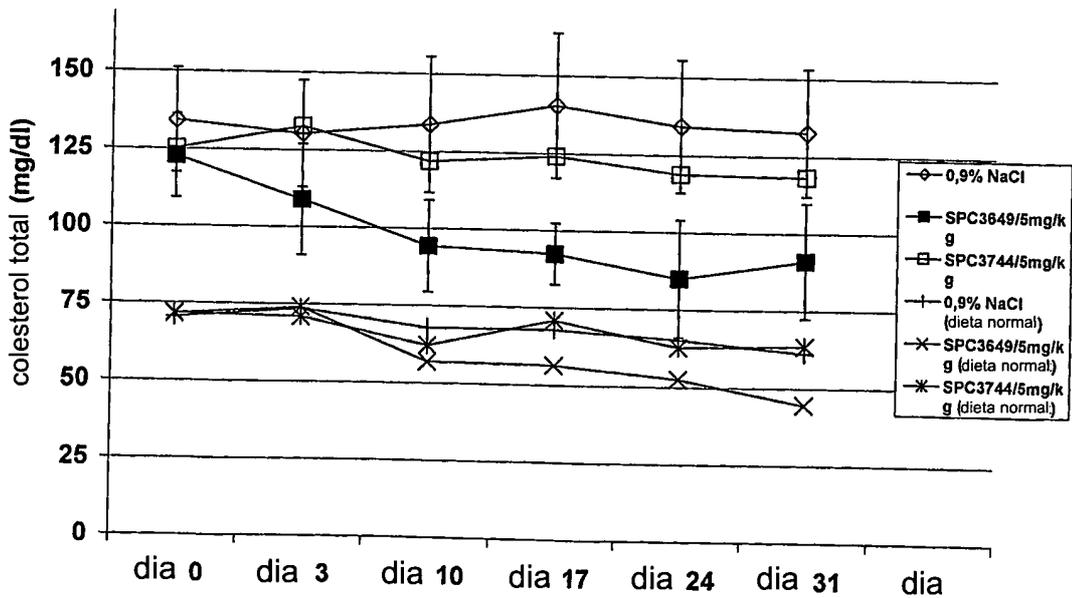


FIG. 21

níveis miR122a no fígado de camundongos obesos dieta-induzidos após tratamento com LNA-antimirmir

(SPC3649, mm controle SPC3744, PD-06-053/miR-06-036/IB-06-203, média e SD, norm, com relação ao grupo com solução salina, n = 10 dieta induzida, n = 5 dieta normal)

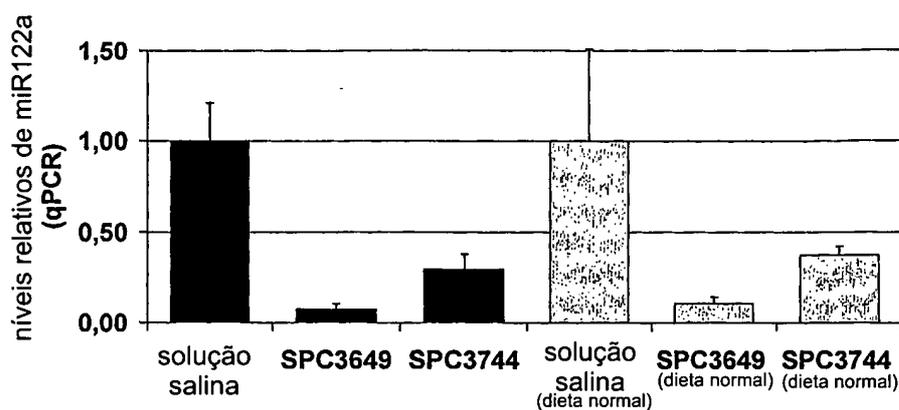


FIG. 22

expressão de mRNA de Aldolase A em fígado de camundongos obesos dieta-induzidos após tratamento com LNA-antimirmir

(SPC3649, mm controle SPC3744, PD-06-053/miR-06-036/IB-06-203, média e SD, norm, com relação ao grupo com solução salina, n = 10 dieta induzida, n = 5 dieta normal)

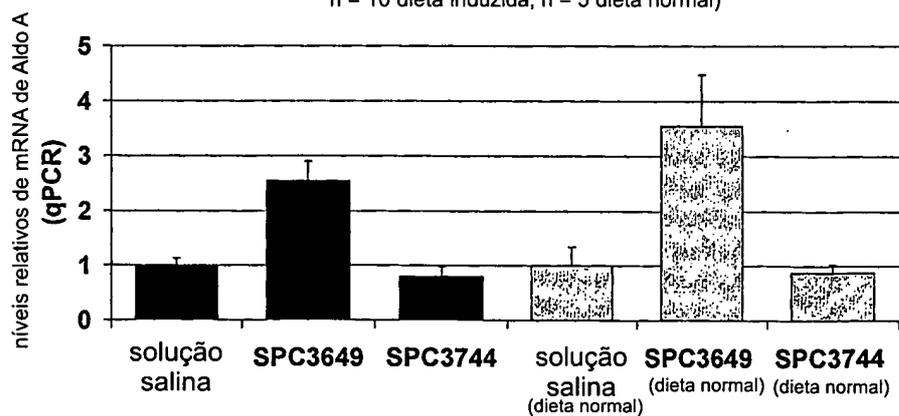


FIG. 23

expressão de mRNA de Bckdk em fígado de camundongos obesos
dieta-induzidos após tratamento com LNA-antimir

(SPC3649, mm controle SPC3744, PD-06-053/miR-06-036/IB-06-203, média
e SD, norm, com relação ao grupo com solução salina, n = 10 dieta
induzida, n = 5 dieta normal)

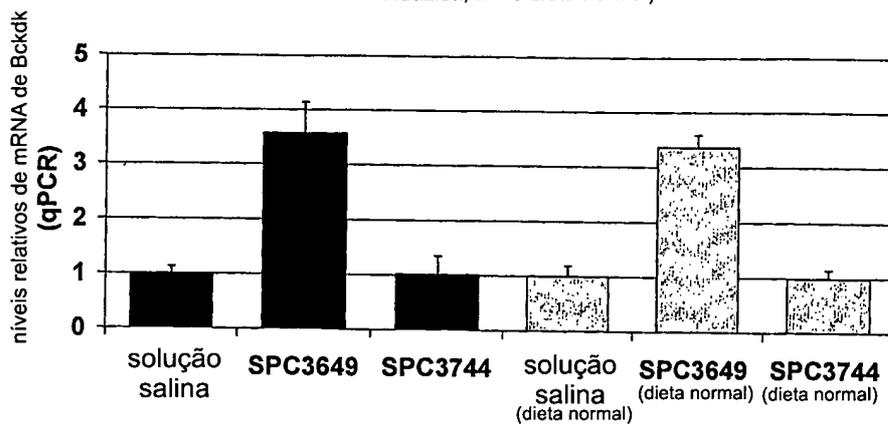


FIG. 24

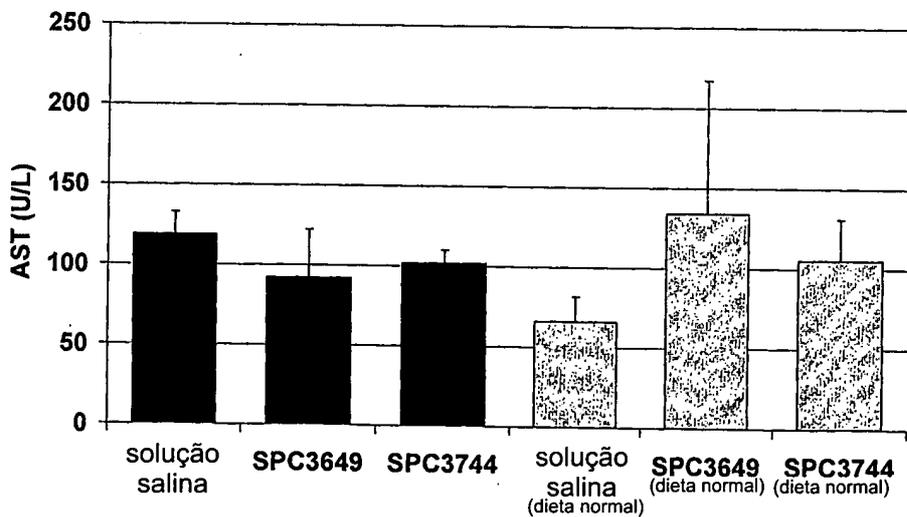


FIG. 25

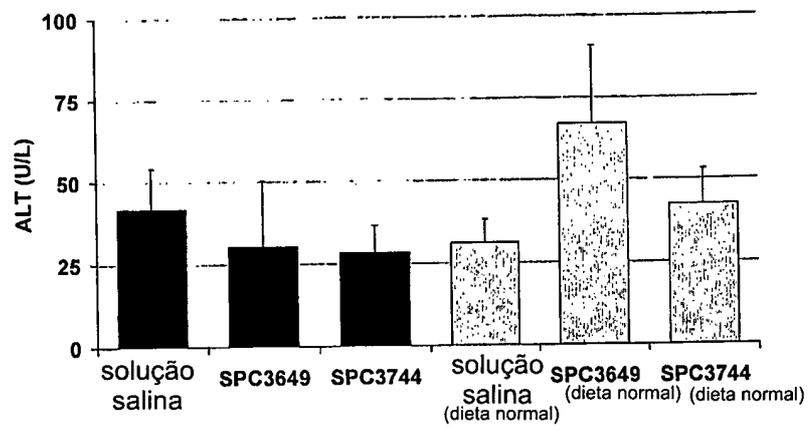


FIG. 26

LNA-antimiR's, 0.1 nM, células 518A2

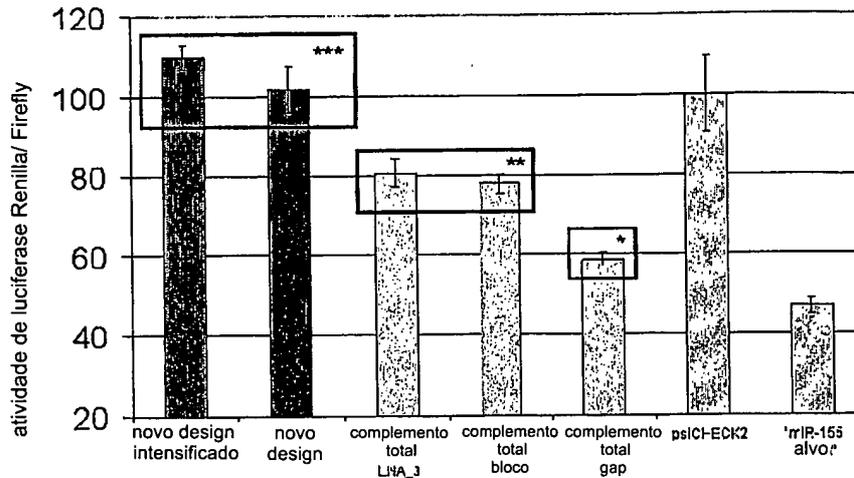


FIG. 27

LNA-antimiR's, 5 nM, HeLa

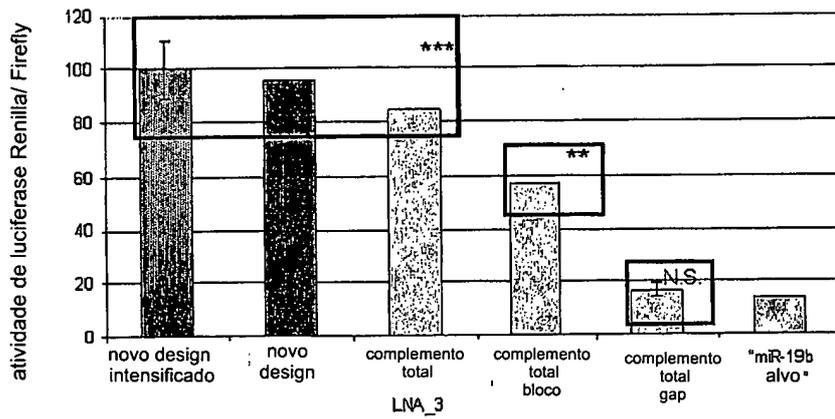


FIG. 28

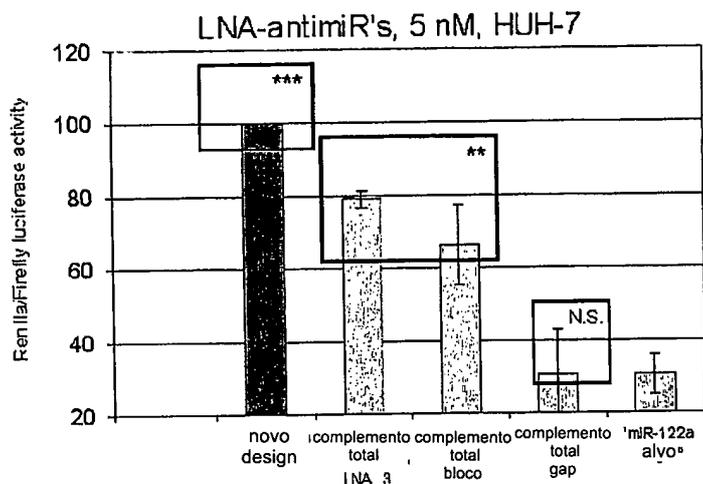


FIG. 29

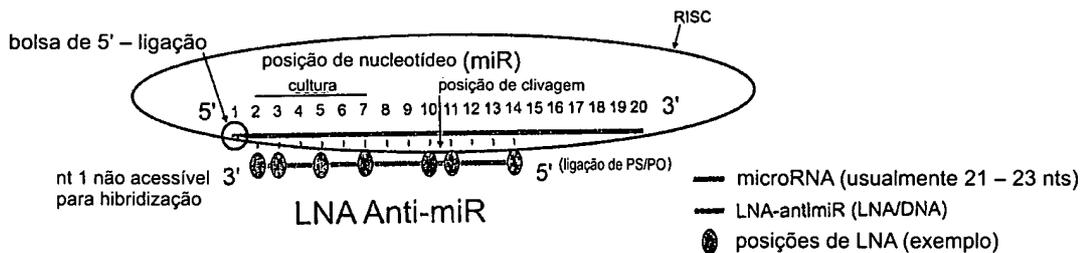


FIG. 30

RESUMO

Patente de Invenção: "COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA".

A invenção proporciona composições farmacêuticas compreendendo oligonucleotídeos de fita única, com um comprimento de entre 8 e 26 nucleobases, os quais são complementares a micro-RNAs humanos selecionados do grupo consistindo em miR19b, miR21, miR122a, miR155 e miR375. Os oligonucleotídeos curtos são particularmente eficazes no alívio de repressão de miRNA *in vivo*. Descobriu-se que a incorporação de análogos de nucleotídeo de alta afinidade nos oligonucleotídeos resulta em moléculas de anti-micro-RNA altamente eficazes os quais parecem funcionar via a formação de duplas quase irreversíveis com o alvo de miRNA ao invés de mecanismos baseados em clivagem de RNA, tais como mecanismos associados à RNaseH ou RISC.