

(11) Número de Publicação: **PT 109454 A**

(51) Classificação Internacional:
A61K 31/7105 (2006.01) **A61K 31/7052**
(2006.01)
C07H 21/00 (2006.01)

(12) **PEDIDO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 2016.06.14	(73) Titular(es): PHYZAT BIOPHARMACEUTICALS, LDA RUA DAMIÃO DE GÓIS, 389-A, 1º BB 4050-227 PORTO PT
(30) Prioridade(s):	
(43) Data de publicação do pedido: 2017.12.14	
(45) Data e BPI da concessão: /	(72) Inventor(es): PATRICIO SOARES DA SILVA PT
	(74) Mandatário: MARIA TERESA DELGADO AVENIDA DA LIBERDADE, Nº 69, 3º D 1250-140 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **ÁCIDOS NUCLEICOS DE INTERFERÊNCIA E COMPOSIÇÕES QUE OS COMPREENDEM**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO É DIRIGIDA A DÚPLEXES DE ARN DE INTERFERÊNCIA PARA MEDIAR O SILENCIAMENTO DE GENES. A PRESENTE INVENÇÃO TAMBÉM É DIRIGIDA A VETORES CODIFICANDO TAIS DÚPLEXES DE ARN DE INTERFERÊNCIA.

RESUMO**"ÁCIDOS NUCLEICOS DE INTERFERÊNCIA E COMPOSIÇÕES QUE OS
COMPREENDEM"**

A presente invenção é dirigida a dúplexes de ARN de interferência para mediar o silenciamento de genes. A presente invenção também é dirigida a vetores codificando tais dúplexes de ARN de interferência.

DESCRIÇÃO

"ÁCIDOS NUCLEICOS DE INTERFERÊNCIA E COMPOSIÇÕES QUE OS COMPREENDEM"

Campo da Invenção

A presente invenção é dirigida dúplexes de ARN de interferência para mediar o silenciamento de genes. A presente invenção também é dirigida a vetores codificando tais dúplexes de ARN de interferência.

Descrição da Técnica Relacionada

Independentemente da sua origem, os tumores requerem um subministro constante de nutrientes para suportar o seu crescimento ininterrupto característico. De facto, as células tumorais podem consumir mais nutrientes do que os requeridos para as suas próprias necessidades metabólicas (Medina et al., 1992b), e exibem perfis metabólicos diferentes em comparação com os seus homólogos celulares normais. Os tumores são subministrados com nutrientes para abastecer as suas necessidades metabólicas através dos processos coletivos de angiogénese e da expressão prodigiosa de transportadores de nutrientes nas membranas plasmáticas de células constituintes. Os aminoácidos são a fonte primária de azoto celular, utilizados para nucleótidos, glutathiona, açúcares amino e síntese proteica. O metabolismo voraz e aparentemente desperdiçador dos aminoácidos de tumores malignos leva a, entre outras coisas, equilíbrio de azoto negativo no hospedeiro com cancro. Além disso, os esqueletos de carbono dos aminoácidos são frequentemente utilizados como uma fonte de combustível oxidativo para a geração de ATP para além da glucose e ácidos gordos, e podem também contribuir para a biossíntese de esterol e lípidos (Baggetto, 1992; Medina et al., 1992a). Em comparação com células ou tecidos normais, as células cancerígenas exibem canalização potenciada e alterada de aminoácidos em vias metabólicas seleccionadas, frequentemente em conjunto com a

característica de glicólise aeróbia dos tumores (Baggetto, 1992) e (Mazurek *et al.*, 2003). Os tumores sólidos têm frequentemente vascularização pobre, especialmente na fase avascular nascente característica da neoplasia e metástases, de tal forma que devem ter mecanismos eficazes para extrair aminoácidos do plasma de modo a competir com os tecidos do hospedeiro (Medina *et al.*, 1992b). O cancro, por sua vez, é um microcosmo de evolução, com as células "mais adequadas" resistindo através da adaptação ao microambiente local, como um resultado, são selecionados e expressos transportadores de aminoácidos com propriedades que atribuem vantagens de crescimento e sobrevivência, frequentemente a níveis aumentados em comparação com o tecido parental.

Anteriormente ao advento da clonagem e isolamento de transportadores de aminoácidos de mamíferos, Christensen propôs que os transportadores de aminoácidos específicas poderiam ser regulados positivamente em células transformadas para suportar os níveis elevados de síntese proteica necessária para o crescimento e proliferação (Christensen, 1990). Uma pesquisa da base de dados da sequência tag humana expressa (EST) na página web do Cancer Genome Anatomy Project (CGAP) (<http://cgap.nci.nih.gov>), utilizando a ferramenta "cDNA Virtual northern" para determinar os níveis de expressão dos "sistemas" de transporte de aminoácidos neutros clássicos A, ASC, L e N, em tecidos normais e cancerosos revelou que enquanto cinco transportadores são significativamente potenciados globalmente em tecidos cancerosos, são destacados dois - LAT1 (transportador de aminoácidos neutros grande) e ASCT2 (transportador de aminoácidos ASC 2) (Fuchs *et al.*, 2005). ASCT2 e LAT1 são ambos regulados positivamente três vezes (coletivamente) numa variedade de tecidos cancerosos onde o seu padrão de expressão é quase idêntico (Fuchs *et al.*, 2005).

LAT1 tem sido associado com células cancerosas ou proliferativas. Quando LAT1 de comprimento completo foi inicialmente isolado e caracterizado em 1998, foi mostrado como

não sendo expresso em fígado de rato mas foi detectado em linhas celulares de hepatoma (dRLh-84) e hepatocarcinoma (FAA-HTC1) de rato (Kanai *et al.*, 1998), o que é consistente com o padrão de expressão de ASCT2 no fígado humano conforme discutido abaixo. Análise de *Northern blot* com linhas celulares humanas revelou a expressão de TAL na linha celular de coriocarcinoma JEG-3 e linha celular de carcinoma da mama MDA-A1 (Sang *et al.*, 1995), bem como na linha celular de carcinoma de células do anel de sinete do estômago (KATOIII), carcinoma pulmonar de células pequenas (RERF-LC- MA) e melanoma maligno (G-361) (Kanai *et al.*, 1998). Tanto 4F2hc como LAT1 foram detectados em várias linhas celulares de leucemia, células de carcinoma pulmonar de células pequenas RERF-LC- MA, células de carcinoma do útero HeLa e células de carcinoma da bexiga T-24 (Yanagida *et al.*, 2001). Os resultados com as células T-24 foram confirmados através de microscopia de imunofluorescência confocal, que revelou colocalização de LAT1 e 4F2h na membrana plasmática (Kim *et al.*, 2002). LAT1 e 4F2hc também foram mostrados como estando colocalizados na membrana plasmática de células de carcinoma epidermoide oral humano KB (Yoon *et al.*, 2005), e podem ser importantes para a carcinogênese epitelial escamosa oral, dado que a coloração imunohistoquímica mostrou que a sua expressão aumenta durante a progressão de mucosa escamosa normal para carcinoma de células escamosas orais (Kim *et al.*, 2004b).

Kühne *et al.*, (Kuhne *et al.*, 2007) divulgam polimorfismos genéticos dos genes LAT1 e LAT2 e relacionam tais polimorfismos com a farmacocinética de melfalan. Shennan *et al.*, (Shennan *et al.*, 2008) divulgam que a inibição de LAT1 reduz o crescimento de células de cancro da mama humano. Nawashiro *et al.*, (Nawashiro *et al.*, 2006) divulgam que LAT1 é um alvo molecular potencial em tumores astrocíticos humanos. Yamauchi *et al.*, (Yamauchi *et al.*, 2009) e Kim *et al.*, (Kim *et al.*, 2008) divulgam a utilização de inibidores de LAT1 para bloquear a atividade tumoral de várias células cancerígenas. No contexto do

requerimento da chaperona 4F2hc para o desencadeamento da atividade de LAT1, RT-PCR quantitativa a tempo real revelou níveis semelhantes de ARNm de LAT1 e 4F2hc em células KB (Yoon *et al.*, 2005). Isto entra em conflito com os dados a partir de células T-24 onde os níveis de LAT1 foram ~1,5 vezes mais elevados do que 4F2hc (Kim *et al.*, 2002) e com resultados em células de cancro da mama humano MDA-MB-231 and MCF-7, onde o ARNm de LAT1 foi ~4,3- e ~4,9 vezes mais elevado do que 4F2hc (Shennan *et al.*, 2004). Com base nos dados por (Fuchs *et al.*, 2005), parece que a abundância global do ARNm de 4F2hc está a par com a de LAT1, mas deve ser tido em conta que os níveis de proteína de ARNm não estão sempre correlacionados de forma linear devido aos múltiplos mecanismos de controlo da expressão génica. Além disso, estas células possuem indubitavelmente mecanismos que correspondem adequadamente aos níveis proteicos de ambos componentes, de tal forma que 4F2hc não é limitante de taxa para funções vitais relacionadas com LAT1.

Quando foram injetadas células de cancro do cólon RCN-9 no baço de ratos, o tamanho dos tumores hepáticos metastáticos resultantes foi diretamente correlacionado com a expressão de LAT1 (Ohkame *et al.*, 2001; Tamai *et al.*, 2001). Consequentemente, foi proposto que a inibição da função de LAT1 poderia servir como uma terapêutica potencial para vários tipos de cancros (Kanai *et al.*, 2001). Até à data, os estudos visando LAT1 especificamente são escassos. Contudo, a expressão *antisense* de LAT1 *in vitro* em células tumorais hepáticas não humanas resultou numa diminuição modesta porém estatisticamente significativa do número de células, viabilidade e células em fase S durante um período de 5 dias em relação a controlos apesar da ausência de uma diminuição significativa do transporte de tipo L durante este período (Storey *et al.*, 2005).

Oligonucleótidos *antisense* direcionados contra 4F2hc foram mostrados como inibindo o transporte de isoleucina independente de Na⁺ em células de glioma de rato C6-BU-1 (Broer

et al., 1997), e a absorção de leucina em células citotrofoblásticas humanas BeWo (Kudo *et al.*, 2004), mas os efeitos sobre o crescimento celular não foram relatados. Um anticorpo anti-4F2hc inibiu a proliferação de uma variedade de linhas tumorais celulares (Yagita *et al.*, 1986), mas é possível que estes efeitos fossem mediados através dos efeitos coletivos sobre outras "cadeias leves" de 4F2 para além de LAT1, ou sobre funções não relacionadas com transporte de 4F2hc (Feral *et al.*, 2005). A inativação de LAT1 em células T-24 com um LAT1-ARNSi contra os nucleótidos 1173-1194 *in vitro* levou a uma diminuição da absorção de L-CSNO (Li *et al.*, 2005), mas não é relatado se a sobrevivência celular foi afetada. Consequentemente, permanecem sem ser relatados estudos mecanísticos ligando a "cadeia leve" de LAT1 ao crescimento do cancro.

A utilização de ARNSi para inibir a expressão génica de LAT1 foi divulgada por parte de vários grupos (Kim *et al.*, 2006a; Kim *et al.*, 2006b; Kaneko *et al.*, 2007; Pinho *et al.*, 2007a; Yin *et al.*, 2008; Kuhne *et al.*, 2009; Liang *et al.*, 2011; Denoyer *et al.*, 2012; Hayashi *et al.*, 2012; Dickens *et al.*, 2013; Youland *et al.*, 2013; Habermeier *et al.*, 2015).

Mais recentemente, LAT1 foi sugerido como um marcador do prognóstico de cancro nos tipos de cancros listados no seguinte quadro:

Rim	Carcinoma de células renais	(Betsunoh <i>et al.</i> 2013) <i>al.</i> ,
	Carcinomas uroteliais	(Eltz <i>et al.</i> 2008)
	Carcinoma celular do trato urinário superior	(Nakanishi <i>et al.</i> , 2007)

Pulmão	Cancro pulmonar de células não pequenas	(Kaira et al., 2008b; Imai et al., 2009; Kaira et al., 2009c; Kaira et al., 2009d; Kaira et al., 2010a; Kaira et al., 2010b; Kyoichi, 2010; Takeuchi et al., 2010; Kaira et al., 2011c; Kaira et al., 2012a; Chuntao et al., 2015)
	Adenocarcinoma pulmonar	(Kaira et al., 2010a)
	Carcinoma de células pequenas do pulmão	(Kaira et al., 2009a)
	Cancro pulmonar	(Kaira et al., 2007; Kaira et al., 2011a)
	Tumores neuroendócrinos do pulmão	(Kaira et al., 2008c; Kyoichi et al., 2008)
	Mesoteliona pleural maligno	(Kaira et al., 2011b)
Cólon	Cancro retal	(Ebara et al., 2010)
Mama	Cancro da mama	(Furuya et al., 2012; Emer et al., 2013; Fukumoto et al., 2013)
Pâncreas	Cancro pancreático	(Kaira et al., 2012b; Yanagisawa et al., 2012; Kaira et al., 2015a)
Gastrointestinal	Carcinoma gastrointestinal	(Ichinoe et al., 2011; Ichinoe et al., 2015)
	Cancro esofágico	(Suzuki et al., 2014)
Sangue	Mieloma múltiplo	(Isoda et al., 2014)
	Carcinomas tímicos	(Kaira et al., 2009b)

Hepatobiliar	Cancro do trato biliar	(Kaira et al., 2014; Yanagisawa et al., 2014)
	Carcinoma hepatocelular	(Li et al., 2013; Masashi et al., 2014)
	Carcinoma cístico adenoide	(Kaira et al., 2013)
Metastático	Metástase primária	(Kaira et al., 2008a)
	Metástase hepática	(Kaoru et al., 2011)
Cérebro	Glioma	(Keyaerts et al., 2007; Stockhammer et al., 2008; Okubo et al., 2010)
	Tumores astrocíticos	(Nawashiro et al., 2006)
Cabeça e Pescoço	Carcinoma de células escamosas orais	(Kim et al., 2004a; Nobusawa et al., 2013)
	Cancro da língua	(Toyoda et al., 2014)
	Carcinoma de células escamosas hipofaríngeas	(Toyoda et al., 2014)
Próstata	Cancro da próstata	(Sakata et al., 2009; Wang et al., 2011; Segawa et al., 2013; Yanagisawa et al., 2015)
Útero	Adenocarcinoma do endométrio	(Watanabe et al., 2014)

A atividade de transporte do sistema ASC é ubíqua e caracterizada pela sua preferência por aminoácidos neutros pequenos incluindo alanina, serina, e cisteína. O sistema ASC de transportadores de aminoácidos neutros (SLC1A4 e SLC1A5) pertence à família de portadores de solutos 1 (SLC1), que também inclui os transportadores de glutamato de alta afinidade. Foi identificado ATB0 humano através de RT-PCR e análise de restrição enzimática na linha celular de túbulo proximal humano

HKPT e corresponde ao roedor ASCT2. Os dois transportadores ASC exibem diferente seletividade de substrato. SLC1A4 codifica o transportador de aminoácidos dependente de sódio ASCT1, que aceita L-alanina, L-serina, L-treonina, e L-cisteína de uma forma estereoespecífica. ASCT2, a segunda isoforma do sistema de transporte ASC, é codificada por SLC1A5. No rim e intestino, ASCT2 está presente nas membranas de borda em escova das células tubulares proximais e enterócitos, respectivamente. Para além dos substratos típicos do sistema ASC, também aceita L-glutamina e L-asparagina a afinidade mais elevada bem como metionina, leucina, e glicina com menor afinidade. Tanto ASCT1 como ASCT2 medeiam a permuta obrigatória dependente de sódio de aminoácidos de substrato (Pinho *et al.*, 2007b).

ASCT2 é expresso em adenocarcinomas colorretais e a sobrevivência dos pacientes diminuiu com o aumento da percentagem de células cancerígenas positivas para ASCT2. Estes resultados indicam que ASCT2 é expresso num número significativo de adenocarcinomas colorretais, e que a expressão de ASCT2 está associada com comportamento biológico agressivo (Witte *et al.*, 2002). Foi proposto que ASCT3 parece ser requerido para o metabolismo da glutamina tanto em próstata não maligna como maligna. Contudo, o adenocarcinoma da próstata positivo para ASCT2 parece estar relacionado com um comportamento biológico mais agressivo. ASCT2 parece estar envolvido na progressão tumoral (Li *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2015). A expressão de ASCT2 tem um papel crucial na metástase de adenocarcinomas pulmonares, e é um marcador molecular potencial para a previsão de diagnóstico pobre após cirurgia (Shimizu *et al.*, 2014). A expressão de ASCT2 foi também constatada como desempenhando em papel importante no crescimento de células tumorais, e é um marcador patológico promissor para prever um resultado pior no cancro pancreático (Kaira *et al.*, 2015b; Kyoichi *et al.*, 2015). A expressão elevada de ASCT2 foi também constatada como estando significativamente associada com prognóstico e sobrevivência pobres de pacientes

de neuroblastoma (Ren *et al.*, 2015). Adicionalmente, outros sugeriram que a supressão de ASCT2 exerce efeitos proapoptóticos transcendendo os da privação de glutamina por si só (Bryan *et al.*, 2004; Fuchs *et al.*, 2004). A importância da expressão de ASCT2 em melanomas foi confirmada através de inativação de ARNsh, o que inibiu a absorção de glutamina, a sinalização por mTORC1 e a proliferação celular (Wang *et al.*, 2014).

ARN de interferência ("ARNi") é um mecanismo recentemente descoberto de silenciamento de genes pós-traducional no qual ARN de cadeia dupla correspondente a um gene (ou região de codificação) de interesse é introduzido num organismo, resultando na degradação do ARNm correspondente. O fenómeno foi originalmente descoberto em *Caenorhabditis elegans* (Fire *et al.*, 1998).

Ao contrário da tecnologia *antisense*, o fenómeno de ARNi persiste durante várias divisões celulares antes de que a expressão génica seja recuperada. O processo ocorre em pelo menos duas etapas: uma ribonuclease endógena cliva o ARNs mais longo em ARNs mais curtos de 21, 22 ou 23 nucleótidos de comprimento, denominados "ARNs de interferência pequenos" ou ARNsi (Hannon, 2002). Os segmentos de ARNsi medeiam posteriormente a degradação do ARNm alvo. O ARNi foi utilizado para a determinação da função génica de uma forma semelhante mas mais eficiente do que os oligonucleótidos *antisense*. Ao fabricar inativações visadas ao nível de ARN através de ARNi, em vez de ao nível de ADN utilizando tecnologia de inativação génica convencional, podem ser ensaiados um vasto número de genes rapidamente e eficazmente. O ARNi é como tal um método extremamente poderoso e simples para ensaio da função génica.

O ARNi foi mostrado como sendo eficaz em células de mamíferos cultivadas. Na maioria dos métodos descritos até à data, o ARNi é levado a cabo introduzindo ARN de cadeia dupla nas células através de microinjeção ou através de encharcamento das células cultivadas numa solução de ARN de cadeia dupla, bem como

transfетando as células com um plasmídeo portando uma cassete de expressão de ARNsi em estrutura de grampo de cabelo sob o controlo de promotores adequados, tais como o promotor U6, H1 ou citomegalovírus ("CMV") (Elbashir *et al.*, 2001; Harborth *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2001; Brummelkamp *et al.*, 2002; Miyagishi *et al.*, 2002; Paddison *et al.*, 2002; Paul *et al.*, 2002; Sui *et al.*, 2002; Xia *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2002). A inibição específica de gene da expressão génica através de ácido ribonucleico de cadeia dupla é geralmente descrita no Documento de Patente. U.S. N.º. 6.506.559, que é incorporado no presente documento por referência. A utilização exemplar da tecnologia de ARNsi é adicionalmente descrita no Pedido de Patente U.S. Publicado N.º 2003/01090635 e Pedido de Patente U.S. Publicado N.º 20040248174, que são incorporados no presente documento como referência. Davis (Davis, 2009) descreve a administração direcionada de ARNsi a seres humanos utilizando tecnologia de nanopartículas.

Sumário da invenção

Um objeto da presente invenção é utilizar uma técnica de ARN de interferência para regular negativamente a expressão dos genes LAT1 e/ou ASCT2 de modo a tratar ou prevenir o cancro.

Cancros preferidos que podem ser tratados ou prevenidos por parte da presente invenção incluem cancros de bexiga, cérebro, cólon, cabeça e pescoço, rim, fígado, pulmão, nódulos linfáticos, glândulas mamárias, músculo, ovário, pâncreas, pele e estômago. As composições "ou moléculas) da invenção compreendem moléculas de ácido nucleico de interferência curtas (ANsi) e compostos relacionados incluindo, mas não limitadas a, ARNsi. A presente invenção abrange composições e métodos de utilização de ANsi incluindo, mas não limitados a ARN de interferência curto (ARNsi), ARN de cadeia dupla (ARNds), micro-ARN (miARN), antagomirs e ARN curto em grampo de cabelo (ARNsh) capaz de mediar ARN de interferência. Numa forma de realização, a molécula de ANsi da invenção pode ser incorporada em RISC (complexo de silenciamento induzido por

ARN).

Um objetivo adicional da presente invenção é proporcionar uma molécula de ARNsi que regule negativamente de forma eficaz a expressão do gene LAT1 e/ou gene ASCT2.

Conseqüentemente, num aspeto, a invenção refere-se a uma molécula de ANsi, em que a dita molécula visa especificamente pelo menos uma sequência selecionada a partir da SEQ ID NO: 1- SEQ ID NO: 104 e SEQ ID NO: 209 - SEQ ID NO: 297. Numa forma de realização alternativa, a invenção refere-se a uma molécula de ANsi em que a dita molécula visa especificamente pelo menos uma sequência complementar a pelo menos uma sequência selecionada a partir da SEQ ID NO: 1- SEQ ID NO: 104 e SEQ ID NO: 209 - SEQ ID NO: 297. Numa forma de realização, a invenção refere-se a uma molécula de ANsi isolada.

Numa forma de realização, a molécula de ANsi reduz a expressão do gene LAT1 e/ou ASCT2 (humano) quando introduzida numa célula. Numa forma de realização preferida adicional, a dita molécula visa especificamente pelo menos uma sequência selecionada a partir da SEQ ID NO 4, 6, 10, 13, 22, 34, 58, 61, 81, 83, 87 e 95 a 104. Preferentemente, a molécula de ANsi reduz a expressão do gene LAT1 quando expressa numa célula. Alternativamente, numa forma de realização, a molécula de ANsi visa especificamente pelo menos uma sequência selecionada a partir da SEQ ID NO: 209, 216, 225, 226, 228, 235 a 238, 245, 260, 264, 267, 271, 272, 278, 279 e 281 a 297. Preferentemente a molécula de ANsi reduz a expressão do gene ASCT2 quando expressa numa célula.

Numa forma de realização da invenção, a molécula de ANsi tem 40 pares de bases ou menos de comprimento. Preferentemente, a molécula de ANsi tem 19 a 25 pares de bases de comprimento. Numa forma de realização, o ANsi compreende ou consiste numa região de cadeia dupla de 21 nucleótidos. Preferentemente, o ANsi tem uma cadeia *sense* e *antisense*. Numa forma de realização alternativa, a molécula de ANsi compreende ou consiste numa região de cadeia dupla de 19 nucleótidos. Numa forma de

realização, o ANsi tem terminais cegos. Numa forma de realização alternativa, o ANsi tem cadeias suspensas a 5' e/ou 3'. Preferentemente as cadeias suspensas têm entre 1 a 5 nucleótidos, mais preferentemente, cadeias suspensas de 2 nucleótidos. As cadeias suspensas podem ser ácidos ribonucleicos, ou ácidos desoxirribonucleicos.

Numa forma de realização, a molécula de ANsi de acordo com a invenção compreende uma modificação química. Preferentemente, a modificação química é na cadeia *sense*, na cadeia *antisense* ou em ambas. Exemplos de modificações químicas incluem ligações internucleotídicas fosforotioato, metilação 2'-O, 2'-desoxi-fluororribonucleótidos, 2'-desoxirribonucleótidos, nucleótidos de 5-C metilo, incorporação de resíduos desoxibásicos invertidos ou uma substituição de nucleótidos de uracilo ribose com nucleótidos de desoxitimidina ou combinações dos mesmos.

Numa forma de realização, as cadeias suspensas a 5' ou 3' são dinucleótidos, preferentemente dinucleótidos de timidina. Numa forma de realização preferida, as cadeias suspensas a 5' ou 3' são desoxitimidinas.

Numa forma de realização, a molécula de ANsi compreende ou consiste em pelo menos uma sequência selecionada a partir do grupo consistindo na SEQ ID NO: 105 a 208 e 298 a 386. Numa forma de realização preferida a molécula de ANsi compreende ou consiste em pelo menos uma sequência selecionada a partir do grupo compreendendo a SEQ ID NO: 108, 110, 114, 117, 126, 138, 162, 165, 185, 187, 191 e 199 a 208. Preferentemente, a molécula de ANsi reduz a expressão do gene LAT1 quando expressa numa célula. Noutra forma de realização preferida a molécula de ANsi compreende ou consiste em pelo menos uma sequência selecionada a partir do grupo compreendendo a SEQ ID NO: 298, 305, 314, 315, 317, 324-327, 334, 349, 353, 356, 360, 361, 367, 368 e 370 a 386. Preferentemente, A molécula de ANsi reduz a expressão do gene ASCT2 quando expressa numa célula. De forma notável, nalgumas formas de realização, a molécula de ANsi (tanto a

cadeia a 5' como a 3' ou ambas) pode começar com pelo menos um, preferentemente dois nucleótidos de alanina. Alternativamente, se a sequência alvo começa com uma ou duas sequências de alanina, estas podem não estar incluídas (visadas) na molécula de ANsi.

Numa forma de realização são utilizadas uma pluralidade de espécies de molécula de ANsi, em que a dita pluralidade de moléculas de ANsi são direcionadas para a mesma ou uma espécie diferente de ARNm.

Numa forma de realização, o ANsi é selecionado a partir de ARNds, ARNsi ou ARNsh. Preferentemente, o ANsi é ARNsi.

Numa forma de realização adicional, a invenção refere-se a uma molécula de ANsi, conforme descrito no presente documento para utilização como um medicamento. Numa forma de realização, a invenção refere-se a um ANsi para utilização no tratamento de um distúrbio caracterizado por aumento dos níveis de expressão (em comparação com os níveis num indivíduo saudável) de LAT1 e/ou ASCT2.

Noutro aspeto da invenção, é proporcionada uma molécula de ANsi, conforme descrito no presente documento para utilização no tratamento do cancro.

Num aspeto adicional, a invenção refere-se à utilização de uma molécula de ANsi, conforme descrito no presente documento na preparação de um medicamento para o tratamento do cancro.

Noutro aspeto, a invenção refere-se a um método para o tratamento do cancro, o método compreendendo administrar uma molécula de ANsi, conforme descrito no presente documento, a um paciente ou indivíduo com necessidade da mesma.

Numa forma de realização, o cancro é selecionado a partir de cancro da bexiga, sangue, cérebro, cólon, cabeça e pescoço, rim, fígado, pulmão, nódulos linfáticos, glândulas mamárias, músculo, ovário, pâncreas, próstata pele, estômago e útero.

Noutro aspeto da invenção é proporcionada uma composição farmacêutica compreendendo pelo menos uma molécula de ANsi conforme descrito no presente documento e um portador

farmaceuticamente aceitável.

Num aspeto adicional da invenção é proporcionado um método, preferentemente um método *in vitro* de inibir a absorção de aminoácidos para uma célula, o método compreendendo administrar um ANsi conforme descrito no presente documento a uma célula. Preferentemente, a absorção de aminoácidos é absorção de leucina independente de sódio. Alternativamente, a absorção de aminoácidos é absorção de alanina dependente de sódio.

Descrição detalhada da invenção

A presente invenção é dirigida a um método de direcionamento do gene LAT1 e/ou gene ASCT2 através de inativação ou inibição da sua expressão como uma estratégia inovadora para a terapêutica do cancro. Em particular, e de acordo com um primeiro aspeto da presente invenção, é proporcionada a utilização de um ARNsi para inibir a expressão do gene LAT1 e/ou gene ASCT2 no fabrico de um medicamento para tratar ou prevenir o cancro, em que o ARNsi compreende um ácido nucleico de LAT1 ou ASCT2 *sense* e um ácido nucleico de LAT1 ou ASCT2 *antisense*. A presente invenção também proporciona a utilização de um vetor codificando o ARNsi para inibir a expressão génica de LAT1 e/ou ASCT2 no fabrico de um medicamento para tratar ou prevenir o cancro.

De acordo com um segundo aspeto da presente invenção, é proporcionado um método de tratamento ou prevenção do cancro compreendendo administrar a um indivíduo uma quantidade eficaz de um ARNsi que inibe a expressão génica de LAT1 e/ou ASCT2, em que o ARNsi compreende um ácido nucleico de LAT1 ou ASCT2 *sense* e um ácido nucleico de LAT1 ou ASCT2 *antisense*. A presente invenção também proporciona um método de tratamento ou prevenção do cancro compreendendo administrar a um indivíduo uma quantidade eficaz de um vetor codificando o ARNsi que inibe a expressão génica de LAT1 e ASCT2.

A sobreexpressão do transportador de LAT1, uma isoforma do sistema L de transportador de aminoácidos neutros independente

de Na⁺ é uma observação altamente prevalente em várias formas de cancro. A presente invenção é baseada na descoberta surpreendente de que ARNs de interferência pequenos (ARNsi) seletivos para LAT1 são eficazes para tratar o cancro. Em particular, cancro de bexiga, sangue, cérebro, cólon, cabeça e pescoço, rim, fígado, pulmão, nódulos linfáticos, glândulas mamárias, metastático, músculo, ovário, pâncreas, próstata pele, estômago e útero.

O ARNsi ou vetor codificando o ARNsi, ou o medicamento compreendendo o ARNsi ou vetor codificando o ARNsi, pode ser administrado a um indivíduo através de administração entérica (por exemplo, oral, retal e intranasal), administração parentérica (por exemplo, administração intravascular, administração peri- e intra-tecidual, injeção ou deposição subcutânea, infusão subcutânea, administração intraocular e administração direta em ou perto do sítio de um tumor.

De acordo com um terceiro aspeto da presente invenção é proporcionado um método *in vitro* de inibir a expressão do gene LAT1 e/ou gene ASCT2 numa célula compreendendo colocar em contacto a células com ANsi que inibe a expressão génica de LAT1 e/ou ASCT2 conforme descrito no presente documento. Numa forma de realização, o dito ARNsi compreende um ácido nucleico de LAT1 e/ou ASCT2 *sense* e um ácido nucleico de LAT1 e/ou ASCT2 *antisense*, em que o ácido nucleico LAT 1 ou ASCT2 *sense* é substancialmente idêntico a uma sequência alvo contida dentro do ARNm de LAT1 ou ASCT2 e o ácido nucleico de LAT1 e ASCT2 *antisense* é complementar com o ácido nucleico de LAT1 ou ASCT2 *sense*. A presente invenção também proporciona um método *in vitro* de inibir a expressão dos genes LAT1 e/ou ASCT2 numa célula compreendendo colocar em contacto a célula com um vetor codificando um ARNsi que inibe a expressão génica de LAT1 e/ou ASCT2, o dito ARNsi compreende um ácido nucleico de LAT1 e/ou ASCT2 *sense* e um ácido nucleico de LAT1 e/ou ASCT2 *antisense*, em que o ácido nucleico LAT 1 ou ASCT2 *sense* é substancialmente idêntico a uma sequência alvo contida dentro do ARNm de LAT1

ou ASCT2 e o ácido nucleico de LAT1 e ASCT2 *antisense* é complementar com o ácido nucleico de LAT1 ou ASCT2 *sense*.

A expressão do gene pode ser inibida através da introdução de uma molécula de ácido ribonucleico de cadeia dupla (ARNds) na célula numa quantidade suficiente para inibir a expressão dos genes LAT1 e/ou ASCT2.

Os ARNsi utilizados na invenção são acreditados com causando a degradação mediada por ARNi de ARNm de LAT1 ou ASCT2 de tal forma que o produto proteico do gene LAT1 ou ASCT2 não é produzido ou é produzido em quantidades reduzidas. Os ARNsi utilizados na invenção podem ser utilizados para alterar a expressão génica numa célula na qual a expressão de LAT1 e/ou ASCT2 é regulada positivamente, por exemplo, como resultado de transformação maligna das células. A ligação do ARNsi a um transcrito de ARNm de LAT1 ou ASCT2 numa célula resulta numa redução da produção de LAT1 e ASCT2 por parte da célula.

O termo "ARNsi" é utilizado para significar uma molécula de ARN de cadeia dupla que previne a tradução de um ARNm alvo. São utilizadas técnicas padrão de introdução de ARNsi na célula, incluindo aquelas nas quais o ADN é um molde a partir do qual o ARN é transcrito. O ARNsi que inibe a expressão génica de LAT1 ou ASCT2 inclui uma sequência de ácidos nucleicos de LAT1 ou ASCT2 *sense* e uma sequência de ácidos nucleicos de LAT1 ou ASCT2 *antisense*. O ARNsi pode ser construído de tal forma que um único transcrito tenha as sequências tanto *sense* como *antisense* complementar a partir do gene alvo, por exemplo, na forma de um grampo de cabelo.

O ARNsi compreende preferentemente ARN de cadeia dupla curto que é direcionado para o ARNm alvo, isto é, ARNm de LAT1 ou ARNm de ASCT2. O ARNsi compreende uma cadeia de ARN *sense* e uma cadeia de ARN *antisense* complementar hibridizadas juntas através de interações de emparelhamento de bases de Watson-Crick padrão (doravante no presente documento "emparelhamento de bases"). A cadeia *sense* compreende uma sequência de ácidos nucleicos que é substancialmente idêntica a uma sequência alvo contida dentro

do ARNm de LAT1 ou do ARNm alvo de ASCT2.

Os termos "sequências *sense/antisense*" e "cadeias *sense/antisense*" são utilizadas indistintamente no presente documento para referir as partes do ARNsi da presente invenção que são substancialmente idênticas (sentido direto) à sequência alvo de ARNm de LAT1 e ASCT2 ou substancialmente complementares (*antisense*) à sequência alvo de ARNm de LAT1 e ASCT2.

Conforme utilizado no presente documento, uma sequência de ácidos nucleicos "substancialmente idêntica" a uma sequência alvo contida dentro do ARNm alvo é uma sequência de ácidos nucleicos que é idêntica à sequência alvo, ou que difere da sequência alvo por um ou mais nucleótidos. Preferentemente, a sequência substancialmente idêntica é idêntica à sequência alvo ou difere da sequência alvo por um, dois ou três nucleótidos, mais preferentemente por um ou dois nucleótidos e ainda mais preferentemente por somente 1 nucleótido. As cadeias *sense* compreendendo sequências de ácidos nucleicos substancialmente idênticas a uma sequência alvo são caracterizadas por ARNsi compreendendo uma tal cadeia *sense* induzir degradação mediada por ARNi de ARNm contendo a sequência alvo. Por exemplo, um ARNsi da invenção pode compreender uma cadeia *sense* compreendendo uma sequência de ácidos nucleicos que difere de uma sequência alvo por um, dois, três ou mais nucleótidos, contanto que a degradação mediada por ARNi seja induzida pelo ARNsi.

As cadeias *sense* e *antisense* do ARNsi podem compreender duas moléculas de ARN de cadeia simples complementares ou podem compreender uma única molécula na qual duas porções complementares têm emparelhamento de bases e estão ligadas de forma covalente através de uma área em grampo de cabelo de cadeia simples. Isto é, a região *sense* e região *antisense* podem estar ligadas de forma covalente através de uma molécula ligante. A molécula ligante pode ser um ligante polinucleotídico ou não nucleotídico. O ARNsi pode também

conter alterações, substituições ou modificações de uma ou mais bases de ribonucleótidos. Por exemplo, o presente ARNsi pode ser alterado, substituído ou modificado para conter uma ou mais, preferentemente 0, 1, 2 ou 3, bases de desoxirribonucleótidos. Preferentemente, o ARNsi não contém quaisquer bases de desoxirribonucleótidos.

O ARNsi pode compreender ARN parcialmente purificado, ARN substancialmente puro, ARN sintético, ou ARN produzido de forma recombinante, bem como ARN alterado que difere do ARN de ocorrência natural através da adição, eliminação, substituição e/ou alteração de um ou mais nucleótidos. Tais alterações podem incluir a adição de material não nucleotídico, tal como à(s) extremidade(s) do ARNsi ou a um ou mais nucleótidos internos do ARNsi; modificações que tornam o ARNsi resistente à digestão por nucleases (por exemplo, a utilização de ribonucleótidos 2'-substituídos ou modificações da estrutura principal de açúcar-fosfato); ou a substituição de um ou mais, preferentemente 0, 1, 2 ou 3, nucleótidos no ARNsi com desoxirribonucleótidos.

A degradação pode ser atrasada ou evitada através de uma ampla variedade de modificações químicas que incluem alterações das nucleobases, açúcares e da estrutura principal de éster de fosfato dos ARNsi. Todos estes ARNsi quimicamente modificados são ainda capazes de induzir silenciamento gênico mediado por ARNsi contanto que as modificações estivessem ausentes em regiões específicas do ARNsi e incluídas até um ponto limitado. Geralmente, as modificações da estrutura principal causam uma pequena perda da afinidade de ligação, mas oferecem resistência a nucleases. ARNsi modificados com fosforotioato (PS) ou boranofosfato (BS) têm resistência a nucleases substancial. O silenciamento através de dúplexes de ARNsi é também compatível com alguns tipos de modificações de açúcar 2': 2'-H, 2'-O-metilo, 2'-O-metoxietilo, 2'-fluoro (2'-F), ácido nucleico bloqueado (LNA) e ácido nucleico de ponte de etileno (ENA). Modificações químicas adequadas são bem

conhecidas para os peritos na especialidade.

O ARNsi utilizado na presente invenção é uma molécula de cadeia dupla compreendendo uma cadeia *sense* e uma cadeia *antisense*, em que a cadeia *sense* compreende ou consiste numa sequência de ribonucleótidos correspondente a uma sequência alvo de LAT1 ou ASCT2, e em que a sequência *antisense* compreende uma sequência de ribonucleótidos que é complementar com a dita cadeia *sense*, em que as ditas cadeia *sense* e cadeia *antisense* hibridam entre si para formar a dita molécula de cadeia dupla, e em que a dita molécula de cadeia dupla, quando introduzida numa célula expressando os genes LAT1 e ASCT2, inibe a expressão dos ditos genes. Conforme indicado mais abaixo, a dita sequência alvo de LAT1 compreende referentemente pelo menos cerca de 10, mais preferentemente 15 a 21, e ainda mais preferentemente cerca de 19 a 21 nucleótidos contíguos selecionados a partir do grupo consistindo em desde a SEQ ID N.º 4, 6, 10, 13, 22, 34, 58, 61, 81, 83, 87, e 95 a 104. Conforme indicado mais abaixo, a dita sequência alvo de ASCT2 compreende referentemente pelo menos cerca de 10, mais preferentemente 15 a 21, e ainda mais preferentemente cerca de 19 a 21 nucleótidos contíguos selecionados a partir do grupo consistindo em desde a SEQ ID N.º 209, 216, 225, 226, 228, 235-238, 245, 260, 264, 267, 271, 272, 278, 279, 281 a 297.

Numa forma de realização da presente invenção, as ditas cadeias *sense* e *antisense* da molécula de ARNsi estão ligadas de forma covalente através de uma molécula ligante. A dita molécula ligante pode ser um ligante polinucleotídico ou ligante não nucleotídico. Preferentemente o ligante é uma sequência em ansa. A sequência em ansa tem preferentemente 3 a 23 nucleótidos de comprimento. São descritas sequências de ansa adequadas

em http://www.ambion.com/techlib/tb/tb_506.html e (Jacque *et al.*, 2002). Sequências de ansa preferidas incluem:

AUG: (Sui *et al.*, 2002).

CCC, CCACC ou CCACACC: (Paul *et al.*, 2002).

UUCG: (Lee et al., 2002).

CTCGAG ou AAGCUU : (Biology, 2003).

UUCAAGAGA: (Yu et al., 2002).

A sequência de ansa pode ser selecionada a partir do grupo consistindo em AUG, CCC, UUCG, CCACC, CTCGAG, AAGCUU, CCACACC, e UUCAAGAGA. Preferentemente a sequência de ansa é UUCAAGAGA ("ttcaagaga" em ADN).

O ARNsi utilizado na presente invenção pode ser obtido utilizando uma série de técnicas conhecidas para os peritos na especialidade. Por exemplo, o ARNsi pode ser sintetizado quimicamente ou produzido de forma recombinante utilizando métodos conhecidos na técnica, tais como o sistema *in vitro* de *Drosophila* descrito no pedido U.S. publicado 2002/0086356, a totalidade da divulgação do qual é incorporada no presente documento como referência. O ARNsi pode ser sintetizado quimicamente utilizando fosforamiditas de ribonucleósido adequadamente protegidas e um sintetizador de ADN/ARN convencional. O ARNsi pode ser sintetizado como duas moléculas de ARN separadas complementares, ou como uma única molécula de ARN com duas regiões complementares. Os fornecedores comerciais de moléculas de ARN sintéticas ou reagentes de síntese incluem Biospring (Frankfurt, Alemanha), Proligo (Hamburgo, Alemanha), Dharmacon Research (Lafayette, Colo., EUA), Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA EUA), Glen Research (Sterling, Va., EUA), ChemGenes (Ashland, Mass., EUA) e Sigma-Aldrich (St. Louis, MO EUA).

O ARNsi pode também ser expresso a partir de vetores de ADN recombinante circular ou linear utilizando qualquer promotor adequado. Promotores adequados para expressar ARNsi a partir de um vetor incluem, por exemplo, as sequências de promotor de ARN pol IIIU6 ou H1 e o promotor de citomegalovírus. A seleção de outros promotores adequados encontra-se dentro do âmbito da técnica. O vetor pode também compreender promotores induzíveis ou reguláveis para expressão do ARNsi num tecido particular ou num ambiente intracelular particular.

O ARNsi expresso a partir de um vetor pode ou ser isolado a partir de sistemas de expressão de células em cultura através de técnicas padrão, ou pode ser expresso intracelularmente. O vetor pode ser utilizado para administrar o ARNsi a células *in vivo*, por exemplo, através de expressão intracelular do ARNsi *in vivo*. O ARNsi pode ser expresso a partir de um vetor ou como duas moléculas separadas complementares, ou como uma única molécula de ARN com duas regiões complementares. A seleção de vetores adequados para expressar o ARNsi, métodos para inserção de sequências de ácidos nucleicos para expressar o ARNsi no vetor, e métodos de administração do vetor às células de interesse são bem conhecidos para os peritos na especialidade.

O ARNsi pode também ser expresso a partir de um vetor intracelularmente *in vivo*. Conforme utilizado no presente documento, o termo "vetor" significa qualquer técnica à base de ácidos nucleicos e/ou vírus utilizada para administrar um ácido nucleico desejado. Pode ser utilizado qualquer vetor capaz de aceitar as sequências codificantes para a(s) molécula(s) de ARNsi a ser expressas, incluindo plasmídeos, cosmídeos, ADN nu, opcionalmente condensado com um agente de condensação, e vetores virais. Vetores virais adequados incluem vetores derivados a partir de adenovírus (AV); vírus adeno-associados (AAV); retrovírus (por exemplo, lentivírus (LV), rabdovírus, vírus da leucemia de ratinho, herpesvírus, e semelhantes. O tropismo de vetores virais pode ser modificado através de pseudotipagem dos vetores com proteínas de envelope ou outros antígenos de superfície a partir de outros vírus, ou através de substituição de diferentes proteínas de cápside viral, conforme adequado. Quando o vetor é um vetor lentiviral é preferentemente pseudotipado com proteínas de superfície a partir de vírus da estomatite vesicular, vírus da raiva, vírus do Ébola ou vírus Mokola.

Os vetores são produzidos por exemplo através de clonagem de uma sequência alvo de LAT1 ou ASCT2 num vetor de expressão de tal forma que sequências reguladoras ligadas operativamente

flanqueiam a sequência de LAT1 ou ASCT2 de uma forma que permite a expressão (através de transcrição da molécula de ADN) de ambas cadeias (Lee *et al.*, 2002). É transcrita uma molécula de ARN que é *antisense* para o ARNm de LAT1 ou ASCT2 através de um primeiro promotor (por exemplo, uma sequência promotora a 3' do ADN clonado) e uma molécula de ARN que é a cadeia *sense* para o ARNm de LAT1 ou ASCT2 é transcrita por parte de um segundo promotor (por exemplo, uma sequência promotora a 5' do ADN clonado). As cadeias *sense* e *antisense* hibridam *in vivo* para gerar construções de ARNsi para silenciamento do gene LAT1 ou gene ASCT2. Alternativamente, são utilizados dois vetores para criar as cadeias *sense* e *antisense* de uma construção de ARNsi. LAT1 ou ASCT2 clonados podem codificar uma construção tendo estrutura secundária, por exemplo, grampo de cabelos, em que um único transcrito tem as sequências tanto *sense* como *antisense* complementar a partir do gene alvo. Um tal transcrito codificando uma construção tendo estrutura secundária, compreenderá preferentemente uma sequência de ribonucleótidos de cadeia simples (sequência de ansa) ligando a dita cadeia *sense* e a dita cadeia *antisense*.

O ARNsi é preferentemente isolado. Conforme utilizado no presente documento, "isolado" significa sintético, ou alterado ou removido a partir do estado natural através de intervenção humana. Por exemplo, um ARNsi naturalmente presente num animal vivo não está "isolado", mas um ARNsi sintético, ou um ARNsi parcialmente ou completamente separado a partir dos materiais coexistentes do seu estado natural está "isolado". Um ARNsi isolado pode existir em forma substancialmente pura, ou pode existir num ambiente não nativo tal como, por exemplo, uma célula à qual o ARNsi foi administrado. Por meio de exemplo, ARNsi que são produzidos dentro de uma célula através de processos naturais, mas que são produzidos a partir de uma molécula precursora "isolada", são eles próprios moléculas "isoladas". Consequentemente, um ARNds isolado pode ser introduzido numa célula alvo, onde é processado através da

proteína Dicer (ou o seu equivalente) em ARNsi isolado.

Conforme utilizado no presente documento, "inibir" significa que a atividade do produto de expressão génica de LAT1 ou ASCT2 ou nível do produto de expressão génica de LAT1 ou ASCT2 é reduzida por debaixo da observada na ausência de molécula de ARNsi da invenção. A inibição com uma molécula de ARNsi é preferentemente significativa por debaixo do nível observado na presença de uma molécula inativa ou atenuada que é incapaz de mediar uma resposta de ARNi. A inibição da expressão génica com a molécula de ARNsi é preferentemente significativamente maior na presença da molécula de ARNsi do que na sua ausência. Preferentemente, o ARNsi inibe o nível de expressão génica de LAT1 ou ASCT2 por pelo menos 10%, mais preferentemente pelo menos 50% e ainda mais preferentemente pelo menos 75%.

Preferentemente a molécula de ARNsi inibe a expressão génica de LAT1 ou ASCT2 de tal forma a que o crescimento da célula contendo o gene LAT1 ou ASCT2 seja inibido. Ao inibir o crescimento celular é entendido que a célula tratada prolifera a uma taxa menor ou tem viabilidade diminuída do que uma célula não tratada. O crescimento celular é medido através de ensaios de proliferação conhecidos na técnica.

Conforme utilizado no presente documento, um "ácido nucleico isolado" é um ácido nucleico removido a partir do seu ambiente original (por exemplo, o ambiente natural se ocorrendo naturalmente) e conseqüentemente, alterado sinteticamente a partir do seu estado natural. Na presente invenção, ácido nucleico isolado inclui ADN, ARN e derivados dos mesmos. Quando o ácido nucleico isolado é ARN ou derivados do mesmo, a base "t" deve ser substituída com "u" nas sequências de nucleótidos.

Conforme utilizado no presente documento, o termo "complementar" refere-se a emparelhamento de bases de Watson-Crick ou Hoogsten entre unidades nucleotídicas de um polinucleótido, e o termo "ligar" significa a interação física ou química entre dois polipéptidos ou compostos ou polipéptidos ou compostos associados ou combinações dos mesmos.

Conforme utilizado no presente documento, a frase "região de sequência altamente conservada" significa que uma sequência de nucleótidos de uma ou mais regiões num gene alvo não varia significativamente de uma geração a outra ou a partir de um sistema biológico a outro.

Conforme utilizado no presente documento, o termo "complementaridade" ou "complementar" significa que um ácido nucleico pode formar ligação(ões) hidrogénio com outra sequência de ácidos nucleicos ou através de Watson-Crick tradicional ou de outros tipos de interação não tradicionais. Com referência à presente invenção, a energia livre de ligação para uma molécula de ARNsi com a sua sequência complementar é suficiente para permitir que a função relevante do ácido nucleico prossiga, por exemplo, atividade de ARNi. Por exemplo, o grau de complementaridade entre as cadeias *sense* e *antisense* da molécula de ARNsi pode ser o mesmo ou diferente do grau de complementaridade entre a cadeia *sense* do ARNsi e a sequência de ARN alvo.

Uma percentagem de complementaridade indica a percentagem de resíduos contíguos numa molécula de ácido nucleico que pode formar ligações de hidrogénio (por exemplo, emparelhamento de bases de Watson-Crick) com uma segunda sequência de ácidos nucleicos (por exemplo, 5, 6, 7, 8, 9, 10 de 10 sendo complementar a 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, e 100%). "Perfeitamente complementar" significa que todos os resíduos contíguos de uma sequência de ácidos nucleicos realização ligações de hidrogénio com o mesmo número de resíduos contíguos numa segunda sequência de ácidos nucleicos. Preferentemente o termo "complementaridade" ou "complementar" significa que pelo menos 90%, mas preferentemente pelo menos 95% e ainda mais preferentemente 100% dos resíduos num primeiro *sense* de ácidos nucleicos podem formar ligações de hidrogénio com uma segunda sequência de ácidos nucleicos.

As sequências de ácidos nucleicos complementares hibridam sob condições adequadas para formar dúplexes estáveis contendo

poucos (um ou dois) ou nenhum emparelhamento errôneo. Além disso, a cadeia *sense* e cadeia *antisense* do ARNsi podem formar um nucleótido ou estrutura de ansa em grampo de cabelo de cadeia dupla através da hibridação. Numa forma de realização preferida, tais dúplexes não contêm mais de 1 emparelhamento errôneo por cada 10 emparelhamentos. Numa forma de realização especialmente preferida, as cadeias *sense* e *antisense* do dúplex são totalmente complementares, isto é, os dúplexes não contêm emparelhamentos errôneos.

Conforme utilizado no presente documento, o termo "célula" é definido utilizando o seu sentido biológico habitual. A célula pode estar presente num organismo, por exemplo, mamíferos tais como seres humanos, vacas, ovelhas, símios, macacos, suínos, cães, e gatos. A célula pode ser eucariótica (por exemplo, uma célula de mamífero). A célula pode ser de origem de linha germinal ou somática, totipotente ou multipotente, de divisão ou não de divisão. A célula pode também ser derivada a partir de ou pode compreender uma gâmeta ou embrião, uma célula estaminal, ou uma célula totalmente diferenciada. Preferentemente a célula é uma célula cancerígena da bexiga, cérebro, cólon, cabeça e pescoço, rim, fígado, pulmão, nódulos linfáticos, glândulas mamárias, músculo, ovário, pâncreas, pele ou estômago.

Conforme utilizado no presente documento, o termo "ARN" significa uma molécula compreendendo pelo menos um resíduo de ribonucleótido. Por "ribonucleótido" é entendido um nucleótido com um grupo hidroxilo na posição 2' de uma fração beta-D-ribo-furanose. O termo inclui ARN de cadeia dupla, ARN de cadeia simples, ARN isolado tal como ARN parcialmente purificado, ARN essencialmente puro, ARN sintético, ARN produzido de forma recombinante, bem como ARN alterado que difere do ARN de ocorrência natural através da adição, eliminação, substituição e/ou alteração de um ou mais nucleótidos. Tais alterações podem incluir a adição de material não nucleotídico, tal como no(s) terminal(is) do ARNsi ou

internamente, por exemplo em um ou mais nucleótidos do ARN. Os nucleótidos nas moléculas de ARN da presente invenção podem também compreender nucleótidos não padrão, tais como nucleótidos de ocorrência não natural ou nucleótidos ou desoxinucleótidos sintetizados quimicamente. Estes ARNs alterados podem ser referidos com análogos de ARN de ocorrência natural. Preferentemente o termo "ARN" consiste somente em resíduos de ribonucleótido.

Conforme utilizado no presente documento, o termo "organismo" refere-se a qualquer entidade viva composta por pelo menos uma célula. Um organismo vivo pode ser tão simples quanto, por exemplo, uma única célula eucariótica ou tão complexo quanto um mamífero, incluindo um ser humano.

Conforme utilizado no presente documento, o termo "indivíduo" significa um organismo, que é um dador ou recetor de células explantadas ou as próprias células. "Indivíduo" também se refere a um organismo ao qual as moléculas de ácido nucleico da invenção podem ser administradas. O indivíduo é preferentemente um mamífero, por exemplo, um ser humano, primata não humano, ratinho, rato, cão, gato, cavalo, ou vaca. Mais preferentemente o indivíduo é um ser humano.

Conforme utilizado no presente documento, o termo "amostra biológica" refere-se a qualquer amostra contendo polinucleótidos. A amostra pode ser uma amostra de tecido ou celular, ou um fluido corporal contendo polinucleótidos (por exemplo, sangue, muco, fluido linfático, fluido sinovial, fluido cerebrospinal, saliva, fluido amniótico, sangue de cordão amniótico, urina, fluido vaginal e sémen). A amostra pode ser um homogenado, lisado, extrato, cultura celular ou cultura de tecido preparada a partir de um organismo inteiro ou um subconjunto das suas células, tecidos ou partes constituintes, ou uma fração ou porção dos mesmos. Por último, a amostra pode ser um meio, tal como um caldo de nutrientes ou gel no qual um organismo, ou células de um organismo, foram propagadas, em que a amostra contém polinucleótidos.

A invenção refere-se a métodos de inibir a expressão génica de LAT1 e/ou ASCT2 que causa a inibição do crescimento de células cancerígenas. Em particular, a invenção proporciona um método para inibir o crescimento de uma população de células cancerígenas compreendendo aplicar o ARNsi de LAT1 e/ou ASCT2 à dita população de células cancerígenas. O crescimento de células cancerígenas é inibido através do contacto de uma célula com uma composição de um ARNsi de LAT1 e/ou ASCT2. LAT1 e ASCT2 são proteínas transportadoras de aminoácidos que são sobreexpressas em tumores tais como cancros da bexiga, cérebro, cólon, cabeça e pescoço, rim, fígado, pulmão, nódulos linfáticos, glândulas mamárias, músculo, ovário, pâncreas, pele e estômago. O crescimento das células expressando LAT1 ou ASCT2 pode ser inibido por um ARNsi de LAT1 ou ASCT2. A célula pode ser adicionalmente colocada em contacto com um agente de potenciamento da transfeção para potenciar a administração do ARNsi ou vetor codificando ARNsi à célula. Dependendo do método específico da presente invenção, a célula pode ser proporcionada *in vitro*, *in vivo* ou *ex vivo*.

Foi extraída informação de sequência relativa ao gene LAT1 humano (acesso GenBank NM_003486) a partir da base de dados de nucleótidos NCBI Entrez. Foram identificados até 104 segmentos de ARNm. Foi extraída informação de sequência relativa ao gene ASCT2 humano (acesso GenBank NM_001145144) a partir da base de dados de nucleótidos NCBI Entrez. Foram identificados até 89 segmentos de ARNm. São conhecidos métodos para desenhar ARN de cadeia dupla tendo a capacidade de inibir a expressão génica numa célula alvo. Veja-se por exemplo, o Documento de Patente US N.º 6.506, 559, e Elbashir *et al.*, 2001, incorporados no presente documento como referência na sua totalidade.

A seleção de sítios alvo de ARNsi pode ser realizada conforme segue

1. Iniciando com o codão de início ATG do transcrito, rastrear a jusante para sequências dinucleotídicas de AA. Registrar a ocorrência de cada AA e os 19 nucleótidos adjacentes a

3' como sítios alvo de ARNsi potenciais. Tuschal et al. não recomendam desenhar ARNsi para as regiões não traduzidas (UTRs) a 5' e 3' e regiões perto do codão de início (dentro de 75 bases) já que estas podem ser ricas em sítios de ligação a proteínas reguladoras. As proteínas de ligação a UTR e/ou complexos de iniciação da tradução podem interferir com a ligação do complexo endonuclease de ARNsi.

2. Comparar os sítios alvo potenciais com a base de dados genómica adequada (ser humano, ratinho, rato, etc.) e eliminar da consideração quaisquer sequências alvo com homologia significativa a com outras sequências codificantes. É sugerido utilizar BLAST, que pode ser encontrado no servidor NCBI em :www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/
3. Selecionar sequências alvo qualificantes (isto é, sequências tendo mais de 55% de teor de GC) para a síntese.

Num aspeto da invenção, o comprimento do ácido nucleico *sense* é pelo menos de 10 nucleótidos e pode ser tão longo quanto o transcrito de LAT1 de ocorrência natural. Preferentemente, o ácido nucleico *sense* tem menos de 75, 50, ou 25 nucleótidos de comprimento.

É adicionalmente preferido que o ácido nucleico *sense* compreenda pelo menos 19 nucleótidos. Mais preferentemente, o ácido nucleico *sense* tem 19-25 nucleótidos de comprimento. Exemplos de ácidos nucleicos *sense* de ARNsi de LAT1 da presente invenção que inibem a expressão de LAT1 em células de mamíferos incluem oligonucleótidos compreendendo qualquer uma das seguintes sequências alvo do gene LAT1: nucleótidos 145-165 (SEQ ID N° 4), 217-237 (SEQ ID N° 6), 466-486 (SEQ ID N° 10), 628-648 (SEQ ID N° 13), 796-816 (SEQ ID N° 22), 1243-1263 (SEQ ID N° 34), 525-545 (SEQ ID N° 58), 624-644 (SEQ ID N° 61), 1245-1265 (SEQ ID N° 81), 13161336 (SEQ ID N° 83), 1410-1430 (SEQ ID N° 87), 147-165 (SEQ ID N° 95), 219-237 (SEQ ID N° 96), 468-486 (SEQ ID N° 97), 630648 (SEQ ID N° 98), 798-816 (SEQ

ID N° 99), 1247-1263 (SEQ ID N° 100), 527-545 (SEQ ID N° 101), 1247-1265 (SEQ ID N° 102), 1318-1336 (SEQ ID N° 103), 1412-1430 (SEQ ID N° 104).

Foram geradas cento e quatro sequências, que representam a sequência para uma cadeia da dupla cadeia é ARN, para LAT-1. Estas incluíram as seguintes sequências nucleotídicas:

SEQ ID N° 1	AAGCGGCGCGCGCTAGCGGCG
SEQ ID N° 2	AAGGAAGAGGGCGCGGAGAAG
SEQ ID N° 3	AAGAGGCGCGGGAGAAGATGC
SEQ ID N° 4	AAGATGCTGGCCGCCAAGAGC
SEQ ID N° 5	AAGAGCGCGGACGGCTCGGCG
SEQ ID N° 6	AACATCACGCTGCTCAACGGC
SEQ ID N° 7	AAGGAGGCAGGCTCGCCGGGG
SEQ ID N° 8	AAATCGGGCGGGCGACTACGCC
SEQ ID N° 9	AATCGGGCGGGCGACTACGCCT
SEQ ID N° 10	AAGCTCTGGATCGAGCTGCTC
SEQ ID N° 11	AAGCCGCTCTTCCCCACCTGC
SEQ ID N° 12	AAGCTCGTGGCCTGCCTCTGC
SEQ ID N° 13	AACTGCTACAGCGTGAAGGCC
SEQ ID N° 14	AAGGCCGCCACCCGGGTCCAG
SEQ ID N° 15	AAGCTCCTGGCCCTGGCCCTG
SEQ ID N° 16	AAGGGTGATGTGTCCAATCTA
SEQ ID N° 17	AATCTAGATCCCAACTTCTCA
SEQ ID N° 18	AACTTCTCATTGGAAGGCACC

SEQ ID N° 19	AAGGCACCAAACCTGGATGTGG
SEQ ID N° 20	AAACTGGATGTGGGGAACATT
SEQ ID N° 21	AACTGGATGTGGGGAACATTG
SEQ ID N° 22	AACATTGTGCTGGCATTATAC
SEQ ID N° 23	AATTACTTGAATTTTCGTCACA
SEQ ID N° 24	AATTTTCGTCACAGAGGAAATG
SEQ ID N° 25	AAATGATCAACCCCTACAGAA
SEQ ID N° 26	AATGATCAACCCCTACAGAAA
SEQ ID N° 27	AACCCCTACAGAAACCTGCCC
SEQ ID N° 28	AAACCTGCCCTGGCCATCAT
SEQ ID N° 29	AACCTGCCCTGGCCATCATC
SEQ ID N° 30	AACCTGGCCTACTTCACCACC
SEQ ID N° 31	AACTATCACCTGGGCGTCATG
SEQ ID N° 32	AATGGGTCCCTGTTACATCC
SEQ ID N° 33	AAGGCCACCTGCCCTCCATCC
SEQ ID N° 34	AAGGACATCTTCTCCGTCATC
SEQ ID N° 35	AACTTCTTCAGCTTCTTCAAC
SEQ ID N° 36	AACTGGCTCTGCGTGGCCCTG
SEQ ID N° 37	AAAGCCTGAGCTTGAGCGGCC
SEQ ID N° 38	AAGCCTGAGCTTGAGCGGCC
SEQ ID N° 39	AAGGTGAACCTGGCCCTGCCT
SEQ ID N° 40	AACCTGGCCCTGCCTGTGTTC
SEQ ID N° 41	AAGACACCCGTGGAGTGTGGC
SEQ ID N° 42	AAAAACAAGCCCAAGTGGCTC
SEQ ID N° 43	AAACAAGCCCAAGTGGCTCCT
SEQ ID N° 44	AACAAGCCCAAGTGGCTCCTC
SEQ ID N° 45	AAGCCCAAGTGGCTCCTCCAG
SEQ ID N° 46	AAGTGGCTCCTCCAGGGCATC
SEQ ID N° 47	AAGCTCATGCAGGTGGTCCCC
SEQ ID N° 48	GGCGCCGGCGGCCGAGGAGAA
SEQ ID N° 49	CCGGCGGCCGAGGAGAAGGAA
SEQ ID N° 50	GGAGAAGATGCTGGCCGCCAA
SEQ ID N° 51	GAAGGAAGAGGCCGCGGAGAA
SEQ ID N° 52	GGAGAAGATGCTGGCCGCCAA
SEQ ID N° 53	GGGCGTGACCCTGCAGCGGAA
SEQ ID N° 54	GACGCCACGCGGTGCTCAA
SEQ ID N° 55	GCTCGGCACCACCATCTCCAA
SEQ ID N° 56	CTCGGCACCACCATCTCCAAA
SEQ ID N° 57	CTCGCTGCCCGCCTTCCTCAA
SEQ ID N° 58	CTTCGCCACCTACCTGCTCAA
SEQ ID N° 59	GGTGCCCGAGGAGGCAGCCAA
SEQ ID N° 60	GCTGCTGCTCACGGCCGTGAA
SEQ ID N° 61	CGTGAAGTGTACAGCGTGAA
SEQ ID N° 62	GGATGCCTTTGCCCGCCGCCAA
SEQ ID N° 63	GGGCTTCGTCCAGATCGGGAA

SEQ ID N° 64	CGGGAAGGGTGATGTGTCCAA
SEQ ID N° 65	TGTGTCCAATCTAGATCCCAA
SEQ ID N° 66	GATCCCAACTTCTCATTGAA
SEQ ID N° 67	CTTCTCATTGGAAGGCACCAA
SEQ ID N° 68	TTCTCATTGGAAGGCACAAA
SEQ ID N° 69	ACCAAAGTGGATGTGGGGAA
SEQ ID N° 70	CTTTGCCTATGGAGGATGGAA
SEQ ID N° 71	TGGAGGATGGAATFACTTGAA
SEQ ID N° 72	TGAATTTTCGTACAGAGGAAA
SEQ ID N° 73	CGTCACAGAGGAAATGATCAA
SEQ ID N° 74	AAATGATCAACCCCTACAGAA
SEQ ID N° 75	AATGATCAACCCCTACAGAAA
SEQ ID N° 76	GCTGGTGTACGTGCTGACCAA
SEQ ID N° 77	CGTGGCCGTGGACTTCGGGAA
SEQ ID N° 78	GTCCTGCTTCGGCTCCGTCAA
SEQ ID N° 79	TTCTTCGTGGGGTCCCGGGAA
SEQ ID N° 80	GCTGCTCTACGCCTTCTCCAA
SEQ ID N° 81	GGACATCTTCTCCGTATCAA
SEQ ID N° 82	CAACTTCTTCAGCTTCTTCAA
SEQ ID N° 83	TGATCTGGCTGCGCCACAGAA
SEQ ID N° 84	GATCTGGCTGCGCCACAGAAA
SEQ ID N° 85	TGAGCTTGAGCGGCCATCAA
SEQ ID N° 86	TGAGCGGCCATCAAGGTGAA
SEQ ID N° 87	GATCGCCGTCTCCTTCTGGAA
SEQ ID N° 88	CTTCTTCGGGGTCTGGTGGAA
SEQ ID N° 89	TTCTTCGGGGTCTGGTGGAAA
SEQ ID N° 90	TCTTCGGGGTCTGGTGGAAAA
SEQ ID N° 91	CTTCGGGGTCTGGTGGAAAAA
SEQ ID N° 92	CGGGGTCTGGTGGAAAAACAA
SEQ ID N° 93	CTGGTGGAAAAACAAGCCCAA
SEQ ID N° 94	CACGACCGTCTGTGTCAGAA
SEQ ID N° 95	AAGATGCTGGCCGCCAAGAGC
SEQ ID N° 96	AACATCACGCTGCTCAACGGC
SEQ ID N° 97	AAGCTCTGGATCGAGCTGCTC
SEQ ID N° 98	AACTGCTACAGCGTGAAGGCC
SEQ ID N° 99	AACATTGTGCTGGCATTATAC
SEQ ID N° 100	AAGGACATCTTCTCCGTATC
SEQ ID N° 101	CTTCGCCACCTACCTGCTCAA
SEQ ID N° 102	GGACATCTTCTCCGTATCAA
SEQ ID N° 103	TGATCTGGCTGCGCCACAGAA
SEQ ID N° 104	GATCGCCGTCTCCTTCTGGAA

A especificidade do gene de ASCT2 foi confirmada pesquisando a base de dados NCBI BlastN. Os ARNsi foram sintetizados quimicamente.

A totalidade dos quarenta e dois dúplexes de ARNsi purificados foram complexados com lipofectamina e adicionados às células durante 12 h em meio isento de soro. Posteriormente, as células foram cultivadas durante 72-96 h em meio suplementado com soro, que foi substituído por meio isento de soro 24 horas antes das experiências. Um duplex de ARNsi negativo desordenado foi utilizado como controle.

O LAT1-ARNsi é direcionado a uma sequência gênica de LAT1 de alvo único. Alternativamente, o ARNsi é direcionado a sequências de genes LAT1 de alvo múltiplo. Por exemplo, a composição contém LAT1-ARNsi dirigido a duas, três, quatro cinco ou mais sequências alvo de LAT1. Por sequência alvo de LAT1 é entendida uma sequência de nucleótidos que é idêntica a uma porção do gene LAT1. A sequência alvo pode incluir a região não traduzida (UT) 5', a grelha de leitura aberta (ORF) ou a região não traduzida a 3' do gene de LAT1 humano. Alternativamente, o ARNsi é uma sequência de ácido nucleico complementar a um modulador a montante ou a jusante da expressão do gene LAT1. Exemplos de moduladores do montante e a jusante incluem, um fator de transcrição que liga ao promotor do gene LAT1, uma quinase ou fosfatase que interatua com o polipéptido LAT1, um potenciador ou promotor de LAT1.

LAT1-ARNsi que hibridam com ARNm alvo diminuem ou inibem a produção do produto polipeptídico de LAT1 codificado pelo gene LAT1 através de associação com o transcrito de ARNm normalmente de cadeia simples, interferindo deste modo com a tradução e, assim, a expressão da proteína. Sequências de ácido nucleico exemplares para a produção de LAT1-ARNsi incluem as sequências de nucleótidos 145-165 (SEQ ID N° 4), 217-237 (SEQ ID N° 6), 466-486 (SEQ ID N° 10), 628-648 (SEQ ID N° 13), 796-816 (SEQ ID N° 22), 1243-1263 (SEQ ID N° 34), 525-545 (SEQ ID N° 58), 624-644 (SEQ ID N° 61), 1245-1265 (SEQ ID N° 81), 1316-1336 (SEQ

ID N° 83), 1410-1430 (SEQ ID N° 87), 147-165 (SEQ ID N° 95), 219-237 (SEQ ID N° 96), 468-486 (SEQ ID N° 97), 630-648 (SEQ ID N° 98), 798-816 (SEQ ID N° 99), 1247-1263 (SEQ ID N° 100), 527-545 (SEQ ID N° 101), 1247-1265 (SEQ ID N° 102), 1318-1336 (SEQ ID N° 103), 1412-1430 (SEQ ID N° 104) como a sequência alvo. Numa forma de realização adicional, de modo a melhorar a atividade de inibição do ARNsi, pode ser adicionado nucleótido "u" à extremidade 3' da cadeia *antisense* da sequência alvo. São adicionados preferentemente pelo menos 2, mais preferentemente 2 a 10, e ainda mais preferentemente de 2 a 5 u. Os u adicionados formam a cadeia única na extremidade 3' da cadeia *antisense* do ARNsi.

O LAT1-ARNsi pode ser diretamente introduzido nas células de uma forma que é capaz de ligar aos transcritos de ARNm. Alternativamente, pode ser introduzido nas células um vetor codificando o LAT1-ARNsi.

Uma sequência de ansa consistindo em uma sequência de nucleótidos arbitrária pode estar localizada entre a sequência *sense* e a *antisense*. Consequentemente, a presente invenção também proporciona ARNsi tendo a fórmula geral 5'-[A]-[B]-[A']-3', em que [A] é uma sequência de ribonucleótidos correspondendo a uma sequência alvo do gene LAT1. Preferentemente [A] é uma sequência selecionada a partir do grupo consistindo nos nucleótidos 145-165 (SEQ ID N° 4), 217-237 (SEQ ID N° 6), 466-486 (SEQ ID N° 10), 628-648 (SEQ ID N° 13), 796-816 (SEQ ID N° 22), 1243-1263 (SEQ ID N° 34), 525-545 (SEQ ID N° 58), 624-644 (SEQ ID N° 61), 1245-1265 (SEQ ID N° 81), 1316-1336 (SEQ ID N° 83), 1410-1430 (SEQ ID N° 87), 147-165 (SEQ ID N° 95), 219-237 (SEQ ID N° 96), 468-486 (SEQ ID N° 97), 630-648 (SEQ ID N° 98), 798-816 (SEQ ID N° 99), 1247-1263 (SEQ ID N° 100), 527-545 (SEQ ID N° 101), 1247-1265 (SEQ ID N° 102), 1318-1336 (SEQ ID N° 103), 1412-1430 (SEQ ID N° 104), [B] é uma sequência de ribonucleótidos consistindo em 3 to 23 nucleótidos; e [A'] é uma sequência de ribonucleótidos consistindo na sequência complementar de [A]. A região [A]

hibridiza com [A'], e posteriormente é formada uma ansa consistindo na região [B]. A sequência em ansa pode ser preferentemente de 3 a 23 nucleótidos de comprimento. São descritas sequências de ansa adequadas em http://www.ambion.com/techlib/tb/tb_506.html. Além disso, sequência de ansa consistindo em 23 nucleótidos também proporciona ARNsi ativo (Jacque *et al.*, 2002). Sequências de ansa preferidas incluem:

AUG: (Sui *et al.*, 2002).

CCC, CCACC ou CCACACC: (Paul *et al.*, 2002).

UUCG: (Lee *et al.*, 2002).

CTCGAG ou AAGCUU : (Biology, 2003).

UUCAAGAGA: (Yu *et al.*, 2002).

A sequência de ansa pode ser selecionada a partir do grupo consistindo em AUG, CCC, UUCG, CCACC, CTCGAG, AAGCUU, CCACACC, e UUCAAGAGA. Preferentemente a sequência de ansa é UUCAAGAGA ("ttcaagaga" em ADN).

Num aspeto adicional da invenção, o comprimento do ácido nucleico *sense* é pelo menos de 10 nucleótidos e pode ser tão longo quanto o transcrito de ASCT2 de ocorrência natural. Preferentemente, o ácido nucleico *sense* tem menos de 75, 50, ou 25 nucleótidos de comprimento. É adicionalmente preferido que o ácido nucleico *sense* compreenda pelo menos 19 nucleótidos. Mais preferentemente, o ácido nucleico *sense* tem 19-25 nucleótidos de comprimento. Exemplos de ácidos nucleicos *sense* de ARNsi de ASCT2 da presente invenção que inibem a expressão de ASCT2 em células de mamíferos incluem oligonucleótidos compreendendo qualquer uma das seguintes sequências alvo do gene ASCT2: nucleótidos 300-320 (SEQ ID N° 209), 452-472 (SEQ ID N° 216), 773-793 (SEQ ID N° 225), 776-796 (SEQ ID N° 226), 830-850 (SEQ ID N° 228), 1122-1142 (SEQ ID N° 235), 1123-1143 (SEQ ID N° 236), 1124-1144 (SEQ ID N° 237), 1150-1170 (SEQ ID N° 238), 769-789 (SEQ ID N° 260), 994-1014 (SEQ ID N° 264), 1066-1086 (SEQ ID N° 267), 1131-1151 (SEQ ID N° 271), 1154-1174 (SEQ ID N° 272), 1264-1284 (SEQ ID N° 278),

1268-1288 (SEQ ID N° 279), 302-320 (SEQ ID N° 281), 454-472 (SEQ ID N° 282), 775-793 (SEQ ID N° 283), 778-796 (SEQ ID N° 284), 832-850 (SEQ ID N° 285), 1124-1142 (SEQ ID N° 286), 1125-1143 (SEQ ID N° 287), 1126-1144 (SEQ ID N° 288), 1152-1170 (SEQ ID N° 289), 771-789 (SEQ ID N° 291), 996-1014 (SEQ ID N° 292), 1068-1086 (SEQ ID N° 293), 1133-1151 (SEQ ID N° 294), 1156-1174 (SEQ ID N° 295), 1266-1284 (SEQ ID N° 296), 1270-1288 (SEQ ID N° 297).

Foram geradas oitenta e nove sequências, que representam a sequência para uma cadeia da dupla cadeia é ARN, para ASCT2. Estas incluíram as seguintes sequências nucleotídicas:

SEQ ID N° 209	AAGAGAGGAATATCACCGGAA
SEQ ID N° 210	AATATCACCGGAACCAGGGTG
SEQ ID N° 211	AACCAGGGTGAAGGTGCCCGT
SEQ ID N° 212	AAGGTGCCCGTGGGGCAGGAG
SEQ ID N° 213	AACATCCTGGGCTTGGTAGTG
SEQ ID N° 214	AAGCTGGGGCCTGAAGGGGAG
SEQ ID N° 215	AAGGGGAGCTGCTTATCCGCT
SEQ ID N° 216	AACTCCTTCAATGAGGCCACC
SEQ ID N° 217	AATGAGGCCACCATGGTTCTG
SEQ ID N° 218	AAGATCGTGGAGATGGAGGAT
SEQ ID N° 219	AAGTACATTCTGTGCTGCCTG
SEQ ID N° 220	AAAAACCCCTACCGCTTCCTG
SEQ ID N° 221	AAAACCCCTACCGCTTCCTGT
SEQ ID N° 222	AAACCCCTACCGCTTCCTGTG
SEQ ID N° 223	AACCCCTACCGCTTCCTGTGG
SEQ ID N° 224	AAGTGCGTGGAGGAGAATAAT
SEQ ID N° 225	AATAATGGCGTGGCCAAGCAC
SEQ ID N° 226	AATGGCGTGGCCAAGCACATC
SEQ ID N° 227	AAGCACATCAGCCGTTTCATC
SEQ ID N° 228	AACATGGACGGTGCCGCGCTC
SEQ ID N° 229	AAAGATCATCACCATCCTGGT
SEQ ID N° 230	AAGATCATCACCATCCTGGTC

SEQ ID N° 231	AAGCAGTCAACCTCCCGGTCCG
SEQ ID N° 232	AACCTCCCGGTCCGACCATATC
SEQ ID N° 233	AATGTAGAAGGTGACGCTCTG
SEQ ID N° 234	AAGGTGACGCTCTGGGGGCAG
SEQ ID N° 235	AAAATTACGTGGACCGTACGG
SEQ ID N° 236	AAATTACGTGGACCGTACGGA
SEQ ID N° 237	AATTACGTGGACCGTACGGAG
SEQ ID N° 238	AAGCACAGAGCCTGAGTTGAT
SEQ ID N° 239	AAGTGAAGAGTGAGCTGCCCC
SEQ ID N° 240	AAGAGTGAGCTGCCCCCTGGAT
SEQ ID N° 241	AAGGAAACCCCTCCTCAAAC
SEQ ID N° 242	AAACCCCTCCTCAAACACTA
SEQ ID N° 243	AAACACTATCGGGGGCCCGCA
SEQ ID N° 244	AACACTATCGGGGGCCCGCAG
SEQ ID N° 245	AAGAGAGGAATATCACCGGAA
SEQ ID N° 246	TATCACCGGAACCAGGGTGAA
SEQ ID N° 247	GCAGGAGGTGGAGGGGATGAA
SEQ ID N° 248	CTTTGGTGTGGCGCTGCGGAA
SEQ ID N° 249	CTGCGGAAGCTGGGGCCTGAA
SEQ ID N° 250	GCTGCTTATCCGCTTCTTCAA
SEQ ID N° 251	CCGCTTCTTCAACTCCTTCAA
SEQ ID N° 252	CATGTTCCCTGGTGGCTGGCAA
SEQ ID N° 253	ACTCTTTGCCCGCCTTGGCAA
SEQ ID N° 254	CTACTTCCTCTTCAACCGCAA
SEQ ID N° 255	TACTTCCTCTTCAACCGCAAA
SEQ ID N° 256	CTTCCTCTTCAACCGCAAAAA
SEQ ID N° 257	CACGCTGCCGCTGATGATGAA
SEQ ID N° 258	GATGAAGTGCCTGGAGGAGAA
SEQ ID N° 259	GAAGTGCCTGGAGGAGAATAA
SEQ ID N° 260	GGAGAATAATGGCGTGGCCAA
SEQ ID N° 261	GCCCATCGGGCCACCGTCAA
SEQ ID N° 262	GCAGTCCTTGGACTTCGTAAA
SEQ ID N° 263	AGCAGTCCTTGGACTTCGTAA
SEQ ID N° 264	CATCATCCTCGAAGCAGTCAA
SEQ ID N° 265	ACTCTGGCCATCATCCTCGAA
SEQ ID N° 266	TGTACCGTCCTCAATGTAGAA
SEQ ID N° 267	CCGGTCCTGTACCGTCCTCAA
SEQ ID N° 268	GGGGGCAGGACTCCTCCAAAA
SEQ ID N° 269	TGGGGGCAGGACTCCTCCAAA
SEQ ID N° 270	CTGGGGGCAGGACTCCTCCAA
SEQ ID N° 271	TGGACCGTACGGAGTCGAGAA
SEQ ID N° 272	ACAGAGCCTGAGTTGATACAA
SEQ ID N° 273	GCCTGAGTTGATACAAGTGAA
SEQ ID N° 274	CTGCCAGTCCCCACTGAGGAA
SEQ ID N° 275	CAGTCCCCACTGAGGAAGGAA

```

SEQ ID N° 276      GGAAGGAAACCCCCTCCTCAA
SEQ ID N° 277      GAAGGAAACCCCCTCCTCAA
SEQ ID N° 278      TGCCACGGTCGCCTCTGAGAA
SEQ ID N° 279      ACGGTCGCCTCTGAGAAGGAA
SEQ ID N° 280      GAGAAGGAATCAGTCATGTAA
SEQ ID N° 281      GAGAGGAATATCACCGGAA
SEQ ID N° 282      GCTGGGGCCTGAAGGGGAG
SEQ ID N° 283      TAATGGCGTGGCCAAGCAC
SEQ ID N° 284      TGGCGTGGCCAAGCACATC
SEQ ID N° 285      CATGGACGGTGCCGCGCTC
SEQ ID N° 286      AATTACGTGGACCGTACGG
SEQ ID N° 287      ATTACGTGGACCGTACGGA
SEQ ID N° 288      TTACGTGGACCGTACGGAG
SEQ ID N° 289      GCACAGAGCCTGAGTTGAT
SEQ ID N° 290      GAGAGGAATATCACCGGAA
SEQ ID N° 291      AGAATAATGGCGTGGCCAA
SEQ ID N° 292      TCATCCTCGAAGCAGTCAA
SEQ ID N° 293      GGTCCCTGTACCGTCCTCAA
SEQ ID N° 294      GACCGTACGGAGTCGAGAA
SEQ ID N° 295      AGAGCCTGAGTTGATACAA
SEQ ID N° 296      CCACGGTCGCCTCTGAGAA
SEQ ID N° 297      GGTCGCCTCTGAGAAGGAA

```

A especificidade do gene de ASCT2 foi confirmada pesquisando a base de dados NCBI BlastN. Os ARNsi foram sintetizados quimicamente.

A totalidade dos quarenta e dois dúplexes de ARNsi purificados foram complexados com lipofectamina e adicionados às células durante 12 h em meio isento de soro. Posteriormente, as células foram cultivadas durante 72-96 h em meio suplementado com soro, que foi substituído por meio isento de soro 24 horas antes das experiências. Foi utilizado um duplex de ARNsi negativo desordenado como controle.

O ASCT2-ARNsi é direcionado a uma sequência gênica de ASCT2 de alvo único. Alternativamente, o ARNsi é direcionado a sequências de genes ASCT2 de alvo múltiplo. Por exemplo, a composição contém ASCT2-ARNsi dirigido a duas, três, quatro cinco ou mais sequências alvo de ASCT2. Por sequência alvo de ASCT2 entende-se uma sequência de nucleótidos que é idêntica

a uma porção do gene ASCT2. A sequência alvo pode incluir a região não traduzida (UT) 5', a grelha de leitura aberta (ORF) ou a região não traduzida a 3' do gene de ASCT2 humano. Alternativamente, o ARNsi é uma sequência de ácido nucleico complementar a um modulador a montante ou a jusante da expressão do gene ASCT2. Exemplos de moduladores do montante e a jusante incluem, um fator de transcrição que liga ao promotor do gene ASCT2, uma quinase ou fosfatase que interatua com o polipéptido ASCT2, um potenciador ou promotor de ASCT2.

ASCT2-ARNsi que hibridam com ARNm alvo diminuem ou inibem a produção do produto polipeptídico de ASCT2 codificado pelo gene ASCT2 através de associação com o transcrito de ARNm normalmente de cadeia simples, interferindo deste modo com a tradução e, assim, a expressão da proteína. Sequências de ácido nucleico exemplares para a produção de ASCT2-ARNsi incluem as sequências de nucleótidos 300-320 (SEQ ID N° 209), 452-472 (SEQ ID N° 216), 773-793 (SEQ ID N° 225), 776-796 (SEQ ID N° 226), 830-850 (SEQ ID N° 228), 1122-1142 (SEQ ID N° 235), 1123-1143 (SEQ ID N° 236), 1124-1144 (SEQ ID N° 237), 1150-1170 (SEQ ID N° 238), 769-789 (SEQ ID N° 260), 994-1014 (SEQ ID N° 264), 1066-1086 (SEQ ID N° 267), 1131-1151 (SEQ ID N° 271), 1154-1174 (SEQ ID N° 272), 1264-1284 (SEQ ID N° 278), 1268-1288 (SEQ ID N° 279), 302-320 (SEQ ID N° 281), 454-472 (SEQ ID N° 282), 775-793 (SEQ ID N° 283), 778-796 (SEQ ID N° 284), 832-850 (SEQ ID N° 285), 1124-1142 (SEQ ID N° 286), 1125-1143 (SEQ ID N° 287), 1126-1144 (SEQ ID N° 288), 1152-1170 (SEQ ID N° 289), 771-789 (SEQ ID N° 291), 996-1014 (SEQ ID N° 292), 1068-1086 (SEQ ID N° 293), 1133-1151 (SEQ ID N° 294), 1156-1174 (SEQ ID N° 295), 1266-1284 (SEQ ID N° 296), 1270-1288 (SEQ ID N° 297) como a sequência alvo. Além disso, de forma a potenciar a atividade de inibição do ARNsi, pode ser adicionado nucleótido "u" à extremidade 3' da cadeia antisense da sequência alvo. Preferentemente pelo menos 2, mais preferentemente 2 a 10, e o mais preferentemente de 2 a 5 u são adicionados. Os u adicionados formam a cadeia única na extremidade 3' da cadeia

antisense do ARNsi.

O ASCT2-ARNsi pode ser diretamente introduzido nas células de uma forma que é capaz de ligar aos transcritos de ARNm. Alternativamente, pode ser introduzido nas células um vetor codificando o ASCT2-ARNsi.

Uma sequência de ansa consistindo em uma sequência de nucleótidos arbitrária pode estar localizada entre a sequência *sense* e a *antisense*. Conseqüentemente, a presente invenção também proporciona ARNsi tendo a fórmula geral 5'-[A]-[B]-[A']-3', em que [A] é uma sequência de ribonucleótidos que corresponde a uma sequência alvo do gene de ASCT2. Preferentemente [A] é uma sequência selecionada a partir do grupo consistindo nos nucleótidos 300-320 (SEQ ID N° 209), 452-472 (SEQ ID N° 216), 773-793 (SEQ ID N° 225), 776-796 (SEQ ID N° 226), 830-850 (SEQ ID N° 228), 1122-1142 (SEQ ID N° 235), 1123-1143 (SEQ ID N° 236), 1124-1144 (SEQ ID N° 237), 1150-1170 (SEQ ID N° 238), 769-789 (SEQ ID N° 260), 994-1014 (SEQ ID N° 264), 1066-1086 (SEQ ID N° 267), 1131-1151 (SEQ ID N° 271), 1154-1174 (SEQ ID N° 272), 1264-1284 (SEQ ID N° 278), 1268-1288 (SEQ ID N° 279), 302-320 (SEQ ID N° 281), 454-472 (SEQ ID N° 282), 775-793 (SEQ ID N° 283), 778-796 (SEQ ID N° 284), 832-850 (SEQ ID N° 285), 1124-1142 (SEQ ID N° 286), 1125-1143 (SEQ ID N° 287), 1126-1144 (SEQ ID N° 288), 1152-1170 (SEQ ID N° 289), 771-789 (SEQ ID N° 291), 996-1014 (SEQ ID N° 292), 1068-1086 (SEQ ID N° 293), 1133-1151 (SEQ ID N° 294), 1156-1174 (SEQ ID N° 295), 1266-1284 (SEQ ID N° 296), 1270-1288 (SEQ ID N° 297), [B] é uma sequência de ribonucleótidos consistindo em 3 a 23 nucleótidos; e [A'] é uma sequência de ribonucleótidos consistindo na sequência complementar de [A]. A região [A] hibridiza com [A'], e posteriormente é formada uma ansa consistindo na região [B]. A sequência em ansa pode ser preferentemente de 3 a 23 nucleótidos de comprimento. São descritas sequências de ansa adequadas em http://www.ambion.com/techlib/tb/tb_506.html. Além disso, sequência de ansa consistindo em 23 nucleótidos também

proporciona ARNsi ativo (Jacque et al., 2002). Sequências de ansa preferidas incluem:

AUG: (Sui et al., 2002).

CCC, CCACC ou CCACACC: (Paul et al., 2002).

UUCG: (Lee et al., 2002).

CTCGAG ou AAGCUU : (Biology, 2003).

UUCAAGAGA: (Yu et al., 2002).

A sequência de ansa pode ser selecionada a partir do grupo consistindo em AUG, CCC, UUCG, CCACC, CTCGAG, AAGCUU, CCACACC, e UUCAAGAGA. Preferentemente a sequência de ansa é UUCAAGAGA ("ttcaagaga" em ADN).

Os inventores constataram surpreendentemente, que os ARNsi direcionados para certas sequências alvo do gene LAT1 ou gene ASCT2 são particularmente eficazes na inibição da absorção de [¹⁴C]-L-leucina independente de sódio ou absorção de [¹⁴C]-L-alanina dependente de sódio, respectivamente, expressão de LAT1 ou ASCT2, crescimento celular e crescimento de tumores com sobreexpressão de transportadores de LAT1 e/ou ASCT2.

Numa forma de realização específica da presente invenção, a cadeia *sense* do ARNsi de LAT1 utilizada na presente invenção compreende ou consiste em pelo menos uma sequência selecionada a partir do grupo compreendendo a SEQ ID N° 6, N° 22, N° 34, N° 58 e N° 61. O ARNsi compreende também uma cadeia *antisense* correspondente. A utilização de um tal ARNsi foi verificada que é ser particularmente eficaz na inibição de transporte de [¹⁴C]-L-leucina independente de sódio. Numa forma de realização adicional, a cadeia *sense* do ARNsi de LAT1 compreende ou consiste em pelo menos uma sequência selecionada a partir do grupo compreendendo a SEQ ID NO: 110, 126, 138, 162 e 165.

De acordo com outro aspeto da presente invenção é proporcionado um ARNsi compreendendo um ácido nucleico LAT1 *sense* e um ácido nucleico LAT1 *antisense* e o ácido nucleico LAT1 *sense* é substancialmente idêntico a uma sequência alvo contida dentro do ARNm de LAT1 e o ácido nucleico de LAT1

antisense é complementar com o ácido nucleico de LAT1 *sense*. Os ácidos nucleicos *sense* e *antisense* hibridizam entre si para formar uma molécula de cadeia dupla.

As moléculas de ARNsi da presente invenção têm a propriedade de inibir a expressão do gene LAT1 quando é introduzido numa célula que expressa o dito gene.

As moléculas de ARNsi da presente invenção têm a propriedade de inibir o crescimento celular quando são introduzidas numa célula que expressa o gene LAT1.

As moléculas de ARNsi da presente invenção têm a propriedade de inibir o crescimento tumoral quando são introduzidas num tumor que expressa o gene LAT1.

Numa forma de realização específica da presente invenção, a cadeia *sense* do ARNsi de ASCT2 utilizada na presente invenção compreende ou consiste em pelo menos uma sequência selecionada a partir do grupo compreendendo a SEQ ID N° 225, N° 237, N° 267 e N° 278. O ARNsi compreende também uma cadeia *antisense* correspondente. A utilização de um tal ARNsi foi verificada que é ser particularmente eficaz na inibição de transporte de [¹⁴C]-L-leucina independente de sódio. Numa forma de realização adicional, a cadeia *sense* do ARNsi de LAT1 compreende ou consiste em pelo menos uma sequência selecionada a partir do grupo compreendendo 314 326, 356 e 367.

De acordo com um outro aspeto da presente invenção é proporcionado um ARNsi compreendendo um ácido nucleico ASCT2 *sense* e um ácido nucleico ASCT2 *antisense* e o ácido nucleico ASCT2 *sense* é substancialmente idêntico a uma sequência alvo contida dentro do ARNm de ASCT2 e o ácido nucleico de ASCT2 *antisense* é complementar com o ácido nucleico de ASCT2 *sense*. Os ácidos nucleicos *sense* e *antisense* hibridizam entre si para formar uma molécula de cadeia dupla.

As moléculas de ARNsi da presente invenção têm a propriedade de inibir a expressão do gene ASCT2 quando é introduzido numa célula que expressa o dito gene.

As moléculas de ARNsi da presente invenção têm a propriedade

de inibir o crescimento celular quando são introduzidas numa célula que expressa o gene ASCT2.

As moléculas de ARNsi da presente invenção têm a propriedade de inibir o crescimento tumoral quando são introduzidas num tumor que expressa o gene ASCT2.

Quando se combina o ARNsi de LAT1 e o ARNsi de ASCT2 da presente invenção têm a propriedade de inibir a expressão dos genes de LAT1 e ASCT2 quando são introduzidos numa célula que expressa o dito gene.

Quando se combina as moléculas de ARNsi de LAT1 e ARNsi de ASCT2 da presente invenção têm a propriedade de inibir o crescimento celular quando introduzidas numa célula que expressa os genes LAT1 e ASCT2.

Quando se combina as moléculas de ARNsi de LAT1 e ARNsi de ASCT2 da presente invenção têm a propriedade de inibir o crescimento tumoral quando são introduzidas num tumor que expressa os genes LAT1 e ASCT2.

Outro aspeto da invenção refere-se a sequências de ácidos nucleicos e vetores que codificam o ARNsi de acordo com o quarto aspeto da presente invenção, bem como a composições compreendendo-o, úteis, por exemplo, nos métodos da presente invenção. As composições da presente invenção podem compreender, adicionalmente, agentes de aumento de transfeção. A sequência de ácido nucleico pode ser operativamente ligada a um promotor induzível ou regulável. Os vetores apropriados são discutidos acima. Preferentemente, o vetor é um vetor viral adeno-associado.

A composição da presente invenção pode compreender adicionalmente um agente farmacêutico para o tratamento de cancro, em que o agente é diferente do ARNsi. Preferentemente o agente farmacêutico é selecionado a partir do grupo consistindo em abarelix, amifostina, aminoglutetimida, anastrozol, bevacizumab, bicalutamida, bleomicina, bortezomib, bussulfano, capecitabina, carboplatina, carmustina, cetuximab, clorambucilo, cisplatina, cladribina,

ciclofosfamida, citarabina, dacarbazina dactinomicina, daunorubicina, docetaxel, doxorubicina, erlotinib, 4'-epidoxorrubicina, epirubicina, estramustina, etopósido, floxuridina, fludarabina, 5-fluorouracilo, flutamida, gefitinib, gencitabina, goserelin, hexametilmelamina, hidroxiiureia, ifosfamida, imatinib, irinotecano, leuprólido, megestrol, melfalano, 6-mercaptopurina, metotrexato mitomicina, mitotano, mitoxantrona, oxaliplatina, paclitaxel, pentostatina, prednisona, procarbazona, rituximab, satraplatina, tamoxifeno, temozolomida, tenipósido, 6-tioguanina, tiotepa, topotecano, toremifen, trastuzumab, triptorelina, valrubicina, vinblastina, vincristina e vinorelbina.

Sistemas de administração não virais de ARNs_i envolvem a criação de reagentes de transfeção de ácidos nucleicos. Os reagentes de transfeção de ácidos nucleicos têm duas propriedades básicas. Em primeiro lugar, devem interagir de alguma forma com a carga de ácido nucleico. Muito frequentemente isto envolve forças eletrostáticas, que permitem a formação de complexos de ácido nucleico. A formação de um complexo garante que os reagentes de transfeção e ácidos nucleicos sejam apresentados simultaneamente à membrana celular. Os complexos podem ser divididos em três classes, com base na natureza do reagente de administração: lipoplexos; poliplexos; e lipopoliplexos. Os lipoplexos são formados através da interação de ácidos nucleicos aniônicos com lípidos catiónicos, os poliplexos através da interação com polímeros catiónicos. Os reagentes lipopoliplexos podem combinar a ação de lípidos catiónicos e polímeros para administrar ácidos nucleicos. A adição de histona, poli-L-lisina e protamina a algumas formulações de lípidos catiónicos resulta em níveis de administração que são mais elevados do que quer lípidos quer polímeros por si só. As formulações combinadas também podem ser menos tóxicas. Os sistemas biocompatíveis mais relevantes para esta finalidade são nanocápsulas biodegradáveis não virais

concebidas especialmente de acordo com a físico-química de ácidos nucleicos. Têm um núcleo aquoso rodeado por um envelope polimérico biodegradável, que proporciona proteção e transporte do ARNsi para o citosol e permite que o ARNsi funcione de forma eficiente *in vivo*.

A presente invenção também proporciona uma célula contendo o ARNsi de acordo com o quarto aspeto da presente invenção ou o vetor da presente invenção. Preferentemente a célula é uma célula de mamífero, mais preferentemente uma célula humana. É adicionalmente preferido que a célula seja uma célula isolada.

Enquanto a descrição anterior proporciona uma descrição geral do assunto abrangido dentro do âmbito da presente invenção, incluindo métodos, bem como o melhor modo do mesmo, de preparar e utilizar esta invenção, são proporcionados os seguintes exemplos para permitir adicionalmente que os peritos na especialidade pratiquem a presente invenção e para proporcionar uma descrição completa por escrito da mesma. Contudo, os peritos na especialidade apreciarão que as especificidades destes exemplos não devem ser lidas como limitativas da invenção, cujo âmbito deve ser apreendido a partir das reivindicações e equivalentes das mesmas anexos a esta divulgação. Vários aspetos adicionais e formas de realização da presente invenção serão evidentes para os peritos na especialidade em vista da presente revelação.

Todos os documentos citados na presente memória descritiva, incluindo a referência a identificadores de base de dados de sequências, são incorporados no presente documento como referência na sua totalidade. A menos que seja especificado de outro modo, quando é feita referência aos identificadores de base de dados de sequências, o número de versão é o 1.

"e/ou" quando utilizados no presente documento são para ser tomados com divulgação específica de cada uma das características especificadas ou componentes com ou se o outro. Por exemplo, "A e/ou B" é para ser tomado como divulgação específico de cada um dos (i) A, (ii) B e (iii) A e B, tal como

se cada um fosse definido individualmente no presente documento.

A menos que o contexto dite de outra forma, as descrições e definições das características acima expostas não estão limitadas a qualquer aspeto particular ou forma de realização da invenção e aplicam igualmente a todos os aspetos e formas de realização que são descritos. A invenção é ainda descrita nos seguintes exemplos não limitativos.

Os exemplos a seguir ilustram a presente invenção em detalhe, mas não são para serem interpretados como limitativos do âmbito da mesma.

Descrição dos desenhos

Figura 1. (A) O anticorpo criado contra a LAT1 reconheceu a presença de LAT1 em todas as linhas celulares de cancro. A abundância de proteína LAT1 foi marcadamente reduzida nas células tratadas com o ARNsi-LAT1 (B).

Figura 2. (A) O anticorpo criado contra a ASCT2 reconheceu a presença de ASCT2 em todas as linhas celulares de cancro. A abundância de proteína ASCT2 foi marcadamente reduzida nas células tratadas com o ARNsi-ASCT2 (B).

Figura 3. Efeito de 3 mM de L-leucina não marcada na absorção de [¹⁴C]-L-leucina independente de sódio (0,25 μ M) a uma taxa inicial de absorção de (1 min) em células de carcinoma epitelial. Absorção de [¹⁴C]-L-leucina (0,25 μ M) a uma taxa inicial de absorção de (1 min) em células de carcinoma tratadas durante 72 h com ARNsi-LAT1 (0, 5, 10 e 25 nM) contra as sequências nucleotídicas N° 6, N° 22, N° 34, N° 58 e N° 61.

Figura 4. Efeito de 3 mM de L-alanina não marcada na absorção de [¹⁴C]-L-alanina dependente de sódio (0,25 μ M) a uma taxa inicial de absorção de (1 min) em células de carcinoma epitelial. Absorção de [¹⁴C]-L-alanina (0,25 μ M) a uma taxa inicial de absorção de (1 min) em células de carcinoma tratadas durante 72 h com ARNsi-ASCT2 (0, 5, 10 e 25 nM) contra as sequências nucleotídicas N° 225, N° 237, N° 267 e N° 278.

Figura 5. (A) Tratamento de células com o ARNsi-LAT1 contra as

sequências nucleotídicas N° 22 e N° 34 durante 12 h diminuiu a viabilidade celular. (A) Tratamento de células com o ARNsi-ASCT2 contra as sequências nucleotídicas N° 237 e N° 278 durante 12 h diminuiu a viabilidade celular.

Figura 6. Quadro de sequências alvo e ARNsi de LAT 1

Figura 7 Quadro de sequências alvo e ARNsi de ASCT2

Materiais e métodos

Cultura celular

As linhas celulares SK-HEP-1, T24 e HT-1080 foram mantidas numa atmosfera humidificada de 5 % de CO₂-95 % de ar a 37 °C. As células SK-HEP-1 foram cultivadas em RPMI-1640 (Sigma, St. Louis, MO) suplementado com soro fetal bovino (FBS) a 20 % (Gibco, RU), penicilina G a 100 U/ml, anfotericina B a 0,25 gg/ml estreptomicina a 100 gg/ml (Gibco, RU), bicarbonato de sódio a 25 mM (Merck, Alemanha) e ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2- etanossulfônico (HEPES) (Sigma, St. Louis, MO). As células T24 e HT-1080 foram cultivadas, respectivamente, em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) - alta glicose (Sigma, St. Louis, MO) e DMEM - baixa glicose (Sigma, St. Louis, MO), suplementado com 10 % de FBS (Gibco, RU), penicilina G a 100 U/ml, anfotericina B a 0,25 gg/ml estreptomicina a 100 gg/ml (Gibco, RU), 25 mM bicarbonato de sódio (Merck, Alemanha) e HEPES a 25 mM (Sigma, St. Louis, MO). O meio foi mudado a cada dois dias, e células alcançaram confluência 3-4 dias após semeadura inicial. Para a subcultura, as células foram dissociadas com 0,25 % de tripsina- ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (Sigma, St. Louis, MO), divididas 1:15 e subcultivadas numa área de crescimento de 21-cm² (Sarstedt, Alemanha). As experiências foram realizadas geralmente 3-4 dias após a semeadura inicial.

Expressão da proteína de LAT1 e ASCT2

As linhas celulares cultivadas em placas de 21 cm² foram enxaguadas duas vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS) fria e foi adicionado 100 µl de tampão de lise RIPA (NaCl a 154 mM, base de TRIZMA a 65,2 mM, EDTA a 1 mM, NP-40 a 1 %

(IGEPAL), desoxicolato de sódio a 6 mM) contendo inibidores de protease: PMSF a 1 mM, 1 pg/ml de leupeptina e 1 pg/ml de aprotinina; e inibidores de fosfatase: Na₃VO₄ a 1 mM e NaF a 1 mM. As células foram raspadas e sonicadas brevemente. Foram separadas quantidades iguais de proteína total (20 pg) num gel de poliacrilamida e SDS a 10 % e eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose em tampão de transferência Tris-Glicina contendo metanol a 20 %. As folhas Transblot foram bloqueadas em leite em pó magro a 5 % em solução salina tamponada com Tris (TBS) durante 60 min e, em seguida, incubadas durante a noite, a 4 °C, com os seguintes anticorpos: anticorpo de coelho anti-LAT1 (1:1000; Cell Signalling); anticorpo de coelho anti-ASCT2 (1:1000; Cell Signalling); ou anticorpo monoclonal de ratinho anti-GAPDH (1:20.000; Santa Cruz Biotechnology Inc.), diluídas em leite em pó magro a 2,5 % em TBS-Tween 20 (0,1 % vol/vol). Os *immunoblots* foram subsequentemente lavados e incubados com anticorpos de cabra anti-coelho marcado com fluorescência (1:20.000; IRDye[™] 800, Rockland) ou anticorpo secundário anti-ratinho de cabra marcado com fluorescência (1:20.000; AlexaFluor 680, Molecular Probes) durante 60 min a temperatura ambiente e protegido da luz. A membrana foi lavada e fotografada através de digitalização, tanto a 700 nm como a 800 nm, com um Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences).

Expressão do gene de LAT1 e ASCT2

O ARN total a partir de células cultivadas em placas de 21 cm² foi isolado e purificado utilizando o Reagente TRIzol (Life Technologies, Espanha) de acordo com as instruções do fabricante. A qualidade e a concentração do ARN foram verificadas no espectrofotômetro NanoDrop ND1000 (Thermo Scientific, EUA). O ARN total (1 pg) foi convertido em ADNc utilizando o kit Maxima Scientific First Strand ADNc Synthesis para RT-qPCR (Thermo Scientific, EUA), de acordo com as instruções. Foi utilizado o seguinte protocolo: 1ª etapa, 10 min a 25 °C; 2ª etapa, 15 min a 50 °C; 3ª etapa, 5 min a 85 °C.

O ADNc foi utilizado para análise de qPCR utilizando Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Scientific, EUA) no instrumento StepOnePlus (Applied Biosystems, EUA). Foram utilizados QuantiTect Primer Assay para LAT1 e ASCT2 (Quiagen, Alemanha), e para o gene GAPDH referência foram selecionados o iniciador direto 5' -CTTTTGCGTCGCCAG-3' e o iniciador reverso 5' -TTGATGGCAACAATATCCAC-3'. A reação qPCR foi realizada em placas de PCR de 96 poços (Sarstedt, Alemanha) conforme segue: um ciclo de 10 min a 95 °C, seguido por 40 ciclos de PCR a 95 °C 15 s e 60 °C 60 s. Uma curva de fusão foi feita imediatamente depois da qPCR, para demonstrar a especificidade da amplificação. Sem controles de modelo foram sempre avaliados para cada gene alvo. Os valores do ciclo de quantificação (CQ) foram gerados automaticamente pelo software StepOnePlus 2.3 e a razão do gene alvo foi expressa em comparação com o gene GAPDH de referência. As eficácias de PCR em tempo real foram constatadas como sendo entre 95 % e 115 %.

Atividade de LAT1

Foram inoculadas células em placas de 24 poços (Sarstedt, Alemanha) e cultivadas até a confluência ser alcançada. No dia da experiência, o meio de crescimento foi aspirado e as monocamadas de células foram pré-incubadas durante 15 minutos em meio de Hanks a 37 °C. O meio de Hanks teve a composição seguinte (em mM): NaCl 140, KCl 5, MgSO₄-7H₂O 0,8, K₂HPO₄ 0,33, KH₂PO₄ 0,44, MgCl₂-6H₂O 1,0, CaCl₂ 0,025, Tris-HCl 9,75, pH 7,4. A absorção foi iniciada através da adição de meio de Hanks com [¹⁴C]- L-leucina a 0,25 pM na ausência e na presença de concentrações crescentes (0, 3, 10, 30, 100, 300, 1000, 3000 pM) do substrato não marcado, durante 1, 3 e 10 min. Durante a pré-incubação e a incubação, as células foram continuamente agitadas e mantidas a 37 °C. A absorção foi interrompida através da rápida remoção da solução de absorção por meio de uma bomba de vácuo ligada a uma pipeta de Pasteur, seguida de uma lavagem rápida com meio de Hanks. Subsequentemente, as células foram solubilizadas em 0,1% vol/vol de Triton X-100 (dissolvida em

Tris-HCl a 5 mM, pH 7,4), e a radioatividade foi medida através de contagem de cintilação líquida.

Atividade de ASCT2

Foram inoculadas células em placas de 24 poços (Sarstedt, Alemanha) e cultivadas até a confluência ser alcançada. No dia da experiência, o meio de crescimento foi aspirado e as monocamadas de células foram pré-incubadas durante 15 minutos em meio de Hanks a 37 °C. O meio de Hanks teve a composição seguinte (em mM): ChCl 140, KCl 5, MgSO₄-7H₂O 0,8, K₂HPO₄ 0,33, KH₂PO₄ 0,44, MgCl₂-6H₂O 1,0, CaCl₂ 0,025, Tris-HCl 9,75, pH 7,4. A absorção foi iniciada através da adição de meio de Hanks com [¹⁴C]- L-alanina a 0,25 pM na ausência e na presença de concentrações crescentes (0, 3, 10, 30, 100, 300, 1000, 3000 pM) do substrato não marcado, durante 1, 3 e 10 min. Durante a pré-incubação e a incubação, as células foram continuamente agitadas e mantidas a 37 °C. A absorção foi interrompida através da rápida remoção da solução de absorção por meio de uma bomba de vácuo ligada a uma pipeta de Pasteur, seguida de uma lavagem rápida com meio de Hanks. Subseqüentemente, as células foram solubilizadas em 0,1% vol/vol de Triton X-100 (dissolvida em Tris-HCl a 5 mM, pH 7,4), e a radioatividade foi medida através de contagem de cintilação líquida.

Silenciamento do gene de LAT1

As células foram inoculadas em placas de 24 poços (Sarstedt, Alemanha) ou de 6 poços (Corning, EUA) e incubadas durante 24 h sob condições de crescimento normais. Foram diluídos ARNs contra LAT1 e Lipofectamina 2000 (Life Technologies, Espanha) em meio de cultura isento de soro e a mistura foi incubada durante 20 min a temperatura ambiente (TA) para a formação do complexo. Foram adicionados lipoplexos às células em meio de cultura isento de soro e incubados durante 24 h, após o qual foi adicionado meio de cultura celular fresco a uma concentração final de 20 ou 10 % de FBS para as células SK-HEP-1 ou T24, respectivamente. As células foram adicionalmente incubadas em condições normais para os pontos de tempo

desejados. Subsequentemente, as células foram utilizadas para a avaliação da atividade LAT1 no transporte de ($[^{14}\text{C}]$ -L-leucina, com 1 min de incubação) ou expressão LAT1 (imunotransferência e RT-qPCR).

Silenciamento do gene de ASCT2

As células foram inoculadas em placas de 24 poços (Sarstedt, Alemanha) ou 6 poços (Corning, EUA) e incubadas durante 24 h sob condições de crescimento normais. Foram diluídos ARNs contra ASCT2 e Lipofectamina 2000 (Life Technologies, Espanha) em meio de cultura isento de soro e a mistura foi incubada durante 20 min a TA para a formação do complexo. Foram adicionados lipoplexos às células em meio de cultura isento de soro e incubados durante 24 h, após o qual foi adicionado meio de cultura celular fresco a uma concentração final de 20 ou 10 % de FBS para as células SK-HEP-1 ou T24, respectivamente. As células foram adicionalmente incubadas em condições normais para os pontos de tempo desejados. Subsequentemente, as células foram utilizadas para a avaliação da atividade ASCT2 no transporte de ($[^{14}\text{C}]$ -L-alanina, com 1 min de incubação) ou expressão ASCT2 (imunotransferência e RT-qPCR).

Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade celular foi medida utilizando calceína-AM (Invitrogen). Calceína-AM permeante de membrana, um corante não fluorescente, é absorvida e convertida por esterases intracelulares em calceína impermeante de membrana, que emite fluorescência verde. Após o tratamento com as substâncias de teste ou veículo, as células foram lavadas duas vezes com meio de Hanks e carregadas com calceína-AM a 2pM em meio de Hank, à temperatura ambiente durante 30 min. A fluorescência foi medida a comprimentos de onda de 485 nm de excitação e 530 nm de emissão num espectrofluorômetro de microplaca (Gemini EM, Molecular Devices). São realizadas nove medições de fluorescência consecutivas por poço, para permitir leituras de fluorescência em toda a área do poço, que foi, depois, considerada para o cálculo de fluorescência média por poço.

Para determinar a coloração mínima para calceína ($\text{calcein}_{\text{min}}$), oito poços foram tratados com etanol durante 30 min antes da adição calceína-AM. A percentagem de número de células é calculada como $[(\text{calceína}_{\text{amostra}}) / (\text{calceína}_{\text{controle}})] \times 100$.

Animais e implantação do tumor

As células SK-HEP1 serão cultivadas em cultura de tecidos e 10^7 células por ratinho serão injetadas no flanco posterior dos ratinhos fêmeas NMRI nu/nu. Uma vez que os tumores se desenvolveram e os volumes dos tumores atingiram critérios de randomização, a terapêutica começará por injeções intratumorais uma vez por dia. Será incluído um grupo não tratado totalmente e um grupo de terapêutica simulada (apenas inserção de agulha intra-tumoral) no estudo como controles. Foram utilizados ratinhos imunodeficientes fêmea NMRI nu/nu de Harlan ou Charles River. Os animais foram entregues com a idade de 4-6 semanas e são utilizados para o implante após pelo menos 1 semana de quarentena. Todas as intervenções nos animais foram realizadas de acordo com o número de Diretiva Europeia 86/609, e as regras do "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals", 7ª edição, 1996, Institute for Laboratory Animal Research (ILAR), Washington, DC. Somente foram selecionados animais com saúde inquestionável para entrar nos procedimentos de teste. Durante as experiências, os animais foram monitorizados pelo menos diariamente. Cada gaiola foi marcada com uma ficha indicando origem animal, gênero, e a data de nascimento. Os animais foram numerados durante a implantação do tumor ou no momento do início de uma experiência de determinação de dose.

O volume do tumor foi determinado por uma medição bidimensional com compassos de calibre no dia da randomização (Dia 0) e, depois, duas vezes por semana. Os volumes tumorais foram calculados de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Vol de tumor [mm}^3\text{]} = a \text{ [mm]} \times b^2 \text{ [mm}^2\text{]} \times 0,5$$

onde "a" é o maior diâmetro e "b" é o diâmetro perpendicular do tumor representando um elipsoide idealizado. O volume

relativo de um tumor individual no dia X (RTV_x) foi calculado dividindo o volume absoluto [mm³] do respetivo tumor no dia X (T_x) pelo volume absoluto do mesmo tumor no dia da randomização, ou seja, no dia 0 (T₀), multiplicado por 100, conforme é mostrado pela seguinte equação:

$$\text{RTV}_x \quad [\%] \quad \frac{T_x}{T_0} \times 100$$

$$=$$

RTVs foram utilizados para a caracterização do crescimento e classificação de atividade do composto como se segue:

Pontuação	RTV_x [%]
CR	Remissão completa \leq 10
PR	Remissão parcial $> 10; \leq 50$
MR	Remissão menor $> 50; \leq 75$
NC	Sem alterações $> 75; \leq 125$
P	Progressão > 125

Mediana do grupo e faixa (alternativamente média geométrica +/- SEM) de RTVs foram calculados, considerando apenas os tumores de animais que estavam vivos no dia em questão (para a mediana).

A mediana do grupo (média geométrica) de RTVs foram utilizadas para desenhar curvas de crescimento do tumor e para a avaliação do tratamento.

A inibição do tumor num dia particular (T/C_x) foi calculada a partir da mediana de RTV de um grupo de teste e o RTV mediano de um grupo de controlo, multiplicado por 100, conforme é mostrado pela seguinte equação:

$$\text{T/C}_x \quad [\%] = \frac{\text{Mediana RTV}_x \text{ grupo tratado}}{\text{Mediana RTV}_x \text{ grupo controlo}} \times 100$$

A valor ótimo / mínimo / melhor T / C [%] registado para um grupo particular durante uma experiência representa a atividade máxima anti tumoral para o respetivo tratamento e é classificado como se segue:

Pontuação		T/C [%]
-	Inativo	≥ 65
+ / -	Atividade limítrofe	$\geq 50; \leq 65$
+	Atividade moderada	$\geq 25; \leq 50$
++	Atividade alta	$\geq 10; \leq 25$
+++	Atividade muito alta	$\geq 5; \leq 10$
++++	Remissão completa	< 5

O tempo de duplicação / quadruplicação do volume tumoral (DT / QT) é definido como o intervalo de tempo (em dias) necessário para um grupo de alcançar um RTV mediano de 200% / 400% do volume inicial do tumor. O atraso no crescimento é definido como a diferença em dias entre os tempos de duplicação do volume do tumor e quadruplicação de um grupo de teste e o respetivo grupo de controlo.

Sistemas de administração de ARNsi não-virais

1. Os lipossomas que transportam agentes ARNsi-LAT1 terapêuticos são capazes de passar através da membrana da célula alvo para distribuir cargas. Um grande número de lípidos pode ser utilizado para a síntese de lipossomas utilizados para a administração de ARNsi. Lípidos neutros que podem ser complexados com ARNsi-LAT1 incluem DOPE (1,2-dioleoil-sn-glicerol-3-fosfoetanolamina), por exemplo, PC (fosfatidilcolina), DOPC (1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina e DPPE (1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina).

2. Lípidos catiónicos que podem ser complexados com ARNsi-LAT1 incluem DOTAP (1,2-diolei-3-trimetilamónio propano), CDAN (N(1)-colesteriloxicarbonil-3,7-diazanonano-1,9-diamina)/DOPE, DC-Chol (3[^]-[N-(N',N'-dimetlaminoetano)carbamoil] colesterol)/DOPE, DOTAP/DOPE, lípido catiónico RPR209120 (2-(3-[Bis-(3-amino-propil)-amino]-propilamino)-N-ditetradecilcarbamoilmetil-acetamida).

Complexo de lipossomas galactosilados (Gal-C4-Chol/DOPE) lipossomas/ ARN-si-LAT1 podem também induzir o silenciamento gênico.

3. Polímeros catiónicos também podem ser usados em administração de ARNsi-LAT1 ou ARNsi-ASCT2. Estes materiais combinam com ARNsi-LAT1 aniônico ou ARNsi-ASCT2 para formar um complexo de polímero de ARNsi -LAT1 ou complexo de polímero de ARNsi-ASCT2 que pode interagir com as superfícies das células carregadas negativamente através da porção catiónica do complexo. Entre os polímeros disponíveis, polietilenoimina (PEI) tem a capacidade de se ligar fortemente a ARNsi-LAT1 ou ARNsi-ASCT2 carregado negativamente. Polímeros biodegradáveis tais como poli(L-lisina) (PLL) são conhecidos pela sua baixa toxicidade e maior biocompatibilidade do que PEI. Um derivado da PLL, ácido poli[α -(4-aminobutil)-L-glicólico] exibe uma maior eficiência de transfeção e imunogenicidade e a citotoxicidade inferior do que o polímero de PLL original e pode ser usado com ARNsi-LAT1 ou ARNsi-ASCT2.

4. Microesferas de gelatina catiónica podem ser preparadas reticulando quimicamente gelatina no estado de emulsão água-em-óleo. Para impregnar o ADN de plasmídeo de expressão de ARNsi-LAT1 ou ARNsi-ASCT2 nas microesferas de gelatina cationizadas, ADN de plasmídeo de expressão de ARNsi-LAT1 contendo PBS pode ser gotejado sobre microesferas de gelatina cationizadas liofilizadas e depois mantidas durante 24 h a 4 °C.

5. As nanopartículas podem ser produzidas com base na gelificação iônica modificada de tripolifosfato (TPF) com quitosano. Podem ser utilizados dois tipos diferentes de quitosano (cloridrato e glutamato de quitosano) e cada tipo com duas massas moleculares diferentes. As nanopartículas podem ser obtidas espontaneamente após a adição de uma solução aquosa de TPP a solução de quitosano sob agitação magnética constante à temperatura ambiente. As partículas podem então ser incubadas a temperatura ambiente para utilização antes ou análise

posterior. As nanopartículas são recolhidas por meio de centrifugação. Os sobrenadantes são descartados e as nanopartículas são ressuspensas em água destilada filtrada. Para a associação do ARNsi-LAT1 ou ARNsi-ASCT2 com as nanopartículas de quitosano-TPP (quitosano-TPP-ARNsi-LAT1 ou quitosano-TPP-ARNsi-ASCT2), ARNsi-LAT1 ou ARNsi-ASCT2 em água bidestilada é adicionado à solução de TPP antes de adicionar isto gota a gota à solução de quitosano, sob agitação magnética constante à temperatura ambiente. As partículas são então incubadas à temperatura ambiente antes da utilização ou análise posterior.

6. O quitosano (114 kDa) foi dissolvido em tampão de acetato de sódio para se obter um 0,2-1 mg/ml de intervalos de solução de trabalho. Vinte microlitros de ARNsi-LAT1 ou ARNsi-ASCT2 (intervalo de 20-250 pm) foi adicionado a 1 ml de quitosano filtrado com agitação e deixado durante 1 h. Para calcular as razões de N:P específico (definida como a proporção molar dos grupos amino de quitosano/grupos fosfato de ARN) uma massa por fosfato de 325 Da foi usada para ARN e massa por carga de 167,88 para o quitosano (84 % de desacetilação).

7. Os ARNsi-LAT1 ou ARNsi-ASCT2 podem ser encapsulados em partículas de lípidos e ácido nucleico estáveis (SNALP) e administrado por meio de injeção intravenosa. A formulação de SNALP continha os lípidos 3-N-(W-metoxipoli(etileno-glicol)2000) carbamoil]-1,2-dimiristiloxi-propilamina (PEG-DMA), 1,2-dilinoileiloxi-N,N-dimetil-3-qminopropanona (DLinDMA), 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC) e colesterol.

8. Os ARNsi-LAT1 ou ARNsi-ASCT2 podem ser encapsulados em Injectin *In Vivo* SiRNA Delivery Reagent (BioCellChallenge SAS, Toulon, França) e administrados por meio de injeção intravenosa. A formulação de injeção continha a seguinte mistura: 10 pg de ARNsi em 10 µl de tampão contendo glicose, 40 µl com uma água isenta de ARNase estéril, 10 µl de reagente Injectin. A mistura deve ser misturada por pipetagem para cima

e para baixo, e incubada durante 15 minutos à temperatura ambiente antes da injeção.

Exemplo 1

Imunotransferência de LAT1

A presença da proteína de LAT1 foi estudada por meio de imunotransferência utilizando um anticorpo criado contra LAT1. Conforme mostrado na **Figura 1A**, o anticorpo criado contra LAT1 reconheceu a presença de LAT1 em todas as linhas celulares de cancro. A abundância de proteína LAT1 foi marcadamente reduzida nas células tratadas com o ARNsi-LAT1 (**Figura 1B**).

Exemplo 2

Imunotransferência de ASCT2

A presença da proteína de ASCT2 foi estudada por meio de imunotransferência utilizando um anticorpo criado contra ASCT2. Conforme mostrado na **Figura 2A**, o anticorpo criado contra ASCT2 reconheceu a presença de ASCT2 em todas as linhas celulares de cancro. A abundância de proteína ASCT2 foi marcadamente reduzida nas células tratadas com o ARNsi-ASCT2 (**Figura 2B**).

Exemplo 3

Captação de [¹⁴C]-L-leucina

A captação de [¹⁴C]-L-leucina independente de sódio (0,25 μ M) na taxa inicial de captação (1 min) em células de carcinoma epitelial foi significativamente ($P < 0,01$) reduzida por L-leucina não marcada a 3 mM. Conforme mostrado na **Figura 3**, o tratamento de células com o ARNsi-LAT1 contra as sequências nucleotídicas N° 6, N° 22, N° 34, N° 58 e N° 61 (por exemplo, um ARNsi compreendendo ou que consiste na SEQ ID NO: 110, 126, 138, 162 e 165, respectivamente) durante 72 h diminuiu a captação de [¹⁴C]-L-leucina (0,25 μ M) numa maneira dependente da concentração.

Exemplo 4

Captação de [¹⁴C]-L-alanina

A captação de [¹⁴C]-L-alanina dependente de sódio (0,25 μ M) na taxa inicial de captação (1 min) em células de carcinoma

epitelial foi significativamente ($P < 0,01$) reduzida por L-alanina não marcada a 3 mM. Conforme mostrado na **Figura 4**, o tratamento de células com o ARNsi-ASCT2 contra as sequências nucleotídicas N° 225, N° 237, N° 267 e N° 278 (por exemplo, um ARNsi compreendendo ou que consiste na SEQ ID NO: 314, 326, 356 e 367 durante 72 h diminuiu a captação de [14 C]-L-alanina (0,25 μ M) numa maneira dependente da concentração.

Exemplo 5

Viabilidade celular

Conforme mostrado na **Figura 5A**, o tratamento de células com o ARNsi-LAT1 contra as sequências nucleotídicas N° 22 (por exemplo, um ARNsi compreendendo ou que consiste na SEQ ID NO: 126) durante 12 h diminuiu a viabilidade celular. Diminuições semelhantes na viabilidade celular às observadas com ARNsi-LAT1 contra sequências nucleotídicas N° 22 foram também observadas após tratamento durante 12 h com o ARNsi-LAT1 contra as sequências nucleotídicas N° 34 (por exemplo, um ARNsi compreendendo ou que consiste na SEQ ID NO: 138). Conforme mostrado na **Figura 5B**, o tratamento de células com o ARNsi-ASCT2 contra as sequências nucleotídicas N° 237 (por exemplo, um ARNsi compreendendo ou que consiste na SEQ ID NO: 326) durante 12 h diminuiu a viabilidade celular. Diminuições semelhantes na viabilidade celular às observadas com ARNsi-LAT1 contra sequências nucleotídicas N° 237 foram também observadas após tratamento durante 12 h com o ARNsi-ASCT2 contra as sequências nucleotídicas N° 278 (por exemplo, um ARNsi compreendendo ou que consiste na SEQ ID NO: 367)

Exemplo 6

Crescimento tumoral

Conclusão

O tratamento de células de cancro que expressam transportador de LAT1 e/ou ASCT2 com ARNsi-LAT1 e/ou ARNsi-ASCT2 leva a uma diminuição na proteína de LAT1 e/ou ASCT2 e uma diminuição na captação de [14 C]-L-leucina e captação de [14 C]-L-alanina, que é acompanhada por uma diminuição na

viabilidade celular. A diminuição da viabilidade celular de células de cancro induzida pelo ARNsi-LAT1 e/ou o ARNsi-ASCT2 é acompanhada por apoptose e uma diminuição do crescimento do tumor e do potencial de metástases, conforme evidenciado em tumores subcutâneos de ratinhos nus da linha celular SK-Hep-1.

Aspetos adicionais da invenção ficarão evidentes para os peritos na especialidade, ou podem ser aprendidas a partir da prática da invenção. Os objetivos e vantagens da invenção podem ser concretizados e alcançados por meio das intervenções e combinações particularmente destacadas nas reivindicações anexas.

Referências

- Baggetto LG (1992). Deviant energetic metabolism of glycolytic cancer cells. *Biochimie* 74 959-974.
- Betsunoh H, Fukuda T, Anzai N, Nishihara D, Mizuno T, Yuki H, et al. (2013). Increased expression of system large amino acid transporter (LAT)-1 mRNA is associated with invasive potential and unfavorable prognosis of human clear cell renal cell carcinoma. *BMC Cancer* 13: 509-519.
- Biology EoNC (2003) . Whither RNAi ? *Nature Cell Biology* 5: 489-490.
- Broer S, Broer A, Hamprecht B (1997) . Expression of the surface antigen 4F2hc affects system-L-like neutral-amino-acid-transport activity in mammalian cells. *Biochem J* 324 535-541.
- Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R (2002) . A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296: 550-553.
- Bryan CF, Perez JC, Julie ES, Sofia BC, Barrie PB (2004) . Inducible antisense RNA targeting amino acid transporter ATB0/ASCT2 elicits apoptosis in human hepatoma cells. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*.
- Christensen HN (1990) . Role of amino acid transport and countertransport in nutrition and metabolism. *Physiol Rev* 70

43-77.

Chuntao T, Shixin L, Qingxia F, Weijie Z, Shunchang J, Xiao Z, et al. (2015). Prognostic Significance of Tumor-infiltrating CD8 + or CD3 + T Lymphocytes and Interleukin-2 Expression in Radically Resected Non-small Cell Lung Cancer. *Chinese Medical Journal* 128: 105-110.

Davis ME (2009). The first targeted delivery of siRNA in humans via a self-assembling, cyclodextrin polymer-based nanoparticle: from concept to clinic. *Mol Pharm* 6: 659-668.

Denoyer D, Kirby L, Waldeck K, Roselt P, Neels OC, Bourdier T, et al. (2012). Preclinical characterization of ¹⁸F-D-FPHCys, a new amino acid-based PET tracer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 39: 703-712.

Dickens D, Webb SD, Antonyuk S, Giannoudis A, Owen A, Radisch S, et al. (2013) . Transport of gabapentin by LAT1 (SLC7A5) . *Biochem Pharmacol* 85: 1672-1683.

Ebara T, Kaira K, Saito J, Shioya M, Asao T, Takahashi T, et al. (2010). L-type amino-acid transporter 1 expression predicts the response to preoperative hyperthermo-chemoradiotherapy for advanced rectal cancer. *Anticancer Res* 30: 4223-4227.

Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T (2001) . Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411: 494-498.

Eltz S, Comperat E, Cussenot O, Roupret M (2008) . Molecular and histological markers in urothelial carcinomas of the upper urinary tract. *BJU Int* 102: 532-535.

Emer C, Helen I, Deirdre W, Mark W, Kate D, Laura SM, et al. (2013). Prognostic Significance of Deregulated Dicer Expression in Breast Cancer. *PLoS ONE* 8: e83724.

Feral CC, Nishiya N, Fenczik CA, Stuhlmann H, Slepak M, Ginsberg MH (2005). CD98hc (SLC3A2) mediates integrin signalling. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 355-360.

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC

- (1998). Potent and specific genetic interference by doublestranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806-811.
- Fuchs BC, Bode BP (2005) . Amino acid transporters ASCT2 and LAT1 in cancer: partners in crime? *Semin Cancer Biol* 15: 254-266 .
- Fuchs BC, Perez JC, Suetterlin JE, Chaudhry SB, Bode BP (2004). Inducible antisense RNA targeting amino acid transporter ATB0/ASCT2 elicits apoptosis in human hepatoma cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 286: G467-478.
- Fukumoto S, Hanazono K, Komatsu T, Iwano H, Kadosawa T, Uchide T (2013). L-type amino acid transporter 1 (LAT1) expression in canine mammary gland tumors. *J Vet Med Sci* 75: 431-437.
- Furuya M, Horiguchi J, Nakajima H, Kanai Y, Oyama T (2012). Correlation of L-type amino acid transporter 1 and CD98 expression with triple negative breast cancer prognosis. *Cancer Sci* 103: 382-389.
- Habermeier A, Graf J, Sandhofer BF, Boissel JP, Roesch F, Closs EI (2015) . System L amino acid transporter LAT1 accumulates O-(2-fluoroethyl)-L-tyrosine (FET). *Amino Acids* 47: 335-344.
- Hannon GJ (2002). RNA interference. *Nature* 418: 244-251.
- Harborth J, Elbashir SM, Bechert K, Tuschl T, Weber K (2001). Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs. *J Cell Sci* 114: 4557-4565.
- Hayashi K, Jutabha P, Endou H, Anzai N (2012) . c-Myc is crucial for the expression of LAT1 in MIA Paca-2 human pancreatic cancer cells. *Oncology reports* 28: 862-866.
- Ichinoe M, Yanagisawa N, Mikami T, Hana K, Nakada N, Endou H, et al. (2015) . L-type amino acid transporter 1 (LAT1) expression in lymph node metastasis of gastric carcinoma: Its correlation with size of metastatic lesion and Ki-67 labeling. *Pathology, research and practice* "in press".
- Ichinoe M, Mikami T, Yoshida T, Igawa I, Tsuruta T, Nakada

- N, et al. (2011) . High expression of L-type amino-acid transporter 1 (LAT1) in gastric carcinomas: comparison with non-cancerous lesions. *Pathol Int* 61: 281-289.
- Imai H, Kaira K, Oriuchi N, Yanagitani N, Sunaga N, Ishizuka T, et al. (2009). L-type amino acid transporter 1 expression is a prognostic marker in patients with surgically resected stage I non-small cell lung cancer. *Histopathology* 54: 804-813 .
- Isoda A, Kaira K, Iwashina M, Oriuchi N, Tominaga H, Nagamori S, et al. (2014). Expression of L-type amino acid transporter 1 (LAT1) as a prognostic and therapeutic indicator in multiple myeloma. *Cancer Sci* 105: 1496-1502.
- IToyoda M, Kaira K, Ohshima Y, Ishioka NS, Shino M, Sakakura K, et al. (2014). Prognostic significance of amino-acid transporter expression (LAT1, ASCT2, and xCT) in surgically resected tongue cancer. *Br J Cancer* 110: 2506-2513.
- Jacque J-M, Triques K, Stevenson M (2002) . Modulation of HIV-1 replication by RNA interference. *Nature* 418: 435-438.
- Kaira K, Sunose Y, Oriuchi N, Kanai Y, Takeyoshi I (2014) . CD98 is a promising prognostic biomarker in biliary tract cancer. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 13: 654-657.
- Kaira K, Arakawa K, Shimizu K, Oriuchi N, Nagamori S, Kanai Y, et al. (2015a). Relationship between CD147 and expression of amino acid transporters (LAT1 and ASCT2) in patients with pancreatic cancer. *Am J Transl Res* 7: 356-363.
- Kaira K, Nakagawa K, Ohde Y, Okumura T, Takahashi T, Murakami H, et al. (2012a). Depolarized MUC1 expression is closely associated with hypoxic markers and poor outcome in resected non-small cell lung cancer. *Int J Surg Pathol* 20: 223-232.
- Kaira K, Toyoda M, Shino M, Sakakura K, Takahashi K, Tominaga H, et al. (2013). Clinicopathological significance of L-type amino acid transporter 1 (LAT1) expression in patients with adenoid cystic carcinoma. *Pathol Oncol Res* 19: 649-656.
- Kaira K, Sunose Y, Arakawa K, Sunaga N, Shimizu K, Tominaga H, et al. (2015b). Clinicopathological significance of ASC

amino acid transporter-2 expression in pancreatic ductal carcinoma. *Histopathology* 66: 234-243.

Kaira K, Oriuchi N, Imai H, Shimizu K, Yanagitani N, Sunaga N, et al. (2009a). Prognostic significance of L-type amino acid transporter 1 (LAT1) and 4F2 heavy chain (CD98) expression in early stage squamous cell carcinoma of the lung. *Cancer Sci* 100: 248-254.

Kaira K, Oriuchi N, Imai H, Shimizu K, Yanagitani N, Sunaga N, et al. (2009b). L-type amino acid transporter 1 (LAT1) is frequently expressed in thymic carcinomas but is absent in thymomas. *J Surg Oncol* 99: 433-438.

Kaira K, Takahashi T, Murakami H, Shukuya T, Kenmotsu H, Naito T, et al. (2011a). Relationship between LAT1 expression and response to platinum-based chemotherapy in non-small cell lung cancer patients with postoperative recurrence. *Anticancer Res* 31: 3775-3782.

Kaira K, Oriuchi N, Imai H, Shimizu K, Yanagitani N, Sunaga N, et al. (2008a). L-type amino acid transporter 1 and CD98 expression in primary and metastatic sites of human neoplasms. *Cancer Sci* 99: 2380-2386.

Kaira K, Oriuchi N, Imai H, Shimizu K, Yanagitani N, Sunaga N, et al. (2008b). Prognostic significance of L-type amino acid transporter 1 expression in resectable stage I-III nonsmall cell lung cancer. *Br J Cancer* 98: 742-748.

Kaira K, Oriuchi N, Imai H, Shimizu K, Yanagitani N, Sunaga N, et al. (2009c). CD98 expression is associated with poor prognosis in resected non-small-cell lung cancer with lymph node metastases. *Ann Surg Oncol* 16: 3473-3481.

Kaira K, Oriuchi N, Imai H, Shimizu K, Yanagitani N, Sunaga N, et al. (2010a). Prognostic significance of L-type amino acid transporter 1 (LAT1) and 4F2 heavy chain (CD98) expression in surgically resectable stage III non-small cell lung cancer. *Exp Ther Med* 1: 799-808.

Kaira K, Oriuchi N, Shimizu K, Imai H, Tominaga H, Yanagitani N, et al. (2010b). Comparison of L-type amino acid

transporter 1 expression and L-[3-18F]-alpha-methyl tyrosine uptake in outcome of non-small cell lung cancer. *Nucl Med Biol* 37: 911-916 .

Kaira K, Oriuchi N, Imai H, Shimizu K, Yanagitani N, Sunaga N, et al. (2008c). Expression of L-type amino acid transporter 1 (LAT1) in neuroendocrine tumors of the lung. *Pathol Res Pract* 204: 553-561.

Kaira K, Oriuchi N, Shimizu K, Ishikita T, Higuchi T, Imai H, et al. (2009d). Correlation of angiogenesis with 18F-FMT and 18F-FDG uptake in non-small cell lung cancer. *Cancer Sci* 100: 753-758 .

Kaira K, Oriuchi N, Takahashi T, Nakagawa K, Ohde Y, Okumura T, et al. (2011b) . L-type amino acid transporter 1 (LAT1) expression in malignant pleural mesothelioma. *Anticancer Res* 31: 4075-4082.

Kaira K, Oriuchi N, Takahashi T, Nakagawa K, Ohde Y, Okumura T, et al. (2011c) . LAT1 expression is closely associated with hypoxic markers and mTOR in resected non-small cell lung cancer. *Am J Transl Res* 3: 468-478.

Kaira K, Oriuchi N, Otani Y, Shimizu K, Tanaka S, Imai H, et al. (2007). Fluorine-18-alpha-methyltyrosine positron emission tomography for diagnosis and staging of lung cancer: a clinicopathologic study. *Clin Cancer Res* 13: 6369-6378.

Kaira K, Sunose Y, Arakawa K, Ogawa T, Sunaga N, Shimizu K, et al. (2012b). Prognostic significance of L-type amino-acid transporter 1 expression in surgically resected pancreatic cancer. *Br J Cancer* 107: 632-638.

Kanai Y, Endou H (2001) . Heterodimeric amino acid transporters: molecular biology and pathological and pharmacological relevance. *Curr Drug Metab* 2: 339-354.

Kanai Y, Segawa H, Miyamoto K, Uchino H, Takeda E, Endou H (1998). Expression cloning and characterization of a transporter for large neutral amino acids activated by the heavy chain of 4F2 antigen (CD98) . *J Biol Chem* 273: 23629-23632.

- Kaneko S, Ando A, Okuda-Ashitaka E, Maeda M, Furuta K, Suzuki M, et al. (2007). Ornithine transport via cationic amino acid transporter-1 is involved in ornithine cytotoxicity in retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48: 464-471.
- Kaoru K, Toshiaki K, Tomohiko Y, Yuichi T, Takahiro H, Koji N, et al. (2011). Positive Relationship between L-type Amino Acid Transporter 1 Expression and Liver Metastasis in T3 Colorectal Cancer. *The Showa University Journal of Medical Sciences* 23: 145-151.
- Keyaerts M, Lahoutte T, Neyns B, Caveliers V, Vanhove C, Everaert H, et al. (2007). ¹²³I-2-iodo-tyrosine, a new tumour imaging agent: human biodistribution, dosimetry and initial clinical evaluation in glioma patients. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 34: 994-1002.
- Kim CH, Park KJ, Park JR, Kanai Y, Endou H, Park JC, et al. (2006a). The RNA interference of amino acid transporter LAT1 inhibits the growth of KB human oral cancer cells. *Anticancer Res* 26: 2943-2948.
- Kim CS, Cho SH, Chun HS, Lee SY, Endou H, Kanai Y, et al. (2008). BCH, an inhibitor of system L amino acid transporters, induces apoptosis in cancer cells. *Biol Pharm Bull* 31: 1096-1100.
- Kim DK, Ahn SG, Park JC, Kanai Y, Endou H, Yoon JH (2004a). Expression of L-type amino acid transporter 1 (LAT1) and 4F2 heavy chain (4F2hc) in oral squamous cell carcinoma and its precursor lesions. *Anticancer Res* 24: 1671-1675.
- Kim KD, Ahn SG, Park JC, Kanai Y, Endou H, Yoon JH (2004b). Expression of L-type amino acid transporter 1 (LAT1) and 4F2 heavy chain (4F2hc) in oral squamous cell carcinoma and its precursor lesions. *Anticancer Res* 24: 1671-1675.
- Kim KD, Kanai Y, Choi HW, Tangtrongsup S, Chairoungdua A, Babu E, et al. (2002). Characterization of the system L amino acid transporter in T24 human bladder carcinoma cells. *Biochim Biophys Acta* 1565: 112-121.

- Kim SG, Kim HH, Kim HK, Kim CH, Chun HS, Kanai Y, et al. (2006b). Differential expression and functional characterization of system L amino acid transporters in human normal osteoblast cells and osteogenic sarcoma cells. *Anticancer Res* 26: 1989-1996.
- Kudo Y, Boyd CA (2004). RNA interference-induced reduction in CD98 expression suppresses cell fusion during syncytialization of human placental BeWo cells. *FEBS Lett* 577: 473-477.
- Kuhne A, Tzvetkov MV, Hagos Y, Lage H, Burckhardt G, Brockmoller J (2009). Influx and efflux transport as determinants of melphalan cytotoxicity: Resistance to melphalan in MDR1 overexpressing tumor cell lines. *Biochem Pharmacol* 78: 45-53.
- Kuhne A, Kaiser R, Schirmer M, Heider U, Muhlke S, Niere W, et al. (2007). Genetic polymorphisms in the amino acid transporters LAT1 and LAT2 in relation to the pharmacokinetics and side effects of melphalan. *Pharmacogenet Genomics* 17: 505-517.
- Kyoichi K (2010). Prognostic significance of L-type amino acid transporter 1 (LAT1) and 4F2 heavy chain (CD98) expression in surgically resectable stage III non-small cell lung cancer. *Experimental and Therapeutic Medicine* 1: 799-808.
- Kyoichi K, Yutaka S, Kazuhisa A, Noriaki S, Kimihiro S, Hideyuki T, et al. (2015). Clinicopathological significance of ASC amino acid transporter-2 expression in pancreatic ductal carcinoma. *Histopathology*.
- Kyoichi K, Noboru O, Hisao I, Kimihiro S, Noriko Y, Noriaki S, et al. (2008). Expression of L-type amino acid transporter 1 (LAT1) in neuroendocrine tumors of the lung. *Pathology, research and practice*: 553-561.
- Lee NS, Dohjima T, Bauer G, Li H, Li M-J, Ehsani A, et al. (2001). Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells. *Nature*

Biotechnology 19: 500-505.

Lee NS, Dohjima T, Bauer G, Li H, Li M-J, Ehsani A, et al. (2002) . Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells. *Nature Biotechnology* 20: 500-505 .

Li J, Qiang J, Chen SF, Wang X, Fu J, Chen Y (2013) . The impact of L-type amino acid transporter 1 (LAT1) in human hepatocellular carcinoma. *Tumour Biol* 34: 2977-2981.

Li R, Younes M, Frolov A, Wheeler TM, Scardino P, Ohori M, et al. (2003). Expression of neutral amino acid transporter ASCT2 in human prostate. *Anticancer Res* 23: 3413-3418.

Li S, Whorton AR (2005). Identification of stereoselective transporters for S-nitroso-L-cysteine: role of LAT1 and LAT2 in biological activity of S-nitrosothiols. *J Biol Chem* 280: 20102-20110.

Liang Z, Cho HT, Williams L, Zhu A, Liang K, Huang K, et al. (2011). Potential Biomarker of L-type Amino Acid Transporter 1 in Breast Cancer Progression. *Nucl Med Mol Imaging* 45: 93-102.

Masashi N, Satoru K, Kyoichi K, Hiroki T, Yuichi Y, Norio H, et al. (2014). Expression of amino acid transporters (LAT1, ASCT2 and xCT) as clinical significance in hepatocellular carcinoma. *Hepatology Research*: 1-9.

Mazurek S, Eigenbrodt (2003). The tumor metabolome. *Anticancer Res* 23: 1149-1154.

Medina MA, Marquez J, Nunez de Castro I (1992a). Interchange of amino acids between tumor and host. *Biochem Med Metabol Biol* 48: 1-7.

Medina MA, Sanchez-Jimenez F, Marquez J, Rodriguez Quesada A, Nunez de Castro I (1992b). Relevance of glutamine metabolism to tumor cell growth. *Mol Cell Biochem* 113 1-15.

Miyagishi M, Taira K (2002) . U6 promoter-driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells. *Nature Biotechnology* 19: 497500.

- Nakanishi K, Ogata S, Matsuo H, Kanai Y, Endou H, Hiroi S, et al. (2007). Expression of LAT1 predicts risk of progression of transitional cell carcinoma of the upper urinary tract. *Virchows Arch* 451: 681-690.
- Nawashiro H, Otani N, Shinomiya N, Fukui S, Ooigawa H, Shima K, et al. (2006). L-type amino acid transporter 1 as a potential molecular target in human astrocytic tumors. *Int J Cancer* 119: 484-492.
- Nobusawa A, Kim M, Kaira K, Miyashita G, Negishi A, Oriuchi N, et al. (2013). Diagnostic usefulness of (1) (8)F-FAMT PET and L-type amino acid transporter 1 (LAT1) expression in oral squamous cell carcinoma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 40: 1692-1700.
- Ohkame H, Masuda H, Ishii Y, Kanai Y (2001). Expression of L-type amino acid transporter 1 (LAT1) and 4F2 heavy chain (4F2hc) in liver tumor lesions of rat models. *J Surg Oncol* 78: 265-271; discussion 271-262.
- Okubo S, Zhen HN, Kawai N, Nishiyama Y, Haba R, Tamiya T (2010). Correlation of L-methyl-11C-methionine (MET) uptake with L-type amino acid transporter 1 in human gliomas. *J Neurooncol* 99: 217-225.
- Paddison PJ, Caudy AA, Bernstein E, Hannon GJ, Conklin DSS (2002). Short grampo de cabelo RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev* 16: 948-958.
- Paul CP, Good PD, Winer I, Engelke DR (2002). Effective Expression of Small Interfering RNA in human cells. *Nature Biotechnology* 19: 505-508.
- Pinho MJ, Serrao MP, Jose PA, Soares-da-Silva P (2007a). Overexpression of non-functional LAT1/4F2hc in renal proximal tubular epithelial cells from the spontaneous hypertensive rat. *Cell Physiol Biochem* 20: 535-548.
- Pinho MJ, Pinto V, Serrao MP, Jose PA, Soares-da-Silva P (2007b). Underexpression of the Na⁺-dependent neutral amino acid transporter ASCT2 in the spontaneously hypertensive rat

kidney. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293: R538-R547.

Ren P, Yue M, Xiao D, Xiu R, Gan L, Liu H, et al. (2015). ATF4 and N-Myc coordinate glutamine metabolism in MYCN-amplified neuroblastoma cells through ASCT2 activation. *J Pathol* 235: 90-100.

Sakata T, Ferdous G, Tsuruta T, Satoh T, Baba S, Muto T, et al. (2009). L-type amino-acid transporter 1 as a novel biomarker for high-grade malignancy in prostate cancer. *Pathol Int* 59: 7-18.

Sang J, Lim YP, Panzica M, Finch P, Thompson NL (1995) . TA1, a highly conserved oncofetal complementary DNA from rat hepatoma, encodes an integral membrane protein associated with liver development, carcinogenesis, and cell activation. *Cancer Res* 55: 1152-1159.

Segawa A, Nagamori S, Kanai Y, Masawa N, Oyama T (2013) . L-type amino acid transporter 1 expression is highly correlated with Gleason score in prostate cancer. *Mol Clin Oncol* 1: 274280.

Shennan DB, Thomson J (2008). Inhibition of system L (LAT1/CD98hc) reduces the growth of cultured human breast cancer cells. *Oncol Rep* 20: 885-889.

Shennan DB, Thomson J, Gow IF, Travers MT, Barber MC (2004) . L-leucine transport in human breast cancer cells (MCF-7 and MDA-MB-231): kinetics, regulation by estrogen and molecular identity of the transporter. *Biochim Biophys Acta* 1664: 206216 .

Shimizu K, Kaira K, Tomizawa Y, Sunaga N, Kawashima O, Oriuchi N, et al. (2014) . ASC amino-acid transporter 2 (ASCT2) as a novel prognostic marker in non-small cell lung cancer. *Br J Cancer* 110: 2030-2039.

Stockhammer F, Plotkin M, Amthauer H, van Landeghem FK, Woiciechowsky C (2008). Correlation of F-18-fluoro-ethyl-tyrosin uptake with vascular and cell density in non-contrastenhancing gliomas. *J Neurooncol* 88: 205-210.

- Storey BT, Fugere C, Lesieur-Brooks A, Vaslet C, Thompson NL (2005). Adenoviral modulation of the tumor-associated system L amino acid transporter, LAT1, alters amino acid transport, cell growth and 4F2/CD98 expression with cell-type specific effects in cultured hepatic cells. *Int J Cancer* 117: 387-397.
- Sui G, Soohoo C, Affar EB, Gay F, Shi Y, Forrester WC, et al. (2002). A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 5515-5520.
- Suzuki S, Kaira K, Ohshima Y, Ishioka NS, Sohda M, Yokobori T, et al. (2014). Biological significance of fluorine-18-alpha-methyltyrosine (FAMT) uptake on PET in patients with oesophageal cancer. *Br J Cancer* 110: 1985-1991.
- Takeuchi K, Ogata S, Nakanishi K, Ozeki Y, Hiroi S, Tominaga S, et al. (2010). LAT1 expression in non-small-cell lung carcinomas: analyses by semiquantitative reverse transcription-PCR (237 cases) and immunohistochemistry (295 cases). *Lung Cancer* 68: 58-65.
- Tamai S, Masuda H, Ishii Y, Suzuki S, Kanai Y, Endou H (2001). Expression of L-type amino acid transporter 1 in a rat model of liver metastasis: positive correlation with tumor size. *Cancer Detect Prev* 25: 439-445.
- Toyoda M, Kaira K, Shino M, Sakakura K, Takahashi K, Takayasu Y, et al. (2014). CD98 as a novel prognostic indicator for patients with stage III/IV hypopharyngeal squamous cell carcinoma. *Head Neck*: 1-6.
- Wang Q, Bailey CG, Ng C, Tiffen J, Thoeng A, Minhas V, et al. (2011). Androgen receptor and nutrient signaling pathways coordinate the demand for increased amino acid transport during prostate cancer progression. *Cancer Res* 71: 7525-7536.
- Wang Q, Beaumont KA, Otte NJ, Font J, Bailey CG, van Geldermalsen M, et al. (2014). Targeting glutamine transport to suppress melanoma cell growth. *Int J Cancer* 135: 1060-1071.

- Wang Q, Hardie RA, Hoy AJ, van Geldermalsen M, Gao D, Fazli L, et al. (2015). Targeting ASCT2-mediated glutamine uptake blocks prostate cancer growth and tumour development. *J Pathol*.
- Watanabe J, Yokoyama Y, Futagami M, Mizunuma H, Yoshioka H, Washiya K, et al. (2014). L-type amino acid transporter 1 expression increases in well-differentiated but decreases in poorly differentiated endometrial endometrioid adenocarcinoma and shows an inverse correlation with p53 expression. *Int J Gynecol Cancer* 24: 659-663.
- Witte D, Ali N, Carlson N, Younes M (2002) . Overexpression of the neutral amino acid transporter ASCT2 in human colorectal adenocarcinoma. *Anticancer Res* 22: 2555-2557.
- Xia H, Mao Q, Paulson HL, Davidson BL (2002) . siRNA-mediated gene silencing in vitro and in vivo. *Nat Biotechnol* 20: 1006-1010.
- Yagita H, Masuko T, Hashimoto Y (1986) . Inhibition of tumor cell growth in vitro by murine monoclonal antibodies that recognize a proliferation-associated cell surface antigen system in rats and humans. *Cancer Res* 46: 1478-1484.
- Yamauchi K, Sakurai H, Kimura T, Wiriyasermkul P, Nagamori S, Kanai Y, et al. (2009). System L amino acid transporter inhibitor enhances anti-tumor activity of cisplatin in a head and neck squamous cell carcinoma cell line. *Cancer Lett* 276: 95-101.
- Yanagida O, Kanai Y, Chairoungdua A, Kim DK, Segawa H, Nii T, et al. (2001) . Human L-type amino acid transporter 1 (LAT1) : characterization of function and expression in tumor cell lines. *Biochim Biophys Acta* 1514: 291-302.
- Yanagisawa N, Ichinoe M, Mikami T, Nakada N, Hana K, Koizumi W, et al. (2012) . High expression of L-type amino acid transporter 1 (LAT1) predicts poor prognosis in pancreatic ductal adenocarcinomas. *J Clin Pathol* 65: 1019-1023.
- Yanagisawa N, Hana K, Nakada N, Ichinoe M, Koizumi W, Endou H, et al. (2014) . High expression of L-type amino acid

transporter 1 as a prognostic marker in bile duct adenocarcinomas. *Cancer Med* 3: 1246-1255.

Yanagisawa N, Sato T, Hana K, Ichinoe M, Nakada N, Endou H, *et al.* (2015) . L-amino acid transporter 1 may be a prognostic marker for local progression of prostatic cancer under expectant management. *Cancer Biomark* "in press".

Yin Z, Jiang H, Syversen T, Rocha JB, Farina M, Aschner M (2008). The methylmercury-L-cysteine conjugate is a substrate for the L-type large neutral amino acid transporter. *J Neurochem* 107: 1083-1090.

Yoon JH, Kim IJ, Kim H, Kim HJ, Jeong MJ, Ahn SG, *et al.* (2005). Amino acid transport system L is differently expressed in human normal oral keratinocytes and human oral cancer cells. *Cancer Lett* 222: 237-245.

Youland RS, Kitange GJ, Peterson TE, Pafundi DH, Ramiscal JA, Pokorny JL, *et al.* (2013) . The role of LAT1 in (18)F-DOPA uptake in malignant gliomas. *J Neurooncol* 111: 11-18.

Yu JY, DeRuiter SL, Turner DL (2002) . RNA interference by expression of short-interfering RNAs and grampo de cabelo RNAs in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 6047-6052.

Lisboa, 24.10.2016

REIVINDICAÇÕES

1. Uma molécula de ANsi (ácido nucleico de interferência curto), em que a dita molécula visa especificamente pelo menos uma sequência selecionada a partir da SEQ ID NO: 1- SEQ ID NO: 104 e SEQ ID NO: 209 - SEQ ID NO: 297 ou pelo menos uma sequência complementar a uma sequência selecionada a partir da SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 104 e SEQ ID NO: 209 - SEQ ID NO: 297 **caracterizada por** sua utilização como um medicamento.

2. Uma molécula de ANsi de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada por** o ANsi visar especificamente pelo menos uma sequência selecionada a partir da SEQ ID NO 4, 6, 10, 13, 22, 34, 58, 61, 81, 83, 87 e 95 a 104, e em que a dita molécula reduz a expressão do gene LAT1.

3. Uma molécula de ANsi de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada por** o ANsi visar especificamente pelo menos uma sequência selecionada a partir da SEQ ID NO: 209, 216, 225, 226, 228, 235 a 238, 245, 260, 264, 267, 271, 272, 278, 279 e 281 a 297, e em que a dita molécula reduz a expressão do gene ASCT2.

4. Uma molécula de ANsi de acordo com qualquer reivindicação anterior, **caracterizada por** a dita molécula ter entre 19 e 25 pares de bases de comprimento.

5. Uma molécula de ANsi de acordo com qualquer reivindicação anterior, **caracterizada por** o ANsi ser selecionado a partir de ARNs, ARNs si ou ARNs h.

6. Uma molécula de ANsi de acordo com a reivindicação 5, **caracterizada por** o ANsi ser ARNs si.

7. Uma molécula de ANsi de acordo com qualquer reivindicação anterior, **caracterizada por** o ANsi compreender cadeias

suspensas a 5' e/ou 3'.

8. Uma molécula de ANsi de acordo com qualquer reivindicação anterior, **caracterizada por** o ANsi compreender pelo menos uma modificação química.

9. Uma molécula de ANsi de acordo com qualquer reivindicação anterior, **caracterizada por** a molécula de ANsi compreender pelo menos uma sequência selecionada a partir da SEQ ID NO: 105 a 208 e 298 a 386.

10. Uma molécula de ANsi de acordo com a reivindicação 9, **caracterizada por** a molécula de ANsi compreender pelo menos uma sequência selecionada a partir de 108, 110, 114, 117, 126, 138, 162, 165, 185, 187, 191 e 199 a 208, e em que preferentemente, a dita molécula reduz a expressão do gene LAT1.

11. Uma molécula de ANsi de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 8, **caracterizada por** a molécula de ANsi compreender pelo menos uma sequência selecionada a partir de 298, 305, 314, 315, 317, 324-327, 334, 349, 353, 356, 360, 361, 367, 368 e 370 a 386, e em que preferentemente, a dita molécula reduz a expressão do gene ASCT 2.

12. Uma composição farmacêutica **caracterizada por** compreender pelo menos um ANsi de acordo com qualquer das reivindicações anteriores e um veículo farmacêuticamente aceitável.

13. Uma molécula de ANsi de acordo com qualquer reivindicação anterior **caracterizada por** sua utilização no tratamento de cancro.

14. Uma molécula de ANsi de acordo com a reivindicação 13, **caracterizada por** o dito cancro ser selecionado a partir de

cancro da bexiga, sangue, cérebro, cólon, cabeça e pescoço, rim, fígado, pulmão, nódulos linfáticos, glândulas mamárias, músculo, ovário, pâncreas, próstata pele, estômago e útero.

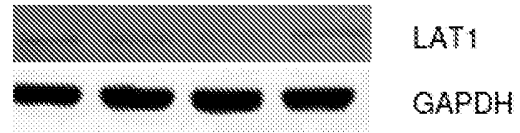
15. Utilização do ANsi de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 11 ou a composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 12 **caracterizada por** servir para preparar um medicamento para o tratamento de cancro.

16. Utilização de acordo com a reivindicação 15, **caracterizada por** o cancro ser selecionado a partir de cancro da bexiga, sangue, cérebro, cólon, cabeça e pescoço, rim, fígado, pulmão, nódulos linfáticos, glândulas mamárias, metastático, músculo, ovário, pâncreas, próstata pele, estômago e útero.

Lisboa, 24.10.2016

Figura 1

A



B

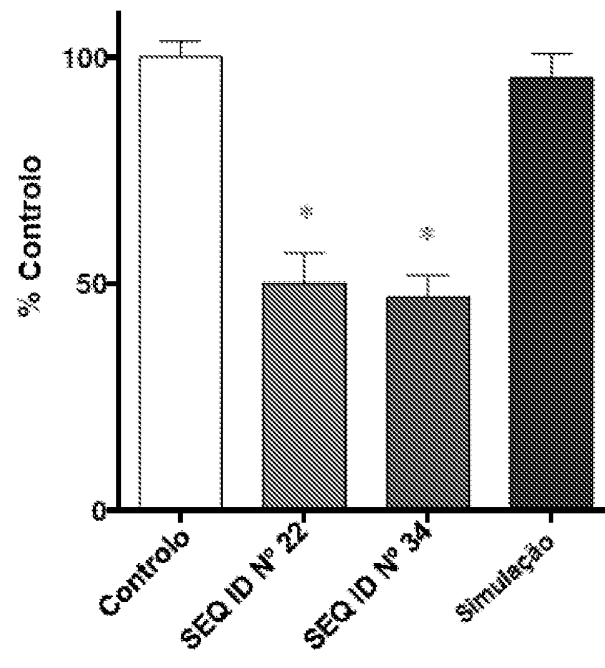


Figura 2

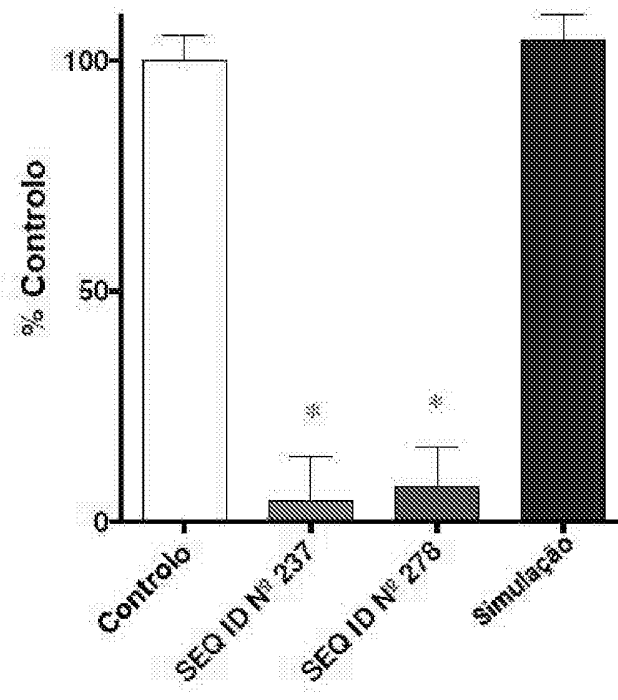
A**B**

Figura 3

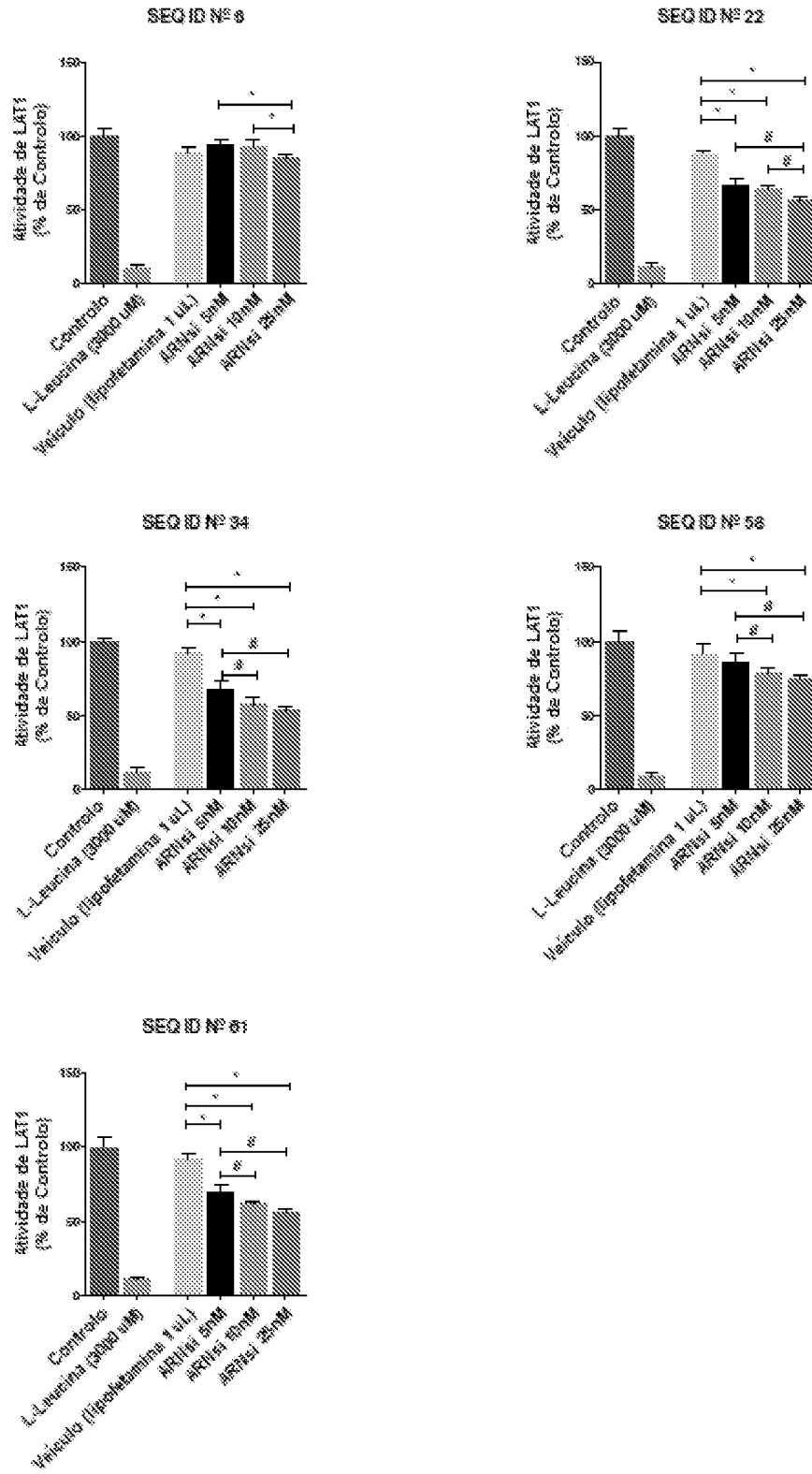


Figura 4

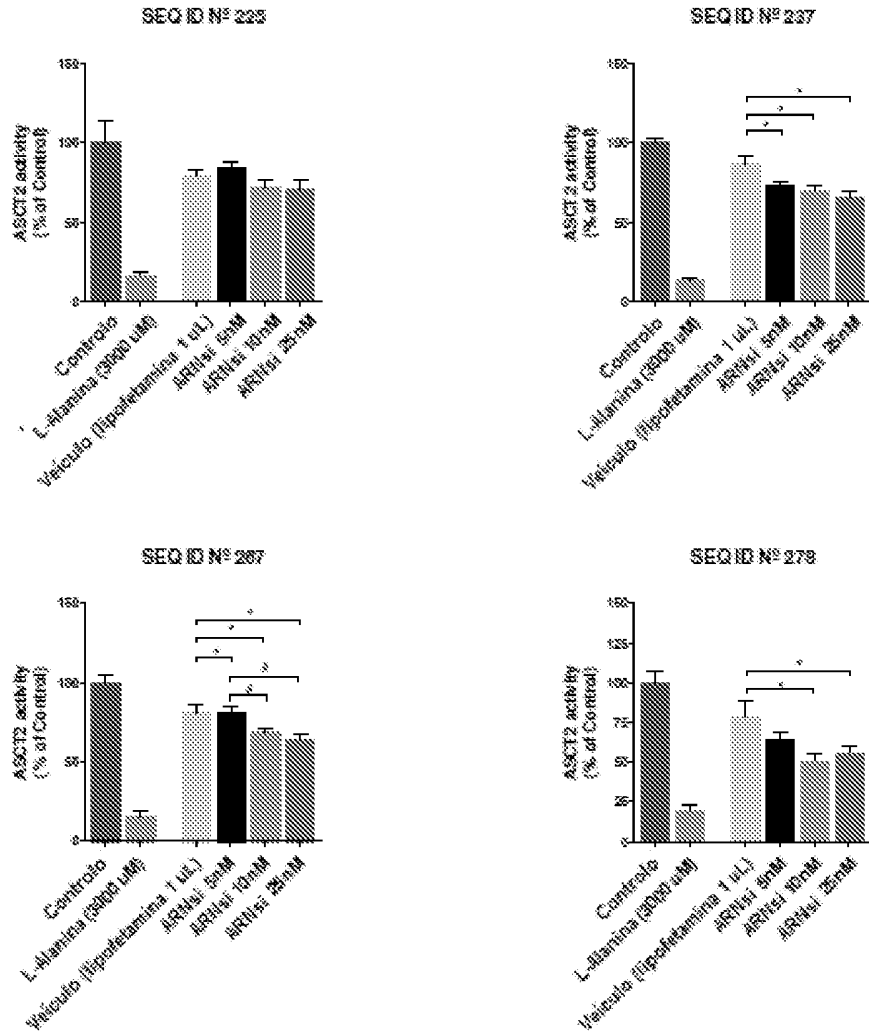


Figura 5

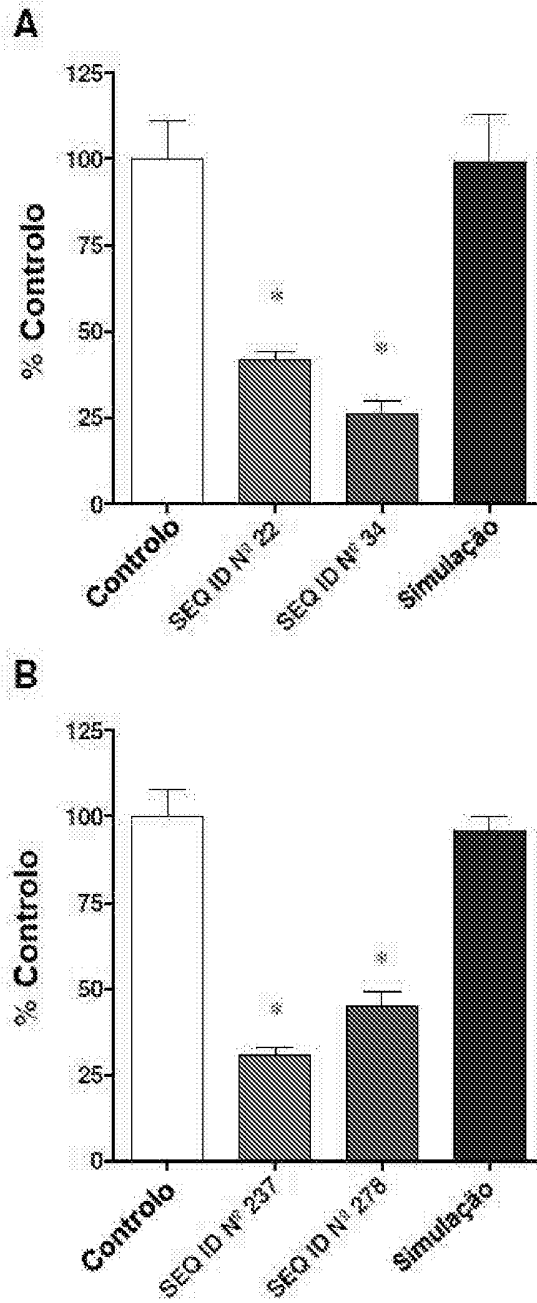


Figura 6

SEQ ID No	nucleótido	Sequências de interesse (21 nt)	ARNsi de LAT1	sense 5' (21 nt)	antisense 5' (21 nt)
SEQ ID NO 1	21	aagaggcggctcagggag	SEQ ID NO 105	AAGCGGCGCGCGCAGCGGG	CGCCGCUAGCGCGCGCCGCUU
SEQ ID NO 2	21	aaggagaggggaggag	SEQ ID NO 106	AAGGAAGAGGCGCGGAGAG	CUUCUCCCGCGCCUCUUCUU
SEQ ID NO 3	21	aaggagggggagagagc	SEQ ID NO 107	AAGAGGCGCGGAGAGAGGCG	GCAUCUUCUCCCGCGCCUUCU
SEQ ID NO 4	21	aagaagctgagggcagagc	SEQ ID NO 108	AAGAUGCUGGCGCCAGAGGC	GCUCUUGGCGGCGCAGCAUCU
SEQ ID NO 5	21	aaggaggggagggagagc	SEQ ID NO 109	AAGAGGCGGAGGCGGCGGCG	CGCGAGCGGCGCCGCGCUCU
SEQ ID NO 6	21	aacatgagctgctcaagagc	SEQ ID NO 110	AACAUCAGCGCUCUAAAGGC	GCCGUAGAGCAGCGGUGAUGUU
SEQ ID NO 7	21	aaggaggcaggtgctggagc	SEQ ID NO 111	AAGGAGGAGGCGGCGCGGG	CCCAGCGAGCCUCCUCCUU
SEQ ID NO 8	21	aactgaggggagctgagc	SEQ ID NO 112	AAUUGGCGGCGGCGACUAGGC	GGCGUAGGCGCCGCGCCGAAUU
SEQ ID NO 9	21	aatggaggagctgctgagc	SEQ ID NO 113	AAUUGGCGGCGGCGACUAGGC	AGGCGUAGGCGCGCGCCGAAUU
SEQ ID NO 10	21	aagctgaggtgagctgagc	SEQ ID NO 114	AAGCUCUGGAGGAGCUGGCG	GAGCAGCUCUGAUCGAGAGCUU
SEQ ID NO 11	21	aagctgcttctccctgagc	SEQ ID NO 115	AAGCCGCGCUCUCCCGCGCG	GCAGGUGGGGAAAGAGCGGCUU
SEQ ID NO 12	21	aagctgagctgctgctgagc	SEQ ID NO 116	AAGCUCUGGCGCGCGCGCG	GCAGAGGCGAGGCGCAGAGCUU
SEQ ID NO 13	21	aactgctcacagctgagagc	SEQ ID NO 117	AACUGCUCAGCGGUGAGGGCC	GGCCUUCAGCGCGUGUAGGAGUU
SEQ ID NO 14	21	aaggagagcagcagggctagc	SEQ ID NO 118	AAGGCGCGCGCGCGCGCGCG	CUGGAGCGCGGUGGGCGCGCUU
SEQ ID NO 15	21	aagctgagctgctgagc	SEQ ID NO 119	AAGCUCUGGCGCGCGCGCGCG	CAGGCGCAGGCGCGCAGGAGCUU
SEQ ID NO 16	21	aaggagagctgctcaatgca	SEQ ID NO 120	AAGGUGAGUUGGCGCGCGCG	UAGAUUGGAGCACAUACCGCUU
SEQ ID NO 17	21	aactgagctcacactgca	SEQ ID NO 121	AAUUCUAGAUCCCGCGCGCG	UGAGAAGUUGGCGCGCGCGCG
SEQ ID NO 18	21	aactgctcacagaggcagc	SEQ ID NO 122	AACUUCUAGAUUGGAGGCGCG	GGUGCGCUCGAAUGAGAGAGUU
SEQ ID NO 19	21	aaggcagcagcagggagagc	SEQ ID NO 123	AAGGCGCGCGCGCGCGCGCG	CCACAUCCAGUUGGUGGCGCG
SEQ ID NO 20	21	aactgagctgagggagagc	SEQ ID NO 124	AAACUGGAGUGGCGGAGAGC	AAUGGCGCGCGCGCGCGCG
SEQ ID NO 21	21	aactgagctgagggagagc	SEQ ID NO 125	AACUGGAGUGGCGGAGAGC	CAAUGGCGCGCGCGCGCGCG
SEQ ID NO 22	21	aactgagctgagggagagc	SEQ ID NO 126	AACAUGGAGUGGCGGAGAGC	GUAAUAGCGCGCGCGCGCG
SEQ ID NO 23	21	aactgagctgagggagagc	SEQ ID NO 127	AAUUCUAGAUUGGAGGCGCG	UGGAGCGGAGAUUGGAGAGUU
SEQ ID NO 24	21	aactgagctgagggagagc	SEQ ID NO 128	AAUUCGCGCGCGAGAGGAGAG	CAUUCUUCUGGAGCGGAGUU
SEQ ID NO 25	21	aactgagctgagggagagc	SEQ ID NO 129	AAUUCGCGCGCGAGAGGAGAG	UUCUGAGGGGUGGAGAGUU
SEQ ID NO 26	21	aactgagctgagggagagc	SEQ ID NO 130	AAUUCGCGCGCGAGAGGAGAG	UUUCUGAGGGGUGGAGAGUU
SEQ ID NO 27	21	aactgagctgagggagagc	SEQ ID NO 131	AACCGCGCGCGAGAGGCGCG	GGCGAGGUGGUGGAGAGUU

SEQ ID NO 28	21	aaactcgcctccctgcaatcat	SEQ ID NO 132	AAACCUUGTCCCTGGCCCAUCAU	AUGAUUGGTCAGGCGCAGGUBUJ
SEQ ID NO 29	21	aaactcgcctccctgcaatcac	SEQ ID NO 133	AACCUUGCCCTTGGCCCAUCAUC	GAUBAUUGGCAAGCGGSCAGGUBUJ
SEQ ID NO 30	21	aaactcgcctccctgcaatcac	SEQ ID NO 134	AACCUUGGCTTACUUCATCACTAC	GGUGGUGAAGUAGGCGCAGGUBUJ
SEQ ID NO 31	21	aaactcgcctccctgcaatcag	SEQ ID NO 135	AACUAUACCTCCGGGCGUUCAGUG	CAUGACCTCCAGGUGSAUAGUBUJ
SEQ ID NO 32	21	aaactcgcctccctgcaatcac	SEQ ID NO 136	AAUGGGUUCCTCUUGKACCAUCC	GGALKUGAACACAGGACCCALUJ
SEQ ID NO 33	21	aaactcgcctccctgcaatcac	SEQ ID NO 137	AAAGCCACCTGGCCCTCCUCCAUCC	GGAUUGGAGGGCAGGUGGCTUJ
SEQ ID NO 34	21	aaactcgcctccctgcaatcac	SEQ ID NO 138	AAAGCAUUCUUCUUCCTGUCAUCC	GALGACGGAGAAGAUGUCCUJ
SEQ ID NO 35	21	aaactcgcctccctgcaatcac	SEQ ID NO 139	AACUUCUUCAGUUCUUCUUCAAZ	GUUGAAGAAGGCGUGAAGAAGUBUJ
SEQ ID NO 36	21	aaactcgcctccctgcaatcac	SEQ ID NO 140	AACUUGGCTUUCUGGUGGSCCTCAG	CAGGGCCACGCGAGAGCCAGUBUJ
SEQ ID NO 37	21	aaactcgcctccctgcaatcac	SEQ ID NO 141	AAAGCCUUGAGCUUGAGGCGGCCC	GGCCGCTCAAGGCTUCAGGSCUBUJ
SEQ ID NO 38	21	aaactcgcctccctgcaatcac	SEQ ID NO 142	AAAGCTUUGAGCUUGAGGCGGCCC	GGGGCCGCUCAAGGCTUCAGGSCUBUJ
SEQ ID NO 39	21	aaactcgcctccctgcaatcac	SEQ ID NO 143	AAAGUGAACCUGGSCCTCUGSCTU	AGGCAGGGCCAGGUBUCACEUJ
SEQ ID NO 40	21	aaactcgcctccctgcaatcac	SEQ ID NO 144	AAACUUGGCTUUCUUCUUCUUCUUC	GAALCAGGCAAGGSCAGGUBUJ
SEQ ID NO 41	21	aaactcgcctccctgcaatcac	SEQ ID NO 145	AAAGACATCCGGGGAGUGUGGBC	GCCACACUUCACCGGGUGUGUBUJ
SEQ ID NO 42	21	aaactcgcctccctgcaatcac	SEQ ID NO 146	AAAAACAAGGCTCAGGUGGSCUUC	GAGCCACUUGGGGCUUGUBUJ
SEQ ID NO 43	21	aaactcgcctccctgcaatcac	SEQ ID NO 147	AAACAAGGCTCAGGUGGSCUUCUUC	AGGAGCCACUUGGGGCUUGUBUJ
SEQ ID NO 44	21	aaactcgcctccctgcaatcac	SEQ ID NO 148	AAACAAGGCTCAGGUGGSCUUCUUC	GAGGAGGCTACUUGGGGCUUBUJ
SEQ ID NO 45	21	aaactcgcctccctgcaatcac	SEQ ID NO 149	AAAGCCCAAGUGGCTUUCUUCUUCAG	CUGGAGGAGGCTACUUGGGSCUBUJ
SEQ ID NO 46	21	aaactcgcctccctgcaatcac	SEQ ID NO 150	AAUGGCTUUCUUCUUCUUCUUCUUC	GAUGCTTUGGAGGAGGCTCACUBUJ
SEQ ID NO 47	21	aaactcgcctccctgcaatcac	SEQ ID NO 151	AAAGCTUUCUUCUUCUUCUUCUUCUUC	GGGGACCACTUUCGCAUGAGGUBUJ
SEQ ID NO 48	21	aaactcgcctccctgcaatcac	SEQ ID NO 152	GGCCCTCCGCTGGCCGAGAGGAGAA	UUCUUCUUCGCGCTGCCGGCCGCTC
SEQ ID NO 49	21	aaactcgcctccctgcaatcac	SEQ ID NO 153	CTGGCGGSCCGAGGAGAGAGGAA	UUCUUCUUCUUCGCGCTGCCGG
SEQ ID NO 50	21	aaactcgcctccctgcaatcac	SEQ ID NO 154	GGAGAAAGGCTUUGGCTGCTCAA	UUGGCGGCTCAGCAUCUUCUUC
SEQ ID NO 51	21	aaactcgcctccctgcaatcac	SEQ ID NO 155	GAAGGAAAGAGGCTGCGGGAGAA	UUCUUCUUCGCGCTUUCUUCUUC
SEQ ID NO 52	21	aaactcgcctccctgcaatcac	SEQ ID NO 156	GGAGAAAGUUGGCTUUGGCTGCTCAA	UUGGCGGCTCAGCAUCUUCUUC
SEQ ID NO 53	21	aaactcgcctccctgcaatcac	SEQ ID NO 157	GGGGGAGUAGCTUUGGCTGCTCAA	UUCGCGUUCGAGGGUUCAGCGCTC
SEQ ID NO 54	21	aaactcgcctccctgcaatcac	SEQ ID NO 158	GACGCTCCACGGGCGUGGCTUCAA	UUGAGCAAGGCTTUGGGGCTGUC
SEQ ID NO 55	21	aaactcgcctccctgcaatcac	SEQ ID NO 159	GCUCGGCACTACCAUUCUCAA	UUGGAGAUUBUUGGUGGCTGAGC
SEQ ID NO 56	21	aaactcgcctccctgcaatcac	SEQ ID NO 160	CUCGGCACTACCAUUCUCAA	UUGGAGAUUBUUGGUGGUGCTGAG
SEQ ID NO 57	21	aaactcgcctccctgcaatcac	SEQ ID NO 161	CUCGCUUGCTGGCCUUCUCAA	UUGAGGAAGGCGGGCAGCGAG
SEQ ID NO 58	21	aaactcgcctccctgcaatcac	SEQ ID NO 162	CUUCGCCACTUUCUUCUCAA	UUGAGCAAGGAGGUGGCTGAG
SEQ ID NO 59	21	aaactcgcctccctgcaatcac	SEQ ID NO 163	GGAGCCCGAGGAGGCGAGCTCAA	UUGGCGUUCCTUUCGAGGACCC
SEQ ID NO 60	21	aaactcgcctccctgcaatcac	SEQ ID NO 164	GCUCGCTUUCUUCUUCUCAA	UUCAGGCTCAGGAGCAGCGAGC
SEQ ID NO 61	21	aaactcgcctccctgcaatcac	SEQ ID NO 165	CGUAGCAUUCUUCUUCUCAA	UUCAGGCTUUCGAGGAGCGAGC
SEQ ID NO 62	21	aaactcgcctccctgcaatcac	SEQ ID NO 166	GGAGGCTUUCGCGCTGCTCAA	UUGGCGGCGGCAAGGCTAUC
SEQ ID NO 63	21	aaactcgcctccctgcaatcac	SEQ ID NO 167	GGGCTUUCUUCUUCUUCUCAA	UUCCTGAUCUUGGAGCAGGAGCTC

SEQ ID NO 64	21	cggagaggggagtgctca	SEQ ID NO 168	CGGAAAGGGUGAUGUGUCAA	UUGGACACAUACACCUCUCCG
SEQ ID NO 65	21	tgtgtccaaactcagatccaa	SEQ ID NO 169	UGUGUCCAAUCUAGAUCCAA	UUGGGAUUAGAUUGGACACA
SEQ ID NO 66	21	gacccaactctctctctgaa	SEQ ID NO 170	GAUCCCAACUUCUUAURUGAA	UUCAAAHGAAAGUUGGGAUUC
SEQ ID NO 67	21	ctctcattgaaaggcaccaa	SEQ ID NO 171	CUUCUCAUURUGAGGACCACAA	UUGGUGCCUUCAAAUGAGAAG
SEQ ID NO 68	21	tctcattgaaaggcaccaa	SEQ ID NO 172	UUCUCAUURUGAAGGCCACCAA	UUGGUGUCCUUCAAAUGAGAAG
SEQ ID NO 69	21	accaaactggatctggggaa	SEQ ID NO 173	ACCAAACUGGAUGUGGGGAA	UUCCCCACAUCCAGURUGGU
SEQ ID NO 70	21	cttggatctggaggatggaa	SEQ ID NO 174	CUUUGCCUUAUGGGAGGAIUGAA	UUCCAUCCUCCAUAGGCCAAAG
SEQ ID NO 71	21	tggaggatggaaactactgaa	SEQ ID NO 175	UGGAGGAUGGAUUAUCUUGAA	UUCANGUAUUCUCCAUCCUCCA
SEQ ID NO 72	21	tgaatttctcacaagggaaa	SEQ ID NO 176	UGAAUUCUGUACACAGAGGAAA	UUUCCUCUGUGACCGAUAUUA
SEQ ID NO 73	21	cgtrccagaggaaatgataaa	SEQ ID NO 177	CGUCACAGAGGAAAUUGAUCAA	UUGAUCAUURUCUUCUGUGAGG
SEQ ID NO 74	21	aaagatcaactctacagaa	SEQ ID NO 178	AAUGAUCACCCUACACAGAA	UUCUUGHAGGGUUGAUCAUUU
SEQ ID NO 75	21	aatgatcaactctacagaa	SEQ ID NO 179	AAUGAUCACCCUACACAGAA	UUCUUGHAGGGUUGAUCAUUU
SEQ ID NO 76	21	gctgggtcactgctgacaa	SEQ ID NO 180	GCUGGUGUAGGUGUGUACCAA	UUGGUCAEACCGUACACCAGC
SEQ ID NO 77	21	catggcagggactctggaaa	SEQ ID NO 181	CGUGGCCGUGGACUUCGGGAA	UUCCCSAGUCCACGGCCACG
SEQ ID NO 78	21	gctcgtctggactctgca	SEQ ID NO 182	GUUCUUCUGGUCUCUGUCA	UUGACGAGGCCGAAAGCAEAG
SEQ ID NO 79	21	tcttctgggggtctcggaaa	SEQ ID NO 183	UUUUUCUGGGGUGUCCCGGGAA	UUCCGGAGCCUCCAGGAAGAA
SEQ ID NO 80	21	gcctctctcgtctctcaaa	SEQ ID NO 184	GCUGUCUACGCCUUCUCAA	UUGGAGAGGGCGUAGAGCAGC
SEQ ID NO 81	21	ggaaactctctcgtctcaaa	SEQ ID NO 185	GGACAUUCUUCUCCGUCAUCAA	UUGAUGACGGAGAGAGAUUCC
SEQ ID NO 82	21	caaatctctcagctctcaaa	SEQ ID NO 186	CAACUUCUUCAGCUUCUUEAA	UUGAAGAAGCGUAGAAGAGUUG
SEQ ID NO 83	21	tgatctggctgctcaccagaa	SEQ ID NO 187	UGAUCUGGCGUGCCACCAGAA	UUCUSUGGCCASCACAGAUCA
SEQ ID NO 84	21	gacttggctgctcaccagaa	SEQ ID NO 188	GAUCUGGCGUGCCACCAGAA	UUUCUGUGGGCGAGCCAGAUUC
SEQ ID NO 85	21	tgaactgaggggatcaaa	SEQ ID NO 189	UGAGCUUSAGCGGCCCAUCAA	UUGAUGGGCCUCCUCAAAGCUCA
SEQ ID NO 86	21	tgaagaggccatcaaggctgaa	SEQ ID NO 190	UGAGCGGCCCAUCAAGGUGAA	UUCACCUUGAUGGGCCGCCUCA
SEQ ID NO 87	21	gactcgtctctctctgaaa	SEQ ID NO 191	GAUCGCCGUCUUCUUCUGGAA	UUCGAGAGGGAGACGGGGBAUC
SEQ ID NO 88	21	ctctctgggggttggctggaaa	SEQ ID NO 192	CUUCUUCGGGUCUGGGUGGAA	UUCACCCAGACCCCGAAGAG
SEQ ID NO 89	21	tctctgggggtcaggctggaaa	SEQ ID NO 193	UUUCUUGGGGUCUGGUGGAAA	UUUCACCCAGACCCCGAAGAA
SEQ ID NO 90	21	tctctgggggtcaggctggaaa	SEQ ID NO 194	UUUCUUGGGGUCUGGUGGAAA	UUUCUCCACAGACCCCGAAGAA
SEQ ID NO 91	21	cttgggggtcaggctggaaa	SEQ ID NO 195	CUUCGSSGUCUGGUGSSAAA	UUUUUCCACAGACCCCGGAG
SEQ ID NO 92	21	cggggtcaggctggaaa	SEQ ID NO 196	CGGGGUCUGGUGGAAA	UUUGUUUUCACAGACCCCGG
SEQ ID NO 93	21	ctggttggaaaacaaagctcaaa	SEQ ID NO 197	CUUGGUGAAAACAAAGCCCAA	UUGGGCUUGUJUULUUCACCCAG
SEQ ID NO 94	21	caagactctctcgtctgaaa	SEQ ID NO 198	CACGACCGCUCUGUGUCAGAA	UUUCGACACAGSACGGGUCGUG

	nucléotido	Sequências de interesse (19 nt) <i>Sequência alvo: APMV1n humano</i>	SEQ ID NO	sense 5' (19 nt)	antisense 3' (19 nt)
SEQ ID NO 95	19	aagatgctggccgcacaaagc	199	GAUGCUGGCCGCCAAGAGC	GCUCUUGGCGGCCAGCAUC
SEQ ID NO 96	19	aatctacgctggctaacggt	200	CAUACGCTGTCUACACGGC	GCCGUUGAGCAGTGGUGAUG
SEQ ID NO 97	19	aagctctggatagagcggct	201	GCUCUGGAUCCGATGCGCUC	GAGCAGCUCGSAUCCAGAGC
SEQ ID NO 98	19	aacgtctacagcgtgaaggct	202	CUGCUACAGCGUGAAGGCC	GGCCUUCACGCUUGUAGCAG
SEQ ID NO 99	19	aactgtgtgtggcattatc	203	CAUUGGUCUGGCCAUUUAUAC	GUUUAUUGCCAGCACAAUG
SEQ ID NO 100	19	aaggacatcttctcgtatc	204	GGACAUUUUUCUCCGUCUAC	GAUGACGGGAGAAAGAUUCC
SEQ ID NO 101	19	cttggcacttactgtctaa	205	UCGCCACCUUACCUUCCUCAA	UUGAGCAGGUUAGGUGGCGA
SEQ ID NO 102	19	ggacatcttctcgtatc	206	ACAUUUUUCUCCGUCUCAA	UUGAUGACGGGAGAGAUUU
SEQ ID NO 103	19	tgatctgtctgtctcacagaa	207	AUCUUGGCUUGCGCCACAGAA	UUCUUGGCGCGCACCCAGAU
SEQ ID NO 104	19	gatggcgtcttcttctcggaa	208	UCGCCGUCUUCUUCUUGGAA	UUCCAGAAAGGAGACGGCGA

Figura 7

SEQ. ID NO	nucleótido	Sequências de interesse (21 nt)	ARNsi de ASCT2	posse 5' (21 nt)	embosame 3' (21 nt)
SEQ. ID NO 209	21	aaggagaggaatatacaccggaa	SEQ. ID NO 298	AACAGAGGAUAUACACCGGAA	UUCCGGUGAUUUCUUCUUU
SEQ. ID NO 210	21	aaatatacctggaaacacagatg	SEQ. ID NO 299	AUAUUAACCGGAACTCAGGGHG	CACCCUUGBUUCGGUGAUUU
SEQ. ID NO 211	21	aaccaggggaaggggccccgt	SEQ. ID NO 300	AACAGGGGUAAGGGUGCCCGU	ACGGGCACCUUCACCCUGGUU
SEQ. ID NO 212	21	aaggagccccagggagcaggag	SEQ. ID NO 301	AAGGUGCCCGUGGGGCGACGAS	CUCCUGCCCCACGGGCACCUU
SEQ. ID NO 213	21	aacatccctgggctggtagtg	SEQ. ID NO 302	AACAUCCUGGGCUUUGUAGHG	CACUACCAAGCCACGAGUUU
SEQ. ID NO 214	21	aagcagagggcagagggag	SEQ. ID NO 303	AASCUHGGGGCCUGAAGGGGAS	UUCUUUCAGGCCCCAGCUUU
SEQ. ID NO 215	21	aaggggagcttcttatcctgt	SEQ. ID NO 304	AAGGGAGGCUUCUUAUUCGGU	AGCGGUAUAAGGAGUUCUCCUU
SEQ. ID NO 216	21	aactctcaatagagaccacc	SEQ. ID NO 305	AACUUCUUAUUSAGSCCACC	GSUUGCCUUAUUGAAGGAGUU
SEQ. ID NO 217	21	aatgagagcacaaggtctg	SEQ. ID NO 306	AUUGAGGCCACCAUUGUUCUG	CAGAACCAUUGGUGGCUCAUU
SEQ. ID NO 218	21	aagctcctggagagagagat	SEQ. ID NO 307	AAGUACUUGGAGAUUSAGGAAU	AUCCUUCUUCUUCACGUAUUU
SEQ. ID NO 219	21	aagtcacatctggctctctg	SEQ. ID NO 308	AAGUACUUCUUSUGUUGCCUG	CAGGAGCACAGAAUUGUACUU
SEQ. ID NO 220	21	aaataatcttacccttctctg	SEQ. ID NO 309	AAAAACCCUACCGUUCUUCUG	CAGSAGCGGUAUGGGGUUUUU
SEQ. ID NO 221	21	aaataccctaccctctctctgt	SEQ. ID NO 310	AAAACCCUACCCUUCUUCUGU	ACAGSAAAGCGUAGSAGGUUUU
SEQ. ID NO 222	21	aaactctactctctctctctg	SEQ. ID NO 311	AAACCCUACCCGUUUCUUGUG	CACAGSAAAGCGUAGSAGGUUU
SEQ. ID NO 223	21	aacctctactctctctctctg	SEQ. ID NO 312	AACCCUACCCGUUUCUUGUGG	CCACAGSAAAGCGUAGSAGGUUU
SEQ. ID NO 224	21	aagttctctggagagagataat	SEQ. ID NO 313	AAGUCCUGGAGGAGSAAUAUU	AUAUUAUUCUUCUUCACGUAUU
SEQ. ID NO 225	21	aaataatggctgggctcagctac	SEQ. ID NO 314	AUAUUGGCCUGUGGCCAAGCAC	GUCCUUSGGCCACGCCAUUUU
SEQ. ID NO 226	21	aatggagggctcagagcctac	SEQ. ID NO 315	AAUGGCCUGGCCCAAGCACAUU	GAUGUUCUUGGCTCACGCCAUU
SEQ. ID NO 227	21	agctacatcagctctctctctg	SEQ. ID NO 316	AAGCACUUCAGCCGUUUCUUC	GAUGAAACGGCUGAUGUGGCUU
SEQ. ID NO 228	21	aactggagccgttctctctctc	SEQ. ID NO 317	AACUUGGACCGUGGCCGCUUC	GAGCGGGCACCTGHCUAUGUU
SEQ. ID NO 229	21	aaatgatacctaccctctctctg	SEQ. ID NO 318	AAAGAUCAUACCAUCCUUGGU	AECNSGALUGGUGAUGAUCUUU
SEQ. ID NO 230	21	aagatcaccctaccctctctctg	SEQ. ID NO 319	AAGAUCAUACCAUCCUUGUUC	GACCAGGALUGGUGAUGAUCUU
SEQ. ID NO 231	21	aagctagtaaacctctctctctg	SEQ. ID NO 320	AAGCAUUAUUCUUCUUGGUG	CGACCGGAGGUAUGAUGUUCU
SEQ. ID NO 232	21	aacctctctctctctctctctc	SEQ. ID NO 321	AAUCCUCCGGUCGACCAUUAU	GAUUAUGUUGGACTGGGAGGUU
SEQ. ID NO 233	21	aattgagagggtaacgtctctg	SEQ. ID NO 322	AUUGUAGAGGUGAACGUUCUS	CAGAGGUAUUCUUCUUAUUU
SEQ. ID NO 234	21	aagggtgagctctctctctctctg	SEQ. ID NO 323	AAGGUGACCCUUCUGGGGCGAG	CUUGCCCCACAGAGCGUACCUU
SEQ. ID NO 235	21	aaatgagagggagctctctctg	SEQ. ID NO 324	AAAUUAUACGGGACTGUACCG	CCGUACGGUCCACGUAUUUU
SEQ. ID NO 236	21	aattatctggagctctctctctg	SEQ. ID NO 325	AAUUAUAGUGGACTGUACCGGA	UUCGUUAUUCGGUCCAGUAUUU
SEQ. ID NO 237	21	aattatctggagctctctctctg	SEQ. ID NO 326	AAUUAUAGUGGACTGUACCGGAG	UUCGUUAUUCGGUCCAGUAUUU
SEQ. ID NO 238	21	aagcagagagctctctctctctg	SEQ. ID NO 327	AAGCACAGGACCCUUGAGUUCU	AUCAUUCACGGGCUUCUGUUCU
SEQ. ID NO 239	21	aaggtgagagggagctctctctg	SEQ. ID NO 328	AAGUAGAGGAGUAGGUGUUCU	GGGGCACGCUUCUUCUUCUUCU
SEQ. ID NO 240	21	aagagtgagctctctctctctg	SEQ. ID NO 329	AAGAGUAGAGGAGGUGUUCU	AUUCASGGGACGCUUCUUCUUCU

SEQ ID NO 241	21	aaaggaaacccccctctcaaac	SEQ ID NO 330	AAGGAAACCCCCUCUCAAAC	GUUUGAGGAGGGGGUUUCUUU
SEQ ID NO 242	21	aaacccctctcaaacacta	SEQ ID NO 331	AAACCCCCUCCUCAAACACUA	UAGUGUUUBAGGAGGGGGUUU
SEQ ID NO 243	21	aaacactatcggggccccta	SEQ ID NO 332	AACACUAUCGGGGGCCCGCA	UGGGGGCCCCCGAUAGUUGUUU
SEQ ID NO 244	21	aaactatcggggcccgcag	SEQ ID NO 333	AACACUAUCGGGGGCCCGCAG	CUGGGGGCCCCCGAUAGUUGUU
SEQ ID NO 245	21	aaagagggaatataccgggaa	SEQ ID NO 334	AAGAGAGGAUAUUAACCCGAA	UUCCGGUGAUUAUUAUCUUCUUU
SEQ ID NO 246	21	tatcaccggaaaccaggggaa	SEQ ID NO 335	UAUCACCGGAACAGGGGUSAA	UUACACCCUGGUAUCGSSUGAUA
SEQ ID NO 247	21	gcaaggaggaggaaggagtaaa	SEQ ID NO 336	GCAGGAGGUGGAGGGGGAUSAA	UUCAUCCCCUCCACCUCUCCGC
SEQ ID NO 248	21	ctttggatggcgtctgggaa	SEQ ID NO 337	CUUUGGUGUUGGCGCUGCGSAA	UUCCCGCAGCGCCACACCCAAAG
SEQ ID NO 249	21	ctgcggaaagctgggggactgaa	SEQ ID NO 338	CUGCGGAAGCURGGGGCCUGAA	UUCAGGCCCCAGCUCUCCGCGAG
SEQ ID NO 250	21	gctgctatcgcctctcaaa	SEQ ID NO 339	GCUCUUAUUCGCUUCUUCAAA	UUGAAGAAGCGGGAUUAAGCAGC
SEQ ID NO 251	21	ccgctctcaactctcaaa	SEQ ID NO 340	CEGCUUCUUCAAUCUCCUUCAAA	UUGAAGGABUUGAAGAAGAGCGG
SEQ ID NO 252	21	cagttctcggggctggcaa	SEQ ID NO 341	CAGUUCUUGGUGGCUUGGCAA	UUGCCAGCCACCAGGAAACAUU
SEQ ID NO 253	21	actcttgcccgcctgggcaa	SEQ ID NO 342	ACUUCUUGCCGCCUUGGCAA	UUGCCAAGCGGGGCAAAAGAGU
SEQ ID NO 254	21	ctactctctcaactcggaa	SEQ ID NO 343	CUACUUCUUCUUCACCCGCAA	UUUGC GGSUUAAGAGGAAAGUAG
SEQ ID NO 255	21	tactctctcaactcggaaa	SEQ ID NO 344	UACUUCUUCUUCACCCGCAA	UUUGC GGSUUAAGAGGAAAGUA
SEQ ID NO 256	21	ctctctcaactcggcaaaa	SEQ ID NO 345	CUUCUUCUUCACCCGCAAAA	UUUBUGGGGGGGAAGAGAGGAG
SEQ ID NO 257	21	caagctgcctcgtgagtgaa	SEQ ID NO 346	CACCGUCGCCUGAUGAUGAA	UUCAUCAUCAGCGGGCAGCGUG
SEQ ID NO 258	21	gagtagcgtcgtgagtgaa	SEQ ID NO 347	GALUAGUUGGUGGAGGASAA	UUCUUCUUCACGCACUUCUUC
SEQ ID NO 259	21	gagtagcgtcgtgagtgaa	SEQ ID NO 348	GAASUUGGUGGAGGAGAAUAA	UUUUAUUCUUCUCCACGCAUUC
SEQ ID NO 260	21	ggagaaataaggggggccaa	SEQ ID NO 349	GGAGAUAUAUUGGGUGGCGCAA	UUUGGCCACGCAUUAUUAUUC
SEQ ID NO 261	21	gcccatacggagtcaccgtaaa	SEQ ID NO 350	GCCCALUGGGCCACCGUCAA	UUUGACGGGUGGCGCCCGAUGGGC
SEQ ID NO 262	21	gcaagctctggactctgaaa	SEQ ID NO 351	GCAGUUCUUGGACUUCUGUAAA	UUUACGAAGUCCAAAGGACUUGC
SEQ ID NO 263	21	agcagctctggactctgaaa	SEQ ID NO 352	AISCAGUCCUUGGACUUCUGUAAA	UUACGAAAGUCCAAAGGACUUGC
SEQ ID NO 264	21	catcatctcgaagcagtcgaa	SEQ ID NO 353	CAUCAUCCUUGGAAAGCAGUCAA	UUUGACUGGCUUCGAGGAUGAUG
SEQ ID NO 265	21	actctggccatctctgaa	SEQ ID NO 354	ACUUCUGGCCAUCAUCCUUGAA	UUUGAGGAAUUAUUGGCGCAGAGU
SEQ ID NO 266	21	tgatacctctcaalgtagaa	SEQ ID NO 355	UGUACCGUCCUUCAAUUGUAGAA	UUUCUAUUAUUGAGGACGGUACA
SEQ ID NO 267	21	ccggctctgacctctctaaa	SEQ ID NO 356	CCGGUCCUUGUACCGUCCUCAA	UUUGAGGACGGUACAGGACCGG
SEQ ID NO 268	21	gggggtagggactctctcaaaa	SEQ ID NO 357	GGGGGCAAGGACUUCUCAA AAA	UUUUGGAGGAGUUCUUGGCGCCC
SEQ ID NO 269	21	tgggggtagggactctctcaaaa	SEQ ID NO 358	UUGGGGCAAGGACUUCUCAA AAA	UUUUGGAGGAGUUCUUGGCGCCC

SEQ ID NO 270	21	ctggggccaggattctctca	SEQ ID NO 359	ctggggccaggacduccuc	uuaggagagbuccuagccccag
SEQ ID NO 271	21	tgactctgacggagtcgaaa	SEQ ID NO 360	ussaccgguacggagucgaaa	uucucgacucgguacgglucca
SEQ ID NO 272	21	acaggctcggatgatactca	SEQ ID NO 361	acagagctcugagugauacaa	uuuuuucaacucagggcucuguj
SEQ ID NO 273	21	gctcagtgatcaaaagaaa	SEQ ID NO 362	gctcugagugugauaacagugaa	uucauuuuaucaacucagggc
SEQ ID NO 274	21	ctccagtcctccagggaaa	SEQ ID NO 363	ctgcccagucctccacugaggaa	uuuuccuaguggggacubgscag
SEQ ID NO 275	21	cagtcctccagggaggaaa	SEQ ID NO 364	ctgcccctccacugaggaggaa	uuuuccuucacuggggacucg
SEQ ID NO 276	21	ggaaggaaacctctctca	SEQ ID NO 365	ggaaggaaacctctctcuaa	uuaggaggggguuuuccuucc
SEQ ID NO 277	21	gaaagaaacctctctcaaa	SEQ ID NO 366	gaaagaaacctctctcuaaa	uuaggaggggguuuuccuucc
SEQ ID NO 278	21	tgccaggtgcctctgagaa	SEQ ID NO 367	ugccacggucgccucugagaa	uuucacaggggacacggugcca
SEQ ID NO 279	21	acgctgcctctgaaagaaa	SEQ ID NO 368	acggucgccucugagaggaaa	acggucgccucagaggggaccgu
SEQ ID NO 280	21	gagaaagaaatcagtcagaa	SEQ ID NO 369	gagaaagaaatcagtcgaaa	uuacauagacugauuuccuuc
SEQ ID NO 281	19	gagaaagaaatcaccgaaa	SEQ ID NO 370	gagaaagaaatcaccggaaa	uuuccggugauuuucucuc
SEQ ID NO 282	19	gctggggcttggaggggag	SEQ ID NO 371	ctkcuuicauugagggctacc	gguggccuicauugagggag
SEQ ID NO 283	19	taatgggtggcttaagcac	SEQ ID NO 372	uaauggcguggccaaagcac	gugcuugggccacgccauua
SEQ ID NO 284	19	tgctgggcaagtatact	SEQ ID NO 373	ugccgugggcctaaagcacuc	gauuugccuuuggccacggcca
SEQ ID NO 285	19	catggacgggtctgcctc	SEQ ID NO 374	cauggacggugccgccucuc	gagcgcggcacgduccaug
SEQ ID NO 286	19	aatgacgggacagtcag	SEQ ID NO 375	aauiacguggaccguacgg	ccguacgguccacgguauu
SEQ ID NO 287	19	attcgtggaccgttcgaa	SEQ ID NO 376	uuuacguggaccguacggaa	uccguadgguccaccgularu
SEQ ID NO 288	19	ttacgtggaccgttcagg	SEQ ID NO 377	uuuacguggaccguacggag	cuuuguaaggucacgguaa
SEQ ID NO 289	19	gcacagagctggagggat	SEQ ID NO 378	gcacagagctcugagugau	aucaacucagccucugujcc
SEQ ID NO 290	19	ggagaaatataccgaaa	SEQ ID NO 379	gagaggaauuicaccggaa	uuuccgugauuuucucuc
SEQ ID NO 291	19	agaaataatgctggctaa	SEQ ID NO 380	agaauauggcgugggccaa	uuiggccaccgccauuuuucu
SEQ ID NO 292	19	ttatctgaaagcagtcga	SEQ ID NO 381	ucauuccugaaagcagucaa	uuagcuuccucgaggaua
SEQ ID NO 293	19	gctctgtaccctctca	SEQ ID NO 382	ggucucugugccgucucuaa	uuaggaccgguaacaggacc
SEQ ID NO 294	19	gactgtgagggcggaaa	SEQ ID NO 383	gaccguacggagucgagaa	uuuugacucucgaggguc
SEQ ID NO 295	19	agagctgagttgatacaa	SEQ ID NO 384	agagctcugagugauacaa	uuuuaucaacucagggcuc
SEQ ID NO 296	19	ccaggtcctctgagaa	SEQ ID NO 385	ccacggucgccucugagaa	uuucacagggcggaccgugg
SEQ ID NO 297	19	ggctcctctgagagaaa	SEQ ID NO 386	ggucgccucugagagaaa	uuucucucacagggcggacc