

Telma Cristina Horta Antunes

Oligonucleótidos Antisense no Tratamento de Doenças do Sistema Nervoso Central

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas,
orientada pelo Professor Doutor Luís Fernando Morgado Pereira Almeida e apresentada à
Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Telma Cristina Horta Antunes, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2009009929, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade curricular de Acompanhamento Farmacêutico.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 20 de Junho de 2014

(Telma Cristina Horta Antunes)

O Tutor da Faculdade,

(Prof. Dr. Luís Fernando Morgado Pereira Almeida)

A Aluna,

(Telma Cristina Horta Antunes)

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Professor Doutor Luís Almeida pelo excelente tema concedido para a realização deste trabalho final, por todos os conhecimentos transmitidos e por todas as dúvidas esclarecidas.

Quero deixar ainda um especial agradecimento a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para este meu percurso.

Por tudo isto, o meu mais sincero Obrigado.

LISTA DE ABREVIATURAS

2'OMe	2'-O-Metil
AChE	Acetilcolinesterase
AME	Atrofia Muscular Espinhal
APP	Proteína Precursora Amilóide
ASOs	Oligonucleótidos Antisense
BHE	Barreira Hematoencefálica
BNA	Ácido Nucleico Bicíclico
CAG (Trinucleótido)	Citosina-Adenina-Guanina
DA	Doença de Alzheimer
DH	Doença de Huntington
DMD	Distrofia Muscular de Duchenne
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EC	Ensaio Clínico
ELA	Esclerose Lateral Amiotrófica
HTT	Huntingtina
ICV	Intracerebroventricular
IS	Intraestriatal
IT	Intratecal
IV	Intravenosa
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
LNA	Ácido Nucleico Bloqueado
MOE	2'-O-Metoxietil
mRNA	RNA mensageiro
muAPP	Proteína Precursora Amilóide mutante
muHTT	Huntingtina mutante
muSOD I	Dismutase do Superóxido I mutante
PMO	Morfolino Fosforodiamidato
PNA	Ácido Nucleico Peptídico
pré-mRNA	Precursor do mRNA
PS	Fosforotioato
RNA	Ácido Ribonucleico
RNase H	Ribonuclease H
sAPP α	Proteína Precursora Amilóide Solúvel α
sAPP β	Proteína Precursora Amilóide Solúvel β
SC	Subcutânea
SIDA	Síndrome de Imunodeficiência Adquirida
SMN	Proteína de Sobrevivência do Neurónio Motor
SNC	Sistema Nervoso Central
SNPs	Polimorfismos num Único Nucleótido
SOD I	Dismutase do Superóxido I
TTPA	Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada
UTR	Regiões não traduzidas
wtHTT	Huntingtina selvagem

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	I
LISTA DE ABREVIATURAS	II
RESUMO	2
<i>ABSTRACT</i>	2
1. INTRODUÇÃO	3
2. PROGRESSOS NA TECNOLOGIA ANTISENSE.....	3
3. MECANISMOS DE AÇÃO ANTISENSE	4
3.1. Mecanismos de Ação Degradativos.....	4
3.2. Mecanismos de Ação Não-Degradativos	5
4. MODALIDADES QUÍMICAS DOS ASOs	6
4.1. Modificações no Grupo Fosfato	7
4.2. Modificações na Pentose	9
5. APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL.....	10
5.1. Estratégias de Entrega dos ASOs no SNC.....	11
5.2. Segurança e Toxicidade dos ASOs	12
5.3. ASOs no Tratamento de Doenças Neurológicas	13
5.3.1. Estudos Pré-Clínicos.....	13
5.3.1.1. Doença de Huntington.....	14
5.3.1.2. Doença de Alzheimer.....	15
5.3.1.3. Esclerose Lateral Amiotrófica	16
5.3.1.4. Atrofia Muscular Espinhal.....	16
5.3.2. Ensaios Clínicos	17
5.3.2.1. Esclerose Lateral Amiotrófica	17
5.3.2.2. Atrofia Muscular Espinhal.....	18
5.3.2.3. Distrofia Muscular de Duchenne.....	18
6. PROPRIEDADE INTELECTUAL	19
7. MERCADO DOS ASOs	19
7.1. Estratégias das Principais Empresas	20
8. CONCLUSÃO.....	22
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23
10. ANEXOS.....	25

RESUMO

O conceito de tecnologia antisense engloba diversas técnicas que, no seu conjunto, constituem uma arma muito poderosa no estudo de determinadas doenças relacionadas com anomalias genéticas, permitindo a descoberta de tratamentos novos e mais específicos. A tecnologia baseada em oligonucleótidos antisense, uma classe de pequenas moléculas com função moduladora, representa uma das mais promissoras estratégias para supressão da expressão de um gene ou eliminação de uma mensagem genética.

Dada a complexidade do sistema nervoso central, a sua predisposição para o aparecimento de doenças é elevada, sendo muitas delas causadas apenas por pequenas variações na sequência e/ou nível de expressão genética. Assim sendo, os oligonucleótidos antisense, devido aos vários mecanismos de ação e modalidades químicas já conhecidas, têm vindo a ser estudados como uma potencial terapia nas doenças neurológicas, como a Doença de Huntington, a Doença de Alzheimer, a Esclerose Lateral Amiotrófica, a Atrofia Muscular Espinhal e a Distrofia Muscular de Duchenne.

Com o objetivo de criar novas abordagens para a prevenção e tratamento de fases iniciais ou avançadas de doenças neurológicas, várias empresas têm adotado diversas estratégias para o desenvolvimento de terapêuticas baseadas em oligonucleótidos antisense contribuindo para incrementar o mercado destas moléculas e a sua futura utilização clínica.

ABSTRACT

The concept of antisense technology includes several techniques that, together, form a very powerful weapon in the study of certain diseases associated with genetic defects, allowing the discovery of new and more specific treatments. The oligonucleotide-based antisense technique, a class of small molecules with modulating function, represent one of the most common and successful approach to achieving suppression of a gene or elimination of a genetic message.

Given the complexity of the central nervous system, it's predisposition to the onset of diseases is high, often caused by only small variations in the gene sequence and/or expression level. Thus, the antisense oligonucleotides, due to the several and already known mechanisms of action and chemical modifications, have been studied as a potential therapy in neurological diseases such as Huntington's disease, Alzheimer's disease, Amyotrophic Lateral Sclerosis, Spinal Muscular Atrophy and Duchenne Muscular Dystrophy .

With the goal of creating new approaches for prevention and treatment of early or advanced stages of neurological diseases, several companies have adopted different strategies for the development of antisense oligonucleotides-based therapies, contributing to increase the market and clinical use of these molecules.

I. INTRODUÇÃO

Os oligonucleótidos antisense (ASOs) são cadeias simples de ácidos nucleicos, curtas (12 a 25 nucleótidos) e modificadas quimicamente, que têm a capacidade de se ligar a um RNA alvo e modular a sua função. Dependendo da sua modalidade química e sequência, a ligação ASO-RNA poderá resultar no silenciamento do gene transcrito ou na alteração do processamento do RNA (SOUTHWELL et al., 2012).

Têm vindo a ser realizados estudos pré-clínicos e ensaios clínicos para estudar a ação dos ASOs no tratamento de diversas doenças. Mais recentemente, vários estudos têm sido direcionados para o tratamento de patologias do Sistema Nervoso Central (SNC), uma vez que estas representam um conjunto de doenças fisiopatologicamente complexas e com falta de opções de tratamento.

Nesta monografia irão ser abordados, de uma forma geral, os progressos ocorridos numa das mais importantes tecnologias antisense, os ASOs, seguido pelos seus vários mecanismos de ação e modalidades químicas conhecidas. Esta primeira abordagem servirá de suporte para a integração da temática emergente do uso dos ASOs nas patologias do SNC procurando-se, em primeiro lugar, conhecer as estratégias de entrega, a sua segurança e toxicidade. Serão depois apresentados alguns estudos pré-clínicos e ensaios clínicos já realizados e a decorrer, tendo como alvo, nomeadamente, a Doença de Huntington, Doença de Alzheimer, Esclerose Lateral Amiotrófica, Atrofia Muscular Espinhal e Distrofia Muscular de Duchenne. Por fim, será feita referência à propriedade intelectual e às estratégias das principais empresas farmacêuticas e de biotecnologia no que diz respeito aos medicamentos baseados nesta tecnologia antisense em desenvolvimento e já existentes no mercado.

2. PROGRESSOS NA TECNOLOGIA ANTISENSE

Ao longo dos últimos anos tem-se assistido a uma explosão de conhecimentos sobre a diversidade funcional do RNA, tendo vindo a concluir-se que, para além da sua função na biossíntese de proteínas, também desempenha um papel importante na regulação de vários processos celulares (SHARP, 2009). Contudo, em situações anormais (p.ex., anomalias genéticas), o RNA pode contribuir para o aparecimento de doenças, o que o tem tornado, cada vez mais, um alvo atraente na descoberta de novas estratégias terapêuticas. Por essa razão, várias empresas farmacêuticas e de biotecnologia têm centrado a sua actividade no desenvolvimento de tecnologias antisense capazes de modular, de forma seletiva, a função dos RNAs relacionados com o aparecimento e/ou progressão de doenças. A tecnologia baseada em ASOs, apesar de não ser um conceito recente, tem vindo a demonstrar progressos significativos, não só em estudos pré-clínicos, mas também em ensaios clínicos,

representando uma das principais estratégias com elevado potencial terapêutico (BENNETT, SWAYZE, 2010).

O efeito antisense de uma sequência de oligonucleótidos de origem sintética foi demonstrado, pela primeira vez, por Zamecnik e Stephenson em 1978 (ZAMECNIK, STEPHENSON, 1978). Quando introduziram uma sequência de ASOs, complementar à região viral responsável pela integração do vírus no genoma do hospedeiro, numa cultura celular de fibroblastos infetados com Rous Sarcoma Virus (RSV), verificaram que a sua replicação diminuiu significativamente. Este facto permitiu concluir que os ASOs, ao ligarem-se à região viral complementar, bloquearam-na e, conseqüentemente, inibiram a integração do vírus no genoma do hospedeiro. Estes resultados cativaram a atenção de outros grupos, que estudaram mais aprofundadamente esta capacidade dos ASOs interferirem com processos genéticos (INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES, INC., 2011).

3. MECANISMOS DE AÇÃO ANTISENSE

Os mecanismos de ação antisense são definidos como processos em que estruturas antisense (p.ex., ASOs) se ligam a RNAs alvo complementares, formando cadeias duplas. Estas ligações levam à modulação da função desses RNAs, impedindo-os de funcionar corretamente e, conseqüentemente, de produzirem as respectivas proteínas (ISIS PHARMACEUTICALS, INC., 2014a).

Os ASOs atuam através de vários mecanismos de ação que, de um modo geral, podem ser divididos em dois grupos: mecanismos degradativos, em que as cadeias de RNA são clivadas por endonucleases (p.ex., RNase H), ou mecanismos não-degradativos, em que há interferência com a função dos RNAs, originando produtos modificados, sem que ocorra a sua degradação (p.ex., inibição da formação da extremidade 5', modulação do *splicing*, modulação da poliadenilação e inibição da tradução) (BENNETT, SWAYZE, 2010). Na figura 1 encontra-se esquematizado os diferentes mecanismos de ação dos ASOs.

3.1. Mecanismos de Ação Degradativos

Os ASOs que funcionam através mecanismos de ação degradativos, em que a clivagem das cadeias de RNA alvo é dependente de uma endonuclease, a RNase H, são os mais bem estudados e compreendidos, representando a maioria dos fármacos em desenvolvimento (BENNETT, SWAYZE, 2010). A RNase H é ativada quando cada ASO se liga ao seu RNA alvo complementar, formando a cadeia dupla ASO-RNA (ISIS PHARMACEUTICALS, INC., 2014a). Após ativação, a RNase H reconhece e cliva o RNA da cadeia dupla, inibindo a produção da respectiva proteína (silenciamento do gene transcrito),

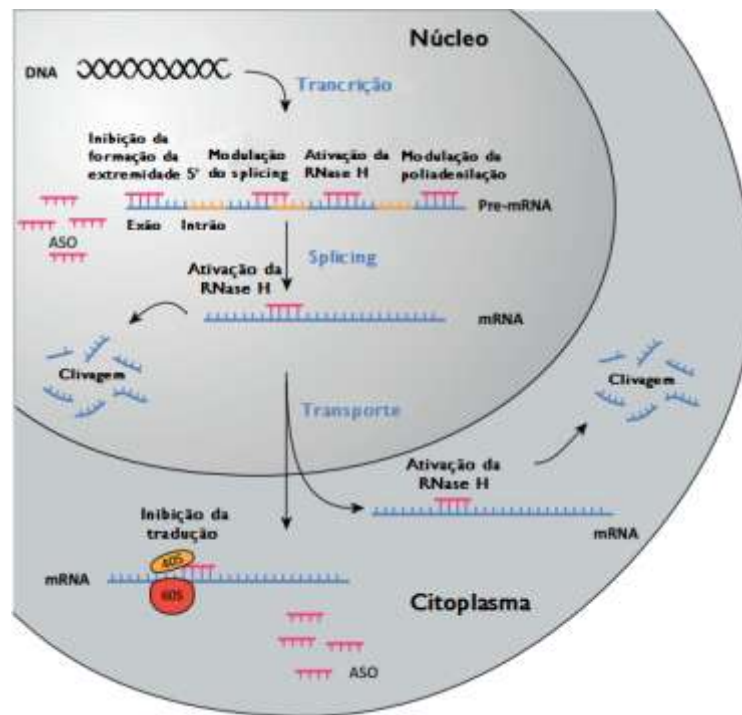


Figura 1 – Mecanismos de ação dos ASOs. Os ASOs podem ligar-se às cadeias de RNA transcritas, incluindo tanto o pré-mRNA no núcleo como o mRNA maduro no citoplasma, e interagir com intrões, exões e regiões não traduzidas (UTR). Dependendo da sua modalidade química e sequência, os ASOs podem atuar através de diferentes mecanismos de ação, nomeadamente, mecanismos que, através de endonucleases (p.ex., RNase H), promovem a degradação das cadeias de RNA (mecanismos degradativos), ou mecanismos em que há alteração do metabolismo dessas cadeias, sem que ocorra a sua degradação, onde se incluem a inibição da formação da extremidade 5', a modulação do *splicing*, a modulação da poliadenilação e a inibição da tradução (mecanismos não-degradativos). Adaptado de SOUTHWELL et al., 2012.

e liberta o ASO intacto, permitindo que um único ASO seja responsável pela degradação de várias cadeias de RNA que lhe sejam complementares (ISIS PHARMACEUTICALS, INC., 2014a; CERRITELI, CROUCH, 2009). Dos dois tipos de RNase existentes, a RNase H1 e a RNase H2, ambas importantes na replicação e reparação do DNA, apenas a RNase H1 é responsável pelos mecanismos de ação degradativos dirigidos pelos ASOs (WU et al., 2004).

3.2. Mecanismos de Ação Não-Degradativos

Em simultâneo com o silenciamento de genes transcritos, promovido pelos mecanismos de ação degradativos, os ASOs foram também desenvolvidos para alterarem o processamento das cadeias de RNA alvo, resultando na formação de produtos modificados (BENNETT, SWAYZE, 2010). Este efeito é conseguido através de mecanismos de ação não-degradativos, dos quais fazem parte: a inibição da formação da extremidade 5', a modulação do *splicing* (que tem um grande número de ASOs em estudo com potencial terapêutico), a modulação da poliadenilação e a inibição da tradução (SOUTHWELL et al., 2012).

A maioria das cadeias de RNA, logo após a transcrição (pré-mRNA), sofrem uma série de etapas de processamento até chegarem a mRNA maduro no citoplasma, apto para a tradução. Nessas etapas estão incluídas a formação da extremidade 5', o *splicing* e a poliadenilação (SHARP, 2009). O *splicing* é o processo através do qual as regiões das cadeias de pré-mRNA que não são necessárias para a produção de proteínas (intrões) são eliminadas. Através do processo de *splicing* alternativo podem ser criadas, a partir de um único gene, diversas proteínas com diferentes funções, incluindo proteínas que poderão estar envolvidas no aparecimento e/ou progressão de doenças (ISIS PHARMACEUTICALS, INC., 2014a). Vários estudos têm demonstrado que os ASOs são capazes de se ligar às cadeias de pré-mRNA e modular o *splicing*, resultando na eliminação (*exon skipping*) ou inclusão de exões (*exon inclusion*). Além disso, os ASOs são também capazes de alterar o local de poliadenilação e inibir a formação da extremidade 5' das cadeias de pré-mRNA, o que reforça a ideia de que estas estruturas podem funcionar como estratégia terapêutica em doenças que envolvam alterações do metabolismo intermediário do RNA (BENNETT, SWAYZE, 2010).

No mecanismo de inibição da tradução, os ASOs são concebidos para se ligarem à região de iniciação da tradução das cadeias de mRNA complementares e atuam bloqueando a ligação da subunidade 40S do ribossoma à cadeia de mRNA, inibindo a formação do complexo ribossômico (subunidades 40S e 60S) ou dificultando o movimento do complexo ribossômico através da cadeia de mRNA. Contudo, este mecanismo apresenta limitações quanto ao seu potencial uso terapêutico, nomeadamente, a dificuldade de documentar a atividade farmacológica destes ASOs devido à variabilidade de moléculas suscetíveis de serem detetadas (isto porque a inibição da tradução não diminui os níveis de mRNA) e a sequência limitada das cadeias de mRNA envolvidas no início da tradução (BENNETT, SWAYZE, 2010).

4. MODALIDADES QUÍMICAS DOS ASOs

Desde a primeira demonstração do efeito antisense de uma sequência sintética de oligonucleótidos não modificada numa cultura celular, por Zamecnik e Stephenson em 1978, têm-se observado grandes progressos no desenvolvimento de ASOs. Têm sido introduzidas várias modalidades químicas de ASOs com o objetivo de melhorar as suas propriedades farmacológicas, encontrando-se em curso numerosos ensaios clínicos (KOLE et al., 2012).

Os ácidos nucleicos (DNA e RNA) não modificados, devido à sua instabilidade química, são moléculas bastante suscetíveis à ação das nucleases, que clivam as ligações fosfodiéster responsáveis pela manutenção da estrutura das cadeias de ácidos nucleicos. Este

facto impede o uso destas moléculas para fins terapêuticos uma vez que são rapidamente degradadas *in vivo*, não alcançando o seu alvo. Além disso, as suas propriedades farmacocinéticas potenciam o fracasso da terapêutica uma vez que, para serem eficazes, necessitam de ser administradas em doses elevadas, o que aumenta a probabilidade de ocorrerem efeitos adversos, o seu grau de ligação às proteínas plasmáticas é baixo e são rapidamente filtradas pelos rins e eliminadas na urina (BENNETT, SWAYZE, 2010).

Com o objetivo de otimizar as propriedades farmacológicas das cadeias de ácidos nucleicos, têm sido introduzidas várias modificações químicas na sua estrutura, sendo o grupo fosfato e a pentose os dois locais mais suscetíveis de sofrerem essas modificações (DEVOS, MILLER, 2013). As modificações químicas permitem melhorar a estabilidade dos ASOs no organismo, a capacidade de se movimentarem em determinadas células e tecidos, a especificidade e força de ligação às moléculas alvo, o perfil de efeitos adversos e a capacidade para serem metabolizados e eliminados do organismo (ISIS PHARMACEUTICALS, INC., 2014b). Na Figura 2 estão representadas várias modalidades químicas de ASOs já disponíveis.

4.1. Modificações no Grupo Fosfato

Tendo em conta a suscetibilidade das ligações fosfodiéster à ação das nucleases, o grupo fosfato dos ASOs constitui um dos primeiros locais a considerar para se proceder a modificações químicas (BENNETT, SWAYZE, 2010). As modificações no grupo fosfato dão origem a estruturas mais resistentes à ação das nucleases, o que permite aumentar o tempo de semi-vida dos ASOs. Dentro deste grupo, a modificação mais antiga e melhor caracterizada é designada por fosforotioato (PS), que consiste na substituição de um oxigénio não-ligante do grupo fosfato por um átomo de enxofre (ver figura 2) (SOUTHWELL et al., 2012). Esta modificação confere diversas propriedades aos ASOs que são cruciais para o seu uso terapêutico, nomeadamente, o facto de permitir aumentar significativamente a sua estabilidade no organismo e de induzir eficientemente a clivagem das cadeias de RNA alvo pela RNase H (STEIN et al., 1988). Além disso, são ainda conferidas propriedades farmacocinéticas importantes, sobretudo, o aumento da ligação às proteínas plasmáticas e a diminuição da excreção renal. Os ASOs com esta modalidade química são designados por ASOs de primeira geração, representando os primeiros fármacos antisense estudados (BENNETT, SWAYZE, 2010).

Uma outra modificação química do grupo fosfato dá origem a estruturas designadas por fosforamidatos, em que o oxigénio da posição 3' da pentose é substituído por um grupo amina (GRYAZNOV et al., 1995). Adicionalmente, nos tiofosforamidatos, que apresentam melhor estabilidade em meio ácido, um dos oxigénios não-ligantes do grupo fosfato é

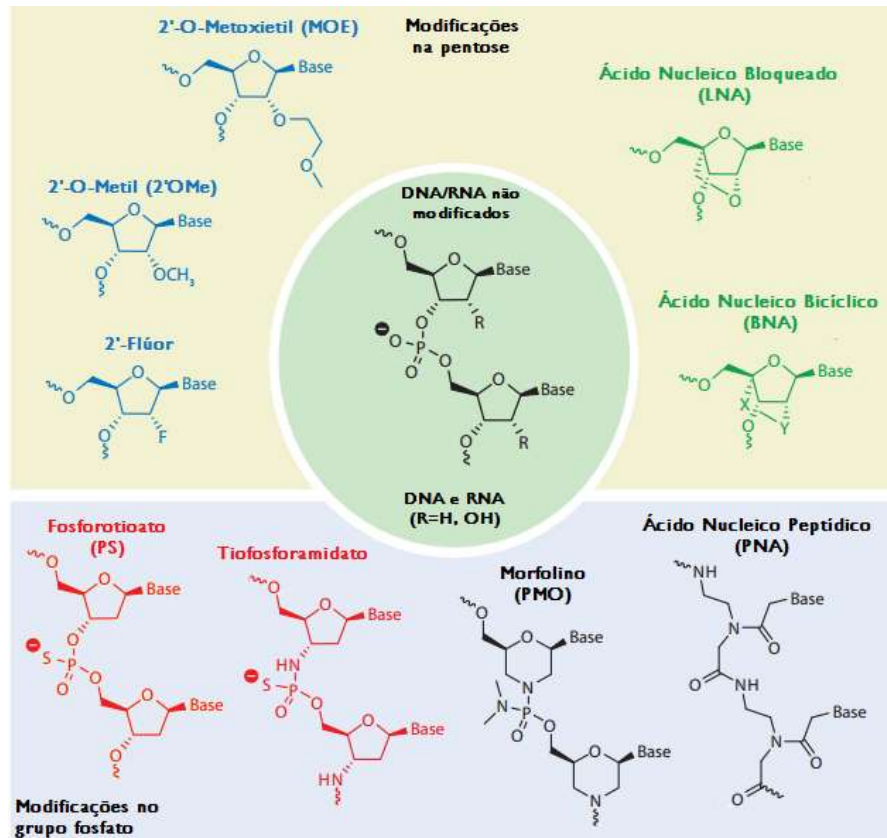


Figura 2 – Exemplos de modalidades químicas de ASOs. Os ácidos nucleicos não modificados são rapidamente degradados por nucleases, o que reduz drasticamente o seu potencial terapêutico. Modificações no grupo fosfato fazem aumentar a resistência às nucleases e modificações na pentoses melhoram a afinidade de ligação às moléculas alvo, incrementando a qualidade dos ASOs como fármacos. Adaptado de BENNETT, SWAYZE, 2010; SOUTHWELL et al., 2012.

substituído por um átomo de enxofre (ver figura 2) (PONGRACZ, GRYAZNOV, 1999). Estas modalidades químicas são altamente resistentes à ação das nucleases mas não ativam a RNase H (BENNETT, SWAYZE, 2010).

Os morfolinos fosforodiamidatos (PMOs) e os Ácidos Nucleicos Peptídicos (PNAs) são exemplos de gerações posteriores de ASOs com modificações no grupo fosfato, que afetam também a pentose (ver Figura 2). Nos PMOs, a furanose é substituída por um anel morfolino e a ligação entre o átomo de azoto desse anel e o grupo hidroxilo da extremidade 3' faz-se através de uma ligação fosforodiamidato, o que torna estas estruturas neutras (SUMMERTON, 1999). Os PNAs apresentam uma estrutura muito distinta das referidas anteriormente, em que a pentose e o grupo fosfato são totalmente substituídos por um grupo peptídico (NIELSEN et al., 1991). Esta modalidade química, de carácter neutro, apresenta uma solubilidade limitada e dificuldades de distribuição, que podem ser solucionadas utilizando péptidos curtos e aminoácidos carregados (BENNETT, SWAYZE, 2010). Os PMOs e PNAs originam ASOs altamente resistentes à ação das nucleases mas não

ativam a RNase H, utilizando, desta forma, mecanismos de ação não-degradativos, sobretudo, a inibição da tradução e a modulação do *splicing* (SOUTHWELL et al., 2012).

4.2. Modificações na Pentose

Desde a sua descoberta, as estruturas com modificações na posição 2' da pentose, consideradas de segunda geração, têm sido uma mais valia na melhoria das propriedades farmacológicas dos ASOs em estudo. Estas modificações permitem não só melhorar a afinidade de ligação às cadeias de RNA alvo mas também aumentar a resistência às nucleases, devido à conformação e proximidade de interação entre o 2'-substituinte e o 3'-fosfato (BENNETT, SWAYZE, 2010). Dentro deste grupo, a modalidade química mais utilizada é o 2'-O-Metoxietil (MOE, ver Figura 2) que, para além das características supra mencionadas, tem ainda a vantagem de inibir algumas interações não-específicas com proteínas, o que pode reduzir a sua toxicidade (TEPLOVA et al., 1999). Contudo, a maioria das estruturas 2'-modificadas reduzem ou inibem completamente a capacidade da RNase H para clivar as cadeias de RNA alvo, o que restringe a sua utilização. Esta limitação pode ser minimizada através da utilização de uma estratégia “gapmer” (ver Figura 3), em que ambas as extremidades do ASO, constituídas por modificações na posição 2' da pentose, flanqueiam uma região central, constituída por modificações fosforotioato. As extremidades 2'-modificadas permitem aumentar a afinidade de ligação dos ASOs às cadeias de RNA alvo e sua resistência às nucleases, enquanto que a região central possibilita a ativação da RNase H e a posterior clivagem das cadeias de RNA alvo (BENNETT, SWAYZE, 2010).

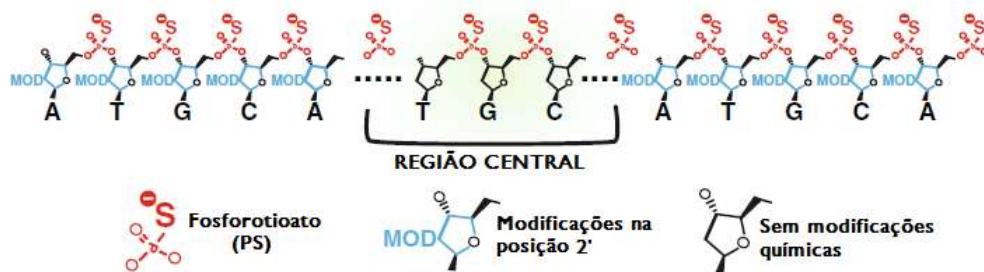


Figura 3 – ASO “gapmer”. ASO constituído por uma região central apenas com modificações fosforotioato, que são reconhecidas pela RNase H levando à sua ativação, flanqueadas por extremidades 2'-modificadas, que aumentam a resistência do ASO às nucleases e melhoram a sua afinidade de ligação às cadeias de RNA alvo. Adaptado de DEVOS, MILLER, 2013.

O aumento de afinidade de ligação observado nas estruturas 2'-modificadas é, em parte, conferido pela electronegatividade do substituinte da posição 2' da pentose (BENNETT, SWAYZE, 2010). Como tal, os ASOs com modificações 2'-Flúor (ver Figura 2), devido à sua elevada electronegatividade, são os que apresentam maior afinidade de ligação

às cadeias de RNA alvo (FREIER, ALTMANN, 1997).

Os ASOs com modificações 2'-O-alkil, como, por exemplo, 2'-O-Metil (ver figura 2), apesar de a sua afinidade de ligação ser menor relativamente às modificações 2'-Flúor, apresentam um aumento significativo no grau de resistência às nucleases (BENNETT, SWAYZE, 2010).

As modalidades químicas 2'-O-Metoxietil (MOE, ver Figura 2) são as modificações na posição 2' da pentose mais avançadas e os ASOs que as contêm têm sido utilizados em diversos ensaios clínicos (BENNETT, SWAYZE, 2010).

Os Ácidos Nucleicos Bloqueados (LNA) e Bicíclicos (BNA), representados na Figura 2, são modalidades químicas de gerações posteriores de ASOs, que apresentam uma particularidade nas suas estruturas: as posições 2' e 4' da pentose estão ligadas (bloqueio da conformação), o que permite aumentar ainda mais a afinidade de ligação às cadeias de RNA alvo (BENNETT, SWAYZE, 2010). Os LNAs não permitem a ativação da RNase H, pelo que devem também ser utilizadas estratégias “gapmer” com estas modalidades químicas (KURRECK et al., 2002). Estas estruturas, apesar de apresentarem alguma toxicidade, têm vantagens relativamente às restantes modificações na posição 2' da pentose (SWAYZE et al., 2007). Estas novas gerações de modalidades químicas constituem uma ferramenta poderosa no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (SOUTHWELL et al., 2012).

A Tabela I resume as várias modalidades químicas de ASOs supra mencionadas, bem como as suas principais características.

Tabela I – Resumo das principais características das diversas modalidades químicas de ASOs.

	Modalidade Química	Resistência às nucleases	Ativação da RNase H
Ácidos Nucleicos não modificados	DNA, RNA	Não	Sim
Modificações no grupo fosfato	Fosforotioato (PS)	Sim	Sim
	Tiofosforamidato	Sim	Não
	PMO	Sim	Não
	PNA	Sim	Não
Modificações na pentose	2'-Flúor	Sim	Não
	2'OMe	Sim	Não
	MOE	Sim	Não
	LNA	Sim	Não
	BNA	Sim	Não
ASO “gapmer”	-----	Sim	Sim

5. APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

O SNC representa um dos sistemas mais complexos do corpo humano, sendo caracterizado pelas suas sofisticadas vias de regulação celular, diversidade celular, propriedades membranares e redes neuronais. No entanto, tal complexidade predispõe-no a

uma grande variedade de doenças, a maioria causadas apenas por pequenas variações na sequência e/ou nível de expressão genética (FORTE et al., 2005).

Atualmente, sabe-se que aproximadamente 50% de todas as doenças genéticas são causadas por mutações que alteram o *splicing* do pré-mRNA. Considerando que no cérebro ocorre mais *splicing* alternativo do que em qualquer outro tecido humano, ao modular este processo podem ter-se implicações a longo prazo no tratamento de doenças neurológicas (MILLS, JANITZ, 2012). Assim, os ASOs, atendendo às suas propriedades farmacológicas, são moléculas cada vez mais posicionadas como potenciais terapias em doenças neurológicas. Para serem eficientes e seguros como terapêutica, os ASOs devem chegar ao SNC e ligarem-se de forma seletiva às cadeias de RNA alvo. Isto requer uma absorção eficaz, uma biodistribuição apropriada e um tempo de semi-vida suficiente no interior de tecidos (SOUTHWELL et al., 2012).

5.1. Estratégias de Entrega dos ASOs no SNC

A entrega dos ASOs no SNC constitui um dos maiores desafios uma vez que estas moléculas são altamente carregadas, o que dificulta a sua passagem através da BHE (SMITH et al., 2006). Atualmente, encontram-se disponíveis estratégias que permitem otimizar a entrega dos ASOs às células-alvo, sendo que uma mais utilizadas, tanto na administração local como sistêmica, consiste na formação de bioconjugados, em que aos ASOs são adicionadas determinadas moléculas de modo a melhorar as suas características farmacocinéticas. A adição de substituintes lipófilos (p. ex., colesterol) permite aumentar a afinidade para os recetores da superfície celular, enquanto que a adição de péptidos catiónicos melhora a entrega e transferência para as células-alvo (BENNETT, SWAYZE, 2010). Para além da formação de bioconjugados, têm também sido estudadas outras estratégias de entrega de ASOs, nomeadamente, a utilização de vetores não-virais (p.ex, polímeros biodegradáveis, lipossomas e nanopartículas) e de vetores virais (p.ex., lentivírus e adenovírus) (FORTE et al., 2005).

Uma maneira de contornar a dificuldade de passagem através da BHE consiste em administrar diretamente os ASOs no líquido cefalorraquidiano (LCR), permitindo a sua distribuição eficiente em todo o SNC (SMITH et al., 2006). As administrações via intraparenquimatosa e diretamente no LCR foram comparadas e, embora ambas sejam eficazes, a segunda via referida permite uma melhor distribuição dos ASOs no SNC (PASSINI et al., 2011). A via intratecal (IT), frequentemente utilizada para corticoterapia, analgesia ou anestesia, apesar de ser mais invasiva relativamente à administração sistêmica, é muito menos invasiva e associada a menos riscos quando comparada com a via intracraniana. A

administração direta no SNC apresenta ainda a vantagem de não ser necessário recorrer a vetores virais ou não-virais como estratégia de entrega de ASOs, o que reduz o risco de ativação de resposta imunitária e permite um controlo mais rigoroso da dose ou interrupção do tratamento em caso de efeitos adversos (SOUTHWELL et al., 2012). Todas estas estratégias de entrega continuam a ser estudadas, de modo a tornarem os ASOs opções atraentes no tratamento de distúrbios do SNC.

5.2. Segurança e Toxicidade dos ASOs

Os ASOs, tal como todos os outros fármacos, apresentam toxicidade dependente da dose. Os ASOs que estão melhor caracterizados quanto à sua segurança são os que exibem estruturas fosforotioato e MOE, devido ao número elevado de participações em estudos pré-clínicos e ensaios clínicos (BENNETT, SWAYZE, 2010).

Os efeitos adversos observados para os ASOs podem ser classificados como dependentes ou independentes de hibridização e encontram-se descritos na Tabela 2.

Tabela 2 – Exemplos de efeitos adversos observados para os ASOs. Os efeitos adversos observados para os ASOs podem ser classificados como dependentes de hibridização, em que é necessário a ligação a determinadas estruturas (alvo ou não-alvo) para se observarem efeitos adversos, ou independentes de hibridização, em que surgem efeitos adversos sem que seja necessário ocorrer a hibridização. Adaptado de BENNETT, SWAYZE, 2010.

	Dependente de Hibridização	Independente de Hibridização
Estudos Pré-clínicos	Toxicidade no alvo (<i>on-target</i>): - Efeitos farmacológicos excessivos	Interações com proteínas plasmáticas: - Prolongamento do TTPA; - Ativação do complemento. Interações com tecidos/células: - Efeitos pró-inflamatórios; - Diminuição do número de plaquetas; - Rim: efeitos nas células dos túbulos proximais (doses elevadas); - Fígado: aumento das enzimas hepáticas.
	Toxicidade fora do alvo (<i>off-target</i>): - Hibridização a genes não-alvo	
Ensaio Clínicos	Não descritos	Interações com proteínas plasmáticas: - Prolongamento do TTPA. Interações com tecidos/células: - Reações no local da injeção; - Sintomas gerais (p.ex., febre, calafrios, artralgia, cefaleias); - Diminuição do número de plaquetas.

Os efeitos adversos dependentes de hibridização a estruturas alvo podem ser evitados ou minimizados através da seleção adequada dos RNAs alvo e da caracterização cuidadosa das propriedades farmacológicas e toxicidade dos ASOs. Os efeitos adversos dependentes de hibridização a estruturas não-alvo, apesar de serem mais difíceis de

controlar, podem ser previstos recorrendo às ferramentas da bioinformática (BENNETT, SWAYZE, 2010).

A maioria dos efeitos adversos independentes de hibridização são devidos a interações dos ASOs com proteínas plasmáticas (SOUTHWELL et al., 2012). Geralmente, o aparecimento deste tipo de toxicidade depende da modalidade química dos ASOs e das proteínas com as quais interagem, resultando, sobretudo, em alterações da coagulação, ativação do complemento e da resposta imunitária. Clinicamente, os ASOs de primeira e segunda geração demonstraram vários efeitos adversos deste tipo, nomeadamente, o prolongamento do Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPA), reações no local da injeção e sintomas gerais (p.ex., febre, calafrios, artralgia e cefaleias). Ocasionalmente, foi também observado para alguns ASOs a diminuição do número de plaquetas. O perfil de segurança das modalidades químicas de gerações posteriores de ASOs encontra-se ainda em fase de estudo (BENNETT, SWAYZE, 2010).

5.3. ASOs no Tratamento de Doenças Neurológicas

A terapêutica com ASOs em doenças neurológicas tem como objetivo o silenciamento do gene transcrito, no caso de distúrbios em que se verifica o ganho de função, ou a modulação do processamento do RNA, no caso de distúrbios onde ocorre a perda de função, restaurando a função da proteína alterada ou compensando a sua perda. As doenças neurológicas que têm uma base genética bem definida são oportunidades ideais para a terapêutica com ASOs, permitindo uma intervenção precoce ou pré-sintomática associada a um risco reduzido (SOUTHWELL et al., 2012).

Nos últimos anos têm sido realizados vários estudos pré-clínicos e ensaios clínicos com o objetivo de estudar a ação dos ASOs no tratamento de diversas doenças, sobretudo, doenças cardiovasculares, virais, inflamatórias e cancro (FORTE et al., 2005). Mais recentemente, devido à complexa fisiopatologia e falta de opções de tratamento das doenças neurológicas, como é o caso das Doenças de Huntington e de Alzheimer, da Esclerose Lateral Amiotrófica, da Atrofia Muscular Espinhal e da Distrofia Muscular de Duchenne, alguns estudos pré-clínicos (ver Tabela 3) e ensaios clínicos (ver Tabela 4) têm sido direcionados para o estudo do potencial terapêutico dos ASOs nestas doenças.

5.3.1. Estudos Pré-Clínicos

A Tabela 3 apresenta alguns estudos pré-clínicos já realizados, que utilizaram ASOs como estratégia terapêutica em doenças neurológicas.

Tabela 3 – Estudos pré-clínicos que utilizaram ASOs para o tratamento de doenças neurológicas.

Doença	Modalidade Química	Alvo	Mecanismo de Ação	Via de Administração	Estado	Ref.
DH	MOE	HTT	RNase H	ICV (infusão)	Pré-clínico (roedores)	KORDASIEWICZ et al., 2012
	MOE	muHTT SNPs	RNase H	IS (injeção)	Pré-clínico (roedores)	CARROLL et al., 2011
DA	MOE	muAPP	Inibição da tradução	ICV (injeções)	Pré-clínico (roedores)	CHAUHAN, SIEGEL, 2007
ELA	MOE	SOD1	RNase H	ICV (infusão)	Pré-clínico (roedores)	SMITH et al., 2006
AME	PMO	SMN2	Modulação do splicing (<i>exon inclusion</i>)	ICV (injeção)	Pré-clínico (roedores)	PORENSKY et al., 2012
	MOE	SMN2	Modulação do splicing (<i>exon inclusion</i>)	ICV e SC (injeção)	Pré-clínico (roedores)	HUA et al., 2011

5.3.1.1. Doença de Huntington (DH)

A DH é uma doença neurodegenerativa autossômica dominante caracterizada, sobretudo, pela perda progressiva do controle do movimento, distúrbios psiquiátricos e declínio cognitivo (ROSS, TABRIZI, 2011). É causada pela expansão do trinucleótido CAG (acima de 36 repetições) no exão I do gene que codifica a huntingtina (HTT), sendo a toxicidade conferida pela proteína mutante (muHTT) (SAH, ARONIN, 2011). A huntingtina selvagem (wtHTT) é neuroprotetora e desempenha funções importantes em vários processos celulares, pelo que as estratégias que utilizam ASOs com potencial terapêutico devem ter como alvo apenas a muHTT (ZUCCATO et al., 2010).

Num estudo pré-clínico (ver Tabela 3), foram administrados, através de infusão ICV, modalidades químicas MOE específicas para a HTT humana em murganhos transgênicos YAC128 com DH, que expressavam tanto a muHTT humana como a wtHTT endógena. Obtiveram-se como resultados uma ampla distribuição dos ASOs por todo o cérebro, uma redução de 60% a 75% da muHTT humana até 12 semanas após a administração e uma melhoria dos sintomas característicos da doença (KORDASIEWICZ et al., 2012). No entanto, apesar deste tipo de ASOs terem apenas como alvo a muHTT nesta espécie de murganhos, pensa-se que o seu uso em humanos poderá afetar também a função da wtHTT (SOUTHWELL et al., 2012).

Uma outra estratégia mais específica tem como alvo os polimorfismos relacionados com a expansão do trinucleótido CAG (SOUTHWELL et al., 2012). Mais de 2000 polimorfismos num único nucleótido (SNPs) foram identificados na região do gene que codifica a HTT, alguns dos quais estão intimamente relacionados com a expansão do trinucleótido CAG (WARBY et al., 2009). Ao sequenciar-se essa região em portadores da doença torna-se possível uma seleção mais adequada de ASOs que poderão ter como alvo

apenas um SNP presente nessa região. Um elevado número de modalidades químicas MOE que têm como alvo SNPs terapeuticamente relevantes foram estudadas em linhas celulares quanto à sua potência e seletividade para a muHTT. Com estas características foram identificados quatro ASOs, que apresentaram reduções entre 39% a 68% dos níveis de muHTT e reduções não significativas dos níveis wtHTT. Estes resultados foram também demonstrados em duas espécies distintas de murganhos, um que expressava a muHTT humana e outro a wtHTT humana (SOUTHWELL et al., 2012). A administração de ASOs específicos para um determinado SNP (ver Tabela 3), através de uma injeção via IS, permitiu diminuir em 55% os níveis de muHTT, não se verificando reduções significativas nos níveis de wtHTT. Já a administração de ASOs não específicos para SNPs diminuiu em 80% as concentrações de ambas as proteínas (CARROLL et al., 2011).

5.3.1.2. Doença de Alzheimer (DA)

A DA é uma doença neurodegenerativa progressiva caracterizada pela deposição de placas de agregados peptídicos β -amilóides e emaranhados neurofibrilares, constituídos pela proteína Tau hiperfosforilada, resultando em atrofia cortical, perda de neurónios colinérgicos e sua função, e subsequente declínio cognitivo e morte (FINDER, 2011). O peptídeo β -amilóide deriva do processamento da Proteína Precursora Amilóide (APP), que pode ocorrer através de duas vias distintas: na via mais comum, não tóxica, a APP é clivada pelas enzimas α - e γ -secretases, produzindo o sAPP α e um fragmento P3 não-amiloidogénico; na via menos comum, tóxica, a APP é clivada pelas enzimas β - e γ -secretases, produzindo o sAPP β e o peptídeo β -amilóide. Algumas formas familiares da DA são causadas por mutações nos genes envolvidos no processamento da APP (muAPP). Por exemplo, na mutação Sueca, que se caracteriza por uma mutação dupla próximo do local de clivagem da β -secretase no gene APP, verifica-se um aumento da clivagem no local β e a deslocação do processamento da APP no sentido da via tóxica (SOUTHWELL et al., 2012).

Estudos em murganhos transgênicos com a mutação Sueca da DA (ver Tabela 3) evidenciaram uma diminuição dos níveis de sAPP α , um aumento dos níveis de peptídeo β -amilóide e da acetilcolinesterase (AChE), que é a enzima responsável pela finalização da transmissão dos impulsos nervosos nas sinapses colinérgicas (SOUTHWELL et al., 2012). Ao administrarem-se, através de injeções ICV, ASOs que tinham como alvo essa mutação, verificou-se um aumento de 43% dos níveis de sAPP α , uma diminuição de 39% do peptídeo β -amilóide e uma redução da AChE para os níveis considerados normais (CHAUHAN, SIEGEL, 2007).

5.3.1.3. Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA)

A ELA é uma doença neurodegenerativa que se caracteriza pela degeneração progressiva dos neurónios motores (HARDIMAN et al., 2011). Algumas formas familiares, cerca de 20%, são causadas por mutações que ocorrem na enzima dismutase do superóxido I (muSODI) (KUZMA-KOZAKIEWICZ, KWIECINSKI, 2011).

Num estudo pré-clínico (ver Tabela 3), a administração, através de infusão ICV, ao longo de 28 dias, de modalidades químicas de ASOs específicas para a muSODI humana, em ratos transgênicos pré-sintomáticos com ELA, reduziu significativamente os níveis de mRNA muSODI e em 50% os níveis da proteína muSODI. Esta estratégia de tratamento não evitou a perda de peso corporal nem atrasou o aparecimento dos sintomas mas, em comparação com outras estratégias anteriormente utilizadas, evidenciou uma lenta progressão da doença e um aumento de 37% na sobrevivência (SMITH et al., 2006).

5.3.1.4. Atrofia Muscular Espinhal (AME)

A AME é uma doença neuromuscular provocada pela deleção do gene SMN1 e que pode ser clinicamente classificada em três tipos, sendo o tipo I a forma mais grave da doença, o tipo II uma forma intermédia e o tipo III a forma menos agressiva da doença (IANNACCONE, 1998). A deleção do gene SMN1 e a consequente perda de respetiva proteína (SMN) levam à degeneração dos neurónios da medula espinal e à posterior atrofia e fraqueza muscular. Como resultado de uma duplicação cromossómica, existe ainda o gene SMN2 que é idêntico ao gene SMN1 (SOUTHWELL et al., 2012). Contudo, uma mutação silenciosa leva à alteração do *splicing* nos transcritos do gene SMN2 e, consequentemente, conduz à exclusão do exão 7 em 80-95% dos casos, resultando numa proteína instável que é rapidamente degradada (ZHOU et al., 2012; LORSON et al. 1999). Assim, uma das potenciais estratégias de tratamento da AME consiste em aumentar os níveis de produção da proteína SMN através da utilização de ASOs com capacidade de modulação do *splicing* (SOUTHWELL et al., 2012).

Vários estudos pré-clínicos (ver Tabela 3) têm demonstrado que a modulação do *splicing* do mRNA proveniente do gene SMN2, de modo a incluir o exão 7 (*exon inclusion*), pode resultar no aumento de produção da proteína SMN, melhorando os sintomas da doença. Entre estes, a administração de PMOs que tinham como alvo uma molécula reguladora do *splicing* do SMN2 (ISS-NI), através de injeção ICV, em murganhos recém-nascidos com AME grave (P0), resultou em melhorias significativas, incluindo um aumento de 15 a 112 dias na sobrevivência destes animais. A administração destes ASOs quatro dias após o nascimento (P4) resultou apenas numa ligeira melhoria da sobrevivência, o que reforça a

necessidade de intervenção precoce no tratamento desta doença (PORENSKY et al., 2012). Um outro estudo mostrou um aumento do benefício terapêutico ao administrar-se sistemicamente (via SC) oligonucleótidos do tipo MOE em murganhos com AME grave, sugerindo que a degeneração ocorre não só nos neurónios motores mas também nos tecidos periféricos (HUA et al., 2011).

5.3.2. Ensaios Clínicos

A Tabela 4 apresenta alguns dos ensaios clínicos, completos e a decorrer, que utilizam ASOs como estratégia terapêutica em doenças neurológicas.

Tabela 4 – Ensaios Clínicos que utilizam ASOs para o tratamento de doenças neurológicas.

Doença	Modalidade Química	Alvo	Mecanismo de Ação	Via de Administração	Estado	Ref./n.º de identificação EC
ELA	MOE	SOD1	RNase H	IT (infusão)	Fase I completa	MILLER et al., 2012 NCT01041222
AME	MOE	SMN2	Modulação do splicing (<i>exon inclusion</i>)	IT (injeção)	Fase I completa	NCT01494701
	MOE	SMN2	Modulação do splicing (<i>exon inclusion</i>)	IT (injeções)	Fase I/II em progresso	NCT01703988
	MOE	SMN2	Modulação do splicing (<i>exon inclusion</i>)	IT (injeção)	Fase I em progresso	NCT01780246
	MOE	SMN2	Modulação do splicing (<i>exon inclusion</i>)	IT (injeções)	Fase II em progresso	NCT01839656
	MOE	SMN2	Modulação do splicing (<i>exon inclusion</i>)	IT (injeção)	Fase I em progresso	NCT02052791
DMD	2'OMe	Exão 51	Modulação do splicing (<i>exon skipping</i>)	SC	Fase III completa	NCT01254019
	2'OMe	Exão 51	Modulação do splicing (<i>exon skipping</i>)	SC	Fase III em progresso	NCT01480245
	PMO	Exão 51	Modulação do splicing (<i>exon skipping</i>)	IV	Fase II completa	NCT01396239
	PMO	Exão 51	Modulação do splicing (<i>exon skipping</i>)	IV	Fase II em progresso	NCT01540409
	2'OMe	Exão 44	Modulação do splicing (<i>exon skipping</i>)	SC, IV	Fase I/II completa	NCT01037309
	2'OMe	Exão 53	Modulação do splicing (<i>exon skipping</i>)	SC, IV	Fase I/II em progresso	NCT01957059

5.3.2.1. Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA)

A fase I de um ensaio clínico (ver Tabela 4), com dupla ocultação, randomizado e controlado com placebo, com vista ao estudo de um ASO específico (ISIS-SOD1_{RX}), encontra-se concluída (n.º de identificação EC: NCT01041222). Os oligonucleótidos ISIS-SOD1_{RX} foram administrados, em quatro doses progressivamente mais altas, através de infusão IT, em doentes com ELA familiar, e os níveis de fármaco registados no LCR e no plasma foram consistentes com os estudos pré-clínicos e não foram relatados efeitos

adversos graves (MILLER et al., 2012). Embora a eficácia terapêutica do ISIS-SODI_{RX} no tratamento da ELA ainda não esteja avaliada, a segurança e a tolerabilidade já demonstradas, o conhecimento da dose e os estudos de farmacocinética são encorajadores (SOUTHWELL et al., 2012).

5.3.2.2. Atrofia Muscular Espinhal (AME)

A fase I de um ensaio clínico (ver Tabela 4), cujo objetivo era o estudo de um ASO específico (ISIS-SMN_{RX}), encontra-se atualmente completa (n.º de identificação EC: NCT01494701). O fármaco foi administrado, através de uma única injeção IT, em doentes com AME, com idades compreendidas entre os 2 e os 14 anos. Encontram-se em curso ensaios clínicos com a finalidade de estudar em maior detalhe o fármaco ISIS-SMN_{RX} em crianças com AME (n.º de identificação EC: NCT01703988, NCT01780246, NCT01839656 e NCT02052791).

5.3.2.3. Distrofia Muscular de Duchenne (DMD)

A DMD é uma doença neuromuscular hereditária recessiva associada ao cromossoma X e que tem uma incidência de 1 em cada 3500 recém-nascidos do sexo masculino (AARTSMA-RUS, VAN OMMEN, 2010). É causada por mutações no gene DMD, resultando na produção de distrofina não-funcional (HOFFMAN et al., 1987). A distrofina é uma proteína fundamental para a estabilidade da membrana das fibras musculares em atividade, sendo que a sua perda de funcionalidade leva a danos recorrentes nas fibras musculares em contração (AARTSMA-RUS, VAN OMMEN, 2010). Este processo é acompanhado pela perda progressiva da função muscular levando, na maioria dos casos, à dependência de cadeira de rodas e à morte prematura (EMERY, 2002). Os ASOs, através de um mecanismo de modulação do *splicing* (*exon skipping*), em que ocorre a eliminação de exões alvo no pré-mRNA proveniente do gene DMD, conduzem à recuperação da região mutada e à produção de distrofina parcialmente funcional (KOO, WOOD, 2013).

Têm sido realizados ensaios clínicos de fase I, fase II e, mais recentemente, de fase III (ver Tabela 4), utilizando, sobretudo, duas modalidades químicas de ASOs (2'OMe e PMO). Um ensaio clínico de fase III tendo como alvo o exão 51, com dupla ocultação, randomizado e controlado com placebo, com o objetivo de averiguar a segurança e a eficácia da modalidade química 2'OMe, encontra-se concluído (n.º de identificação EC: NCT01254019). O fármaco foi administrado a 180 doentes com DMD com mais de 5 anos de idade, por via SC, na dose de 6 mg/kg, durante 48 semanas. Este estudo está atualmente a ser prolongado para um ensaio clínico de fase III aberto (n.º de identificação EC: NCT01480245). Trata-se

do primeiro estudo com ASOs, em doentes com DMD, com a duração superior a dois anos e que irá permitir concluir acerca da segurança a longo prazo, tolerabilidade e eficácia (KOO, WOOD, 2013). Num outro ensaio clínico de fase II (n.º de identificação EC: NCT01396239), 12 doentes com DMD, entre os 5 e os 15 anos de idade, receberam, através de infusões IV, uma vez por semana durante 24 ou 48 semanas, doses de 30 ou 50 mg/kg da modalidade química PMO. Posteriormente, foram realizadas biópsias musculares nestes doentes, verificando-se um aumento de 47% em fibras de distrofina nos doentes que receberam infusões IV de 30 ou 50 mg/kg de PMO durante 48 semanas e um aumento até 38% em fibras de distrofina nos doentes que receberam tratamento com placebo durante 24 semanas, seguido de infusões IV de 30 ou 50 mg/kg de PMO durante 24 semanas. Estes doentes demonstraram ainda melhorias de locomoção após 48 semanas e não foram observados efeitos adversos graves. Este estudo está também a ser prolongado para um tratamento de 80 semanas (n.º de identificação EC: NCT01540409) (KOO, WOOD, 2013). A fim de direccionar ASOs para outros exões para além do exão 51, outros ensaios clínicos (p.ex., n.º de identificação EC: NCT01037309 e NCT01957059) estão a ser desenvolvidos (KOO, WOOD, 2013). Isto porque, aproximadamente, 6%, 8%, 4% ou 2% dos doentes com mutações no gene DMD poderão vir a ser tratados com ASOs utilizando o mecanismo de *exon skipping* dos exões 44, 45, 50 ou 53, respetivamente (AARTSMA-RUS et al., 2009).

6. PROPRIEDADE INTELECTUAL

Ao longo dos últimos anos, o interesse em redor dos ASOs tem vindo a aumentar. Foram desenvolvidos diversos estudos com ASOs por inúmeros investigadores com o objetivo criar novas abordagens terapêuticas que atuem na prevenção e no tratamento de diversas doenças, onde, devido à sua complexidade e falta de opções de tratamento, estão incluídas as doenças do SNC. No anexo I encontram-se mencionados o título, o número e a data da publicação, os inventores e o requerente de várias patentes que utilizam ASOs como estratégia para o tratamento das doenças neurológicas acima descritas.

7. MERCADO DOS ASOs

Conceber fármacos a partir de ASOs é um conceito apelativo e inovador mas que pode ser difícil de colocar em prática. Várias empresas farmacêuticas e de biotecnologia têm-se focado no estudo e desenvolvimento de estratégias terapêuticas baseadas em ASOs contribuindo, desta forma, para incrementar o mercado destas moléculas.

7.1. Estratégias das Principais Empresas

Na Tabela 5 encontram-se sistematizadas a tecnologia antisense, as parcerias estabelecidas e os fármacos em desenvolvimento (*pipeline*) de algumas empresas, cujo nome se distingue no mercado pelos seus avanços e conquistas na área da terapêutica antisense.

Tabela 5 – Principais empresas envolvidas no desenvolvimento de estratégias terapêuticas baseadas em ASOs.

Nome da empresa	Tecnologia Antisense	Parcerias	<i>Pipeline</i> - fármacos em desenvolvimento
Antisense Therapeutics	ASOs de 2ª geração	ISIS Pharmaceuticals	Anexo II
ISIS Pharmaceuticals	ASOs de 2ª geração (MOE)	Biogen Idec, Genzyme, Sanofi, GSK, AstraZeneca e Roche	Anexo III
Prosensa	ASOs de 2ª geração (2'OMe)	Universidades e organizações de doentes	Anexo IV
Sarepta Therapeutics	PMO	Indústria, universidades e organizações governamentais e não-governamentais	Anexo V
Santaris Pharma A/S	LNA	Bristol-Myers Squibb, GSK, Isarna, miRagen, Pfizer, RaNA, Roche e Shire	Anexo VI

A **Antisense Therapeutics** é uma empresa farmacêutica australiana cuja missão é criar, desenvolver e comercializar novas terapêuticas antisense (ANTISENSE THERAPEUTICS LIMITED, 2014a). As estratégias fundamentais desta empresa englobam: ter acesso à tecnologia antisense de excelência, de modo a acelerar a descoberta e o desenvolvimento de fármacos, e a parceria estabelecida com a ISIS Pharmaceuticals (ANTISENSE THERAPEUTICS LIMITED, 2014b). No Anexo II estão mencionados os fármacos em desenvolvimento pela empresa (ASOs de segunda geração), a via de administração, a sua indicação terapêutica e a fase de estudo em que se encontram.

A **ISIS Pharmaceuticals**, fundada em 1989 e com sede na Califórnia, é a empresa líder em tecnologia antisense, nomeadamente, a nível de ferramentas de pesquisa, desenvolvimento de novas modalidades químicas, novas formulações e medicamentos inovadores. Atualmente, esta empresa possui 28 fármacos em desenvolvimento para tratar uma ampla variedade de doenças, com destaque para as doenças graves e raras (p.ex., doenças do SNC), cardiovasculares, metabólicas e cancro (ANTISENSE THERAPEUTICS LIMITED, 2014b). No Anexo III estão mencionados os fármacos já aprovados e em desenvolvimento pela ISIS Pharmaceuticals, o alvo terapêutico, a parceria estabelecida e a fase de estudo em que se encontram.

Uma das principais estratégias da ISIS consiste em criar parcerias com empresas farmacêuticas especializadas na fase final de desenvolvimento de medicamentos, comercialização e marketing, como é o caso da Genzyme, que é responsável pela

comercialização do medicamento mais importante desenvolvido pela ISIS, o Kynamro[®] (mipomersen). Trata-se do primeiro medicamento antisense aprovado para administração sistêmica e que é utilizado no tratamento de doentes com hipercolesterolemia familiar homozigótica (ISIS PHARMACEUTICALS, INC., 2014c). O Vitravene[®] (fomivirsen), também desenvolvido pela ISIS, foi o primeiro medicamento antisense a ser comercializado (aprovado em 1998). Tinha como indicação terapêutica retinites provocadas pelo citomegalovírus em doentes com SIDA, uma das complicações desta doença. Contudo, o desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento destes doentes levou a um declínio na mortalidade e do aparecimento de infeções oportunistas, pelo que a Novartis deixou de comercializar o Vitravene[®] (revogado em 2002) (ISIS PHARMACEUTICALS, INC., 2014d).

A **Prosensa**, fundada em 2002 e localizada em Leiden (Holanda), é uma empresa de biotecnologia focada na descoberta, desenvolvimento e comercialização de terapêuticas baseadas na modulação do RNA (PROSENSA, 2014a). Tem como alvo doenças genéticas com falta de opções de tratamento, com destaque para as doenças neuromusculares e neurodegenerativas, principalmente, a DMD, a Distrofia Miotónica e a DH (PROSENSA, 2014a). Esta empresa tem parcerias estabelecidas com universidades (p.ex., Centro Médico da Universidade de Leiden) e organizações de doentes, com o objetivo de desenvolver, o mais rápido possível, terapêuticas inovadoras para estas doenças (PROSENSA, 2014b). No Anexo IV estão mencionados os fármacos em desenvolvimento pela Prosensa (ASOs com estruturas 2'OMe), a sua indicação terapêutica e a fase de estudo em que se encontram.

A **Sarepta Therapeutics**, antiga AVI BioPharma até Julho de 2012, é a empresa líder no desenvolvimento e produção de fármacos baseados em ASOs com estruturas PMO (SAREPTA THERAPEUTICS, 2014a). Fundada em 1980 e com sede em Cambridge, esta empresa está focada no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para doenças graves e raras (p.ex., DMD) e doenças infecciosas (SAREPTA THERAPEUTICS, 2014b). Além das parcerias estabelecidas com a indústria, apresenta também acordos com universidades, organizações governamentais e não-governamentais (SAREPTA THERAPEUTICS, 2014c). No Anexo V estão mencionados os fármacos em desenvolvimento pela Sarepta Therapeutics, a sua indicação terapêutica e a fase de estudo em que se encontram.

A **Santaris Pharma A/S**, fundada em 2003 e com sede em Copenhaga (Dinamarca), é uma empresa biofarmacêutica que resultou da fusão da Cureon A/S, filial da Exiqon, com a Panteco A/S. Apesar de a Exiqon manter os direitos sobre a tecnologia LNA, somente a Santaris Pharma A/S pode desenvolver e comercializar medicamentos com esta modalidade química (EXIQON, 2014). Esta empresa detém o direito exclusivo de todas as aplicações terapêuticas da tecnologia LNA, resultando numa propriedade intelectual de mais de 60

tipos de patentes (SANTARIS PHARMA A/S, 2014a). A tecnologia de que dispõe permite o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para uma variedade de doenças, incluindo doenças oncológicas, metabólicas e infecciosas (SANTARIS PHARMA A/S, 2014b). A Santaris Pharma A/S tem parcerias estabelecidas com vários líderes da indústria, o que permite acentuar o potencial da tecnologia LNA e desenvolver terapêuticas revolucionárias para várias doenças (SANTARIS PHARMA A/S, 2014c). A recente parceria estabelecida com a Shire irá permitir o desenvolvimento de fármacos com estrutura LNA com vista ao tratamento de doenças genéticas raras (SANTARIS PHARMA A/S, 2014d). No Anexo VI estão mencionados os fármacos em desenvolvimento pela Santaris Pharma S/A, o seu alvo e indicação terapêutica, e a fase de estudo em que se encontram.

8. CONCLUSÃO

A tecnologia antisense tem progredido de forma constante ao longo dos últimos anos. Embora nem sempre os resultados tenham sido os esperados e os objetivos cumpridos, todo o estudo que tem sido feito em redor desta tecnologia tem permitido identificar as suas falhas e tentar melhorá-las.

Os diferentes mecanismos de ação tornam possível a atuação dos ASOs em qualquer fase de maturação do mRNA, permitindo, não só o silenciamento do gene transcrito, mas também na alteração do processamento destas moléculas.

As modificações na estrutura química permitiram criar novas gerações de ASOs com maior capacidade de resistência às nucleases e melhor afinidade de ligação às moléculas alvo, aumentando, desta forma, o potencial terapêutico desta tecnologia. Além disso, os ASOs possuem a capacidade de, após uma injeção IT, se distribuírem livremente por todo o cérebro e medula espinal, reforçando, assim, a sua utilização como uma terapêutica viável para uma variedade de doenças do SNC.

As doenças do SNC são patologias graves e causadoras de enorme sofrimento, com elevada prevalência na nossa sociedade e sem cura. Para além dos fármacos que demonstraram ser pouco eficazes, há necessidade de procurar novas abordagens terapêuticas. A terapêutica com ASOs surge como uma possibilidade, tendo-se já resultados promissores na DH, DA, ELA, AME e DMD. Apesar de todos os avanços nesta tecnologia, estudos adicionais são necessários para uma melhor compreensão da eficácia, segurança e entrega dos ASOs no SNC, esperando-se que esta se torne numa arma poderosa no tratamento das doenças neurológicas.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARTSMA-RUS, A., FOKKEMA, I., VERSCHUUREN, J., GINJAAR, I., VAN DEUTEKOM, J., VAN OMMEN, G. J., DEN DUNNEN, J. T. – Theoretic applicability of antisense-mediated exon skipping for Duchenne muscular dystrophy mutations. *Hum. Mutat.* 30 (2009), 293–299.
- AARTSMA-RUS, A., VAN OMMEN, G. J. – Progress in therapeutic antisense applications for neuromuscular disorders. *Eur. J. Hum. Genet.* 18 (2010), 146–153.
- ANTISENSE THERAPEUTICS LIMITED (2014a) – **Home**. Toorak: Antisense Therapeutics, 2014. [Acedido a 18 de Abril de 2014]. Disponível na Internet: <http://www.antisense.com.au/>
- ANTISENSE THERAPEUTICS LIMITED (2014b) – **ISIS Partnership**. Toorak: Antisense Therapeutics, 2014. [Acedido a 18 de Abril de 2014]. Disponível na Internet: <http://www.antisense.com.au/company-information/isis-partnership/>
- ANTISENSE THERAPEUTICS LIMITED (2014c) – **Product Pipeline**. Toorak: Antisense Therapeutics, 2014. [Acedido a 18 de Abril de 2014]. Disponível na Internet: <http://www.antisense.com.au/product-pipeline/at1103-for-growth-sight-disorders/>
- BENNET, C. F., SWAYZE, E. E. – RNA Targeting Therapeutics: Molecular Mechanism of Antisense Oligonucleotides as a Therapeutic Platform. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 50 (2010), 259–293.
- CARROLL, J. B., WARBY, S. C., SOUTHWELL, A. L., DOTY, C. N., GREENLEE, S., SKOTTE, N., HUNG, G., BENNETT, C. F., FREIER, S. M., HAYDEN, M. R. – Potent and selective antisense oligonucleotides targeting single-nucleotide polymorphisms in the Huntington disease gene/allele-specific silencing of mutant huntingtin. *Mol. Ther.* 19 (2011), 2178–2185.
- CERRITELLI, S. M., CROUCH, R. J. – Ribonuclease H: the Enzymes in Eukaryotes. *FEBS J.* 276 (2009), 1494–1505.
- CHAUHAN, N. B., SIEGEL, G. J. – Antisense inhibition at the bsecretase- site of b-amyloid precursor protein reduces cerebral amyloid and acetyl cholinesterase activity in Tg2576. *Neuroscience.* 146 (2007), 143–151.
- DEVOS, S. L., MILLER, T.M. – Antisense Oligonucleotides: Treating Neurodegeneration at the Level of RNA. *Neurotherapeutics.* 10 (2013), 486–497.
- EMERY, A. E. – The muscular dystrophies. *Lancet.* 359 (2002), 687–695.
- EXIQON (2014) – **About Exiqon: History and Development**. Vedbaek: Exiqon, 2014. [Acedido a 18 de Abril de 2014]. Disponível na Internet: <http://www.exiqon.com/history>
- FINDER, V. H. – Alzheimer’s disease: a general introduction and pathomechanism. *J. Alzheimer’s Dis.* 22 (2011), 5–19.
- FORTE, A., CIPOLLARO, M., CASCINO, A., GALDERISI, U. – Small Interfering RNAs and Antisense Oligonucleotides for Treatment of Neurological Diseases. *Curr. Drug Targets.* 6 (2005), 21–29.
- FREIER, S. M., ALTMANN, K. H. – The ups and downs of nucleic acid duplex stability: structure-stability studies on chemically-modified DNA:RNA duplexes. *Nucleic Acids Res.* 25 (1997), 4429–4443.
- GRYAZNOV, S. M., LLOYD, D. H., CHEN, J. K., SCHULTZ, R. G., DEDIONISIO, L. A., RATMEYER, L., WILSON, W. D. – Oligonucleotide N3’ → P5’ Phosphoramidates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92 (1995), 5798–5802.
- HARDIMAN, O., VAN DEN BERG, L. H., KIERNAN, M. C. – Clinical diagnosis and management of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Rev. Neurol.* 7 (2011), 639–649.
- HOFFMAN, E. P., BROWN, R. H. Jr., KUNKEL, L. M. – Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell.* 51(1987), 919–928.
- HUA, Y., SAHASHI, K., HUNG, G., RIGO, F., PASSINI, M. A., BENNETT, C. F., KRAINER, A. R. – Antisense correction of SMN2 splicing in the CNS rescues necrosis in a type III SMA mouse model. *Genes Dev.* 24 (2010), 1634–1644.
- IANNACCONE, S. T. – Spinal muscular atrophy. *Semin. Neurol.* 18 (1998), 19–26.
- INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES, INC. – **Antisense Technologies**. Coralville: IDT, 2011. [Acedido a 18 de Janeiro de 2014]. Disponível na Internet: <http://eu.idtdna.com/Pages/docs/educational-resources/antisense-technologies.pdf?sfvrsn=6>
- ISIS PHARMACEUTICALS, INC. (2014a) – **Antisense Approaches - Mechanisms and Targets**. Carlsbad: ISIS Pharmaceuticals, 2014. [Acedido a 1 de Fevereiro de 2014]. Disponível na Internet: <http://www.isispharm.com/Antisense-Technology/Antisense-Drug-Discovery-Platform/Antisense-Approaches.htm>
- ISIS PHARMACEUTICALS, INC. (2014b) – **Our Chemistry Advancements**. Carlsbad: ISIS Pharmaceuticals, 2014. [Acedido a 1 de Fevereiro de 2014]. Disponível na Internet: <http://isispharm.com/backup/Antisense-Technology/Antisense-Drug-Discovery-Platform/Medicinal-Chemistry.htm>
- ISIS PHARMACEUTICALS, INC. (2014c) – **About ISIS**. Carlsbad: ISIS Pharmaceuticals, 2014. [Acedido a 18 de Abril de 2014]. Disponível na Internet: <http://isispharm.com/About-Isis/index.htm>
- ISIS PHARMACEUTICALS, INC. (2014d) – **Other**. Carlsbad: ISIS Pharmaceuticals, 2014. [Acedido a 18 de Abril de 2014]. Disponível na Internet: <http://www.isispharm.com/Pipeline/Therapeutic-Areas/Other.htm>
- ISIS PHARMACEUTICALS, INC. (2014e) – **Drugs in Development: Pipeline**. Carlsbad: ISIS Pharmaceuticals, 2014. [Acedido a 18 de Abril de 2014]. Disponível na Internet: <http://isispharm.com/Pipeline/index.htm>
- KOLE, R., KRAINER, A. R., ALTMAN, S. – RNA Therapeutics: Beyond RNA Interference and Antisense Oligonucleotides. *Nat. Rev. Drug Discov.* 11 (2012), 125–140.
- KOO, T., WOOD, M. J. – Clinical Trials Using Antisense Oligonucleotides in Duchenne Muscular Dystrophy. *Hum. Gene Ther.* 24 (2013), 479–488.
- KORDASIEWICZ, H. B., STANEK, L. M., WANCEWICZ, E. V., MAZUR, C., MCALONIS, M. M., PYTEL, K. A., ARTATES, J. W., WEISS, A., CHENG, S. H., SHIHABUDDIN, L. S., HUNG, G., BENNETT, C. F., CLEVELAND, D. W. – Sustained therapeutic reversal of Huntington’s disease by transient repression of huntingtin synthesis. *Neuron.* 74 (2012), 1031–1044.
- KURRECK, J., WYSZKO, E., GILLEN, C., ERDMANN, V.A. – Design of antisense oligonucleotides stabilized by locked nucleic acids. *Nucleic Acids Res.* 30 (2002), 1911–1918.
- KUZMA-KOZAKIEWICZ, M., KWIECINSKI, H. – New therapeutic targets for amyotrophic lateral sclerosis. *Exp. Opin. Ther. Targets.* 15 (2011), 127–143.
- LORSON, C. L., HAHNEN, E., ANDROPHY, E. J., WIRTH B. – A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (1999), 6307–6311.
- MILLER, T. M., SMITH, R., PESTRONK, A., DAVID, W., ROTHSTEIN, J., SIMPSON, E., ANDRES, P., MAHONEY, K., ALLRED, P., ALEXANDER, K., BISHOP, K., SCHOENFELD, D., MACKLIN, E., NORRIS, D., BENNETT, C., CUDKOWICZ M. – Results of a

Oligonucleótidos Antisense no Tratamento de Doenças do SNC

- Phase I, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of the safety, tolerability, and pharmacokinetics of ISIS 33361 I administered intrathecally to patients with familial ALS due to SOD1 gene mutations. *Neurology (Meeting Abstracts 1)*. 78 (2012), S25.001.
- MILLS, J. D., JANITZ, M. – Alternative splicing of mRNA in the molecular pathology of neurodegenerative diseases. *Neurobiol. Aging*. 33 (2012), 1012.e11-1012.e24.
 - NIELSEN, P. E., EGHOLM, M., BERG, R. H., BUCHARDT, O. – Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science*. 254 (1991), 1497–1500.
 - PASSINI, M. A., BU J., RICHARDS, A. M., KINNECOM, C., SARDI, S. P., STANEK, L. M., HUA, Y., RIGO, F., MATSON, J., HUNG, G., KAYE, E. M., SHIHABUDDIN, L. S., KRAINER, A. R., BENNETT, C. F., CHENG, S. H. – Antisense oligonucleotides delivered to the mouse CNS ameliorate symptoms of severe spinal muscular atrophy. *Sci. Trans. Med.* 3 (2011), 72ra18.
 - PONGRACZ, K., GRYAZNOV, S. – Oligonucleotide N3'/P5' Thiophosphoramidates: Synthesis and Properties. *Tetrahedron Lett.* 40 (1999), 7661-7664.
 - PORENSKY, P. N., MITRPANT, C., MCGOVERN, V. L., BEVAN, A. K., FOUST, K. D., KASPAR, B. K., WILTON, S. D., BURGHESE, A. H. – A single administration of morpholino antisense oligomer rescues spinal muscular atrophy in the mouse. *Hum. Mol. Genet.* 21 (2012), 1625–1638.
 - PROSENSA (2014a) – **Company Profile**. Leiden: Prosensa, 2014. [Acedido a 18 de Abril de 2014]. Disponível na Internet: <http://www.prosensa.eu/about-prosensa/company-profile>
 - PROSENSA (2014b) – **Partners**. Leiden: Prosensa, 2014. [Acedido a 18 de Abril de 2014]. Disponível na Internet: <http://www.prosensa.eu/about-prosensa/partners>
 - PROSENSA (2014c) – **Pipeline**. Leiden: Prosensa, 2014. [Acedido a 18 de Abril de 2014]. Disponível na Internet: <http://www.prosensa.eu/technology-and-products/pipeline>
 - ROSS, C. A., TABRIZI, S. J. – Huntington's disease: from molecular pathogenesis to clinical treatment. *Lancet Neurol.* 10 (2011), 83–98.
 - SAH, D. W., ARONIN, N. – Oligonucleotide therapeutic approaches for Huntington disease. *J. Clin. Invest.* 121 (2011), 500-507.
 - SANTARIS PHARMA A/S (2014a) – **Science: Intellectual Property**. Copenhaga: Santaris Pharma, 2014. [Acedido a 18 de Abril de 2014]. Disponível na Internet: <http://www.santaris.com/science/intellectual-property>
 - SANTARIS PHARMA A/S (2014b) – **Product Pipeline**. Copenhaga: Santaris Pharma, 2014. [Acedido a 18 de Abril de 2014]. Disponível na Internet: <http://www.santaris.com/product-pipeline>
 - SANTARIS PHARMA A/S (2014c) – **Partners and Collaborators**. Copenhaga: Santaris Pharma, 2014. [Acedido a 18 de Abril de 2014]. Disponível na Internet: <http://www.santaris.com/partners/partners-collaborators>
 - SANTARIS PHARMA A/S (2014d) – **Newsroom: News Releases**. Copenhaga: Santaris Pharma, 2014. [Acedido a 18 de Abril de 2014]. Disponível na Internet: <http://www.santaris.com/news/2013/08/23/shire-and-santaris-extend-their-strategic-alliance-discover-and-develop-lna-drugs-ra>
 - SAREPTA THERAPEUTICS (2014a) – **Our Technology: Manufacturing Excellence**. Cambridge: Sarepta Therapeutics, 2014. [Acedido a 18 de Abril de 2014]. Disponível na Internet: <http://www.sarepta.com/technology/manufacturing-excellence>
 - SAREPTA THERAPEUTICS (2014b) – **For Investors: Frequently Asked Questions**. Cambridge: Sarepta Therapeutics, 2014. [Acedido a 18 de Abril de 2014]. Disponível na Internet: <http://investorrelations.sarepta.com/phoenix.zhtml?c=64231&p=irol-faq>
 - SAREPTA THERAPEUTICS (2014c) – **Our Technology: Strategic Partnerships**. Cambridge: Sarepta Therapeutics, 2014. [Acedido a 18 de Abril de 2014]. Disponível na Internet: <http://www.sarepta.com/technology/strategic-partnerships>
 - SAREPTA THERAPEUTICS (2014d) – **Our Pipeline**. Cambridge: Sarepta Therapeutics, 2014. [Acedido a 18 de Abril de 2014]. Disponível na Internet: <http://www.sarepta.com/our-pipeline>
 - SHARP, P. A. – The centrality of RNA. *Cell*. 136 (2009), 577-580.
 - SMITH, R. A., MILLER, T. M., YAMANAKA, K., MONIA, B. P., CONDON, T. P., HUNG, G., LOBSIGER, C. S., WARD, C. M., MCALONIS-DOWNES, M., WEI, H., WANCEWICZ, E. V., BENNETT, C. F., CLEVELAND, D. W. – Antisense oligonucleotide therapy for neurodegenerative disease. *J. Clin. Invest.* 116 (2006), 2290–2296.
 - SOUTHWELL, A. L., SKOTTE, N. H., BENNETT, C. F., HAYDEN, M. R. – Antisense Oligonucleotide Therapeutics for Inherited Neurodegenerative Diseases. *Trends Mol. Med.* 18, 11 (2012), 634-643.
 - STEIN, C. A., SUBASINGHE, C., SHINOZUKA, K., COHEN, J. S. – Physicochemical Properties of Phosphorothioate Oligodeoxynucleotides. *Nucleic Acids Res.* 16 (1988), 3209–3221.
 - SUMMERTON, J. – Morpholino Antisense Oligomers: the case for an RNase H-independent structural type. *Biochim. Biophys. Acta*. 1489 (1999), 141-158.
 - SWAYZE, E. E., SIWKOWSKI, A. M., WANCEWICZ, E. V., MIGAWA, M. T., WYRZYKIEWICZ, T. K., HUNG, G., MONIA, B. P., BENNETT, C. F. – Antisense oligonucleotides containing locked nucleic acid (LNA) improve potency but cause significant hepatotoxicity in animals. *Nucleic Acids Res.* 35 (2007), 687–700.
 - TEPLOVA, M., MINASOV, G., TERESHKO, V., INAMATI, G. B., COOK, P. D., MANOHARAN, M., EGLI, M. – Crystal structure and improved antisense properties of 2'-O-(2-methoxyethyl)-RNA. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 6 (1999), 535–539.
 - WARBY, S. C., MONTPETIT, A., HAYDEN, A. R., CARROLL, J. B., BUTLAND, S. L., VISSCHER, H., COLLINS, J. A., SEMAKA, A., HUDSON, T. J., HAYDEN, M. R. – CAG expansion in the Huntington disease gene is associated with a specific and targetable predisposing haplo group. *Am. J. Hum. Genet.* 84 (2009), 351-366.
 - WU, H., LIMA, W. F., ZHANG, H., FAN, A., SUN, H., CROOKE, S. T. – Determination of the Role of the Human RNase HI in the Pharmacology of DNA-like Antisense Drugs. *J. Biol. Chem.* 279 (2004), 17181-17189.
 - ZAMECNIK, P. C., STEPHENSON, M. L. – Inhibition of Rous Sarcoma Virus Replication and Cell Transformation by a Specific Oligodeoxynucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 75 (1978), 280-284.
 - ZHOU, J., ZHENG, X., SHEN, H. – Targeting RNA-splicing for SMA treatment. *Mol. Cells*. 33 (2012), 223–228.
 - ZUCCATO, C., VALENZA, M., CATTANEO, E. – Molecular mechanisms and potential therapeutic targets in Huntington's disease. *Physiol. Rev.* 90 (2010), 905–981.

10. ANEXOS

ANEXO I

Patentes que utilizam ASOs como estratégia para o tratamento de diversas doenças do SNC. (Fonte: <http://www.epo.org/searching/free/espacenet.html>)

Doença	Título	Número da publicação	Data da publicação	Inventores	Requerente
DH	“Oligonucleotides for Treating Expanded Repeat Diseases”	WO2013082548 (A1)	06-06-2013	Peter Linsley, Brian James Leppert, Gunnar J. Hanson	Sarepta Therapeutics, Inc.
DA	“Compositions and methods for modulating TAU expression for reducing seizure and modifying a neurodegenerative syndrome”	AU2013203395 (A1)	17-10-2013	C. Frank Bennett, Frank Rigo, Susan M. Freier	ISIS Pharmaceuticals, Inc.
	“Treatment of Neurodegenerative Diseases by Targeting a miRNA”	KR20120088009 (A)	08-08-2012	Jae Kyu Roh, Sang Kun Lee, Man Ho Kim, Kon Chu, Keun Hwa Jung, Soon Tae Lee	Snu R&Db Foundation
	“Antisense Oligonucleotides Against Neutral Sphingomyelinase and Neutral Sphingomyelinase Inhibitor GW4869 for Degenerative Neurological Disorders”	WO2012162211 (A3); WO2012162211 (A2)	29-11-2012	Kalipada Pahan	Univ Rush Medical Center; Kalipada Pahan
	“Transgenic Animals and Cell Lines for Screening Drugs Effective for the Treatment or Prevention of Alzheimer's Disease”	US2003066097 (A1); US7291454 (B2)	03-04-2003	Suzanne De La Monte, Jack R. Wands	Suzanne De La Monte, Jack R. Wands, The General Hospital Corporation
	“Aspartyl Protease 2 (Asp2) Antisense Oligonucleotides”	US6500667 (B1)	31-12-2002	Mark E.Gurney, Michael J. Bienkowski, Robert L. Heinrichson, Luis A. Parodi, Riqiang Yan	Up John CO
	“Reversal of Beta /A4 Amyloid Peptide Induced Morphological Changes in Neuronal Cells by Antisense Oligonucleotides”	US5670634 (A)	23-09-1997	Charles A. Marotta, Ronald E. Majocho, Sudhir Agrawal	Gen Hospital Corp

Oligonucleótidos Antisense no Tratamento de Doenças do SNC

	“Compositions and Methods for Inhibiting Cox-2 Expression and Treating Cox-2 Associated Disorders by Using Cox-2 Antisense Oligonucleotides”	US6344323 (B1)	05-02-2002	Wilfried Seifert	Vitagenix, Inc
	“Alpha-2-Macroglobulin Therapies and Drug Screening Methods for Alzheimer's Disease”	US6472140 (B1)	29-10-2002	Rudolph E. Tanzi, Dora Kovacs, Aleister J. Saunders	Gen Hospital Corp
	“Antisense Modulation of Beta-Site APP-Cleaving Enzyme 2 Expression”	US2004132681 (A1)	08-07-2004	Kenneth W. Dobie	Kenneth W. Dobie
	“Antisense Modulation of Beta-Site APP-Cleaving Enzyme Expression”	US2003224512 (A1)	04-12-2003	Kenneth W. Dobie	ISIS Pharmaceuticals, Inc.
DA ELA	“Preventives or Remedies for Endoplasmic Reticulum Stress-Associated Diseases”	WO0238179 (A1)	16-05-2002	Hidenori Ichijyo, Atsushi Matsuzawa	Kissei Pharmaceutical, Hidenori Ichijyo, Atsushi Matsuzawa
	“Methods for Slowing Familial ALS Disease Progression”	US2012214865 (A1)	23-08-2012	C. Frank Bennett, Susan M. Freier, Kenneth W. Dobie	C. Frank Bennett, Susan M. Freier, Kenneth W. Dobie, ISIS Pharmaceuticals, Inc.
ELA	“Antisense Modulation of Superoxide Dismutase 1, Soluble (SOD-1) Expression”	WO2005040180 (A2); WO2005040180 (A3)	06-05-2005	Frank C. Bennett, Kenneth W. Dobie, Don W. Cleveland, Richard Alan Smith, Thomas P. Condon, Ravi Jain, Susan M. Freier	ISIS Pharmaceuticals, Inc., Ludwig Inst Cancer Res, CT for Neurologic Study, Frank C. Bennett, Kenneth W. Dobie, Don W. Cleveland, Richard Alan Smith, Thomas P. Condon, Ravi Jain, Susan M. Freier
AME	“Antisense Oligonucleotides for Modulating Survival Motor Neuron 2 (SMN2) Splicing”	SGI89598 (A1)	31-05-2013	Woon Chee Yee, Pramano Serengat Dwi, Peng Wen Pao	Singapore Health Serv PTE LTD
AME DMD	“Tricyclo-DNA Antisense Oligonucleotides, Compositions, and Methods for the Treatment of Disease”	CN102625840 (A)	01-08-2012	Daniel Schuemperli, Christian Leumann, Denis Furling, Luis Garcia, Thomas Voit	Ass Inst De Myologie, Univ Paris Curie, Univ Bern, Centre Nat Rech Scient

Oligonucleótidos Antisense no Tratamento de Doenças do SNC

DMD	“ENA Nucleic Acid Pharmaceutical Modifying Splicing in mRNA Precursor”	JP2012135314 (A)	19-07-2012	-----	Masafumi Matsuo, Yasuhiro Takeshima, NPO Translational Res Organization of DMD, Kobe Tennenbutsu Kagaku KK
	“Antisense Oligonucleotides”	MX2013009191 (A)	04-11-2013	Qi Long Lu	Charlotte Mecklenburg Hospital
	“Treatment of Dystrophin Family Related Diseases by Inhibition of Natural Antisense Transcript to DMD Family”	CN102459597 (A)	16-05-2012	Joseph Collard, Olga Sherman Khorkova	Curna, Inc
	“Antisense Oligonucleotides Capable of Inducing Exon Skipping and the Use Thereof as a Medicament for the Treatment of Duchenne Muscular Dystrophy (DMD)”	WO2010150231 (A1)	29-12-2010	Alessandra Ferlini, Alessandro Medici, Daniela Perrone, Paola Rimessi, Pietro Spitali	Univ Ferrara, Alessandra Ferlini, Alessandro Medici, Daniela Perrone, Paola Rimessi, Pietro Spitali
	“Antisense Oligonucleotides for Inducing Exon Skipping and Methods of Use Thereof”	US2014080898 (A1)	20-03-2014	Stephen Donald Wilton, Sue Fletcher, Graham Mcclurey	Univ Western Australia
	“Exon Skipping Therapy for Functional Amelioration of Semifunctional Dystrophin in Becker and Duchenne Muscular Dystrophy”	US 2012172415 (A1)	05-07-2012	Thomas Voit, Luis Garcia, Valerie Robin, Patrick Dreyfus	Thomas Voit, Luis Garcia, Valerie Robin, Patrick Dreyfus
	“Nanoparticle of the Core-Shell Type Suitable for Delivering Therapeutic Oligonucleotides to Target Tissues and the Use Thereof for the Preparation of a Medicament for Treating Duchenne Muscular Dystrophy”	WO2011045747 (A1)	21-04-2011	Alessandra Ferlini, Alessandro Medici, Daniela Perrone, Paola Rimessi, Luisa Tondelli, Michele Laus, Katia Sparnacci	Univ Ferrara, Alessandra Ferlini, Alessandro Medici, Daniela Perrone, Paola Rimessi, Luisa Tondelli, Michele Laus, Katia Sparnacci
	“Medicament for Treatment of Duchenne Muscular Dystrophy”	US6653467 (B1)	25-11-2003	Masafumi Matsuo, Yasuhiro Takeshima	JCR Pharmaceutical CO LTD, Masafumi Matsuo,

ANEXO II

Fármacos em desenvolvimento pela Antisense Therapeutics, em parceria com a ISIS Pharmaceuticals. Adaptado de ANTISENSE THERAPEUTICS LIMITED, 2014c.

PRODUTO	INDICAÇÃO	PESQUISA	ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS	FASE I	FASE II	FASE III
ATL1103 SC (injeção)	Acromegalia	[Progressão de pesquisa representada por uma barra azul que cobre as colunas Pesquisa, Estudos Pré-clínicos e Fase I]				
ATL1102 SC (injeção)	Esclerose Múltipla	[Progressão de pesquisa representada por uma barra azul que cobre as colunas Pesquisa, Estudos Pré-clínicos e parte da Fase I]				
ATL1102 SC (injeção)	Mobilização de células estaminais para transplante	[Progressão de pesquisa representada por uma barra azul que cobre as colunas Pesquisa e Estudos Pré-clínicos]				
ATL1101 SC (injeção)	Câncer da Próstata	[Progressão de pesquisa representada por uma barra azul que cobre as colunas Pesquisa e Estudos Pré-clínicos]				
ATL1102 Inalação	Asma	[Progressão de pesquisa representada por uma barra azul que cobre a coluna Pesquisa]				

ANEXO III

Fármacos já aprovados e em desenvolvimento pela Isis Pharmaceuticals. Adaptado de ISIS PHARMACEUTICALS, INC., 2014e.

Fármaco	Alvo	Parceria	Estudos pré-clínicos	Fase I	Fase II	Fase III	Aprovado
Graves e Raras							
KYNAMRO®	ApoB-100	Genzyme					
Alicaforfen	ICAM-1	Atlantic					
ISIS-TTR _{Rx}	TTR	GSK					
ISIS-SMN _{Rx}	SMN2	Biogen Idec					
ISIS-APOCIII _{Rx}	ApoCIII	-					
ATL1103	GHR	ATL					
ISIS-GCCR _{Rx}	GCCR	-					
ISIS-PKK _{Rx}	PKK	-					
ISIS-DMPK _{Rx}	DMPK	Biogen Idec					
ISIS-HTT _{Rx}	HTT	Roche					
RG-012	miR-21	Regulus					
Cardiovasculares							
KYNAMRO®	ApoB-100	Genzyme					
ISIS-APOCIII _{Rx}	ApoC-III	-					
ISIS-FXI _{Rx}	Factor XI	-					
ISIS-CRP _{Rx}	CRP	-					
ISIS-APO(a) _{Rx}	Apo(a)	-					
ISIS-ANGPTL3 _{Rx}	ANGPTL3	-					
ISIS-FVII _{Rx}	Factor VII	-					
Metabólicas							
ISIS-GCGR _{Rx}	GCGR	-					
ISIS-GCCR _{Rx}	GCCR	-					
ISIS-PTP1B _{Rx}	PTP-1B	-					
ISIS-FGFR4 _{Rx}	FGFR4	-					
ISIS-DGAT2 _{Rx}	DGAT2	-					

Oligonucleótidos Antisense no Tratamento de Doenças do SNC

Cancro			
Custirsen	clusterin	Teva/OncoGenex	
ISIS-EIF4E _{Rx}	eIF-4E	-	
Apatorsen	Hsp27	OncoGenex	
ISIS-STAT3 _{Rx}	STAT3	AstraZeneca	
ISIS-AR _{Rx}	AR	AstraZeneca	
Inflamatórias e Outras			
Plazomicin	Aminoglycoside	Achaogen	
EXC 001	CTGF	Pfizer	
iCo-007	C-raf kinase	iCo	
ATL1102	VLA-4	ATL	
ISIS-HBV _{Rx}	HBV	GSK	
RG-101	miR-122	Regulus	
ISIS-GSK4 _{Rx}	Undisclosed	GSK	

ANEXO IV

Fármacos em desenvolvimento pela Prosensa. Adaptado de PROSENSA, 2014c.

Indicação	Produto	Pesquisa	Estudos Pré-Clínicos	Fase I/II	Fase III
Distrofia Muscular de Duchenne (DMD)	Drisapersen	13% de doentes DMD			
	PRO044	6% de doentes DMD			
	PRO045	8% de doentes DMD			
	PRO053	8% de doentes DMD			
	PRO052	4% de doentes DMD			
	PRO055	2% de doentes DMD			
	PROSPECT				
Distrofia Miotónica (DMI)	PRO135				
Doença de Huntington (DH)	PRO289				

ANEXO V

Fármacos em desenvolvimento pela Sarepta Therapeutics. Adaptado de SAREPTA THERAPEUTICS, 2014d.



ANEXO VI

Fármacos em desenvolvimento pela Santaris Pharma A/S. Adaptado de SANTARIS PHARMA A/S, 2014b.

