

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

(21) PI 0712437-6 A2

(22) Data de Depósito: 01/06/2007  
(43) Data da Publicação: 10/07/2012  
(RPI 2166)



(51) Int.CI.:  
A01N 43/04  
A61K 31/70

**(54) Título:** MÉTODO DE DISTRIBUIÇÃO

**(30) Prioridade Unionista:** 01/06/2006 US 60/809,842

**(73) Titular(es):** Duke University

**(72) Inventor(es):** Bruce A. Sullenger

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

**(86) Pedido Internacional:** PCT US2007012927 de  
01/06/2007

**(87) Publicação Internacional:** WO 2007/143086de  
13/12/2007

**(57) Resumo:** MÉTODO DE DISTRIBUIÇÃO. A presente invenção refere-se, em geral, a siRNA e, em particular, a um método para obter distribuição alvejada de siRNAs e a compostos adequados para uso em tal método.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**MÉTODO DE DISTRIBUIÇÃO**".

O presente pedido reivindica prioridade do Pedido Provisório U.S. No. 60/809.842, depositado em 1 de Junho de 2006, o conteúdo todo 5 do qual é incorporado aqui por referência.

A presente invenção foi feita com suporte do Governo sob a Concessão No. R01 HL079051 concedida pelo National Institutes of Health. O Governo tem determinados direitos sobre a invenção.

**CAMPO TÉCNICO**

10 A presente invenção refere-se em geral, a RNA de interferência (RNAi) (por exemplo, siRNA) e, em particular, a um método para obter distribuição alvejada de RNAi's e a compostos adequados para uso em tal método.

**ANTECEDENTES**

15 Interferência de RNA (RNAi) é um mecanismo celular primeiro descrito em *C. elegans* por Fire e outros em 1998, pelo qual duplas de RNA de 21-23 nt disparam degradação de mRNAs cognatos (Fire e outros, *Nature* 391(6669): 806-811 (1998)). A promessa de aplicações terapêuticas de RNAi tem sido evidente desde a primeira demonstração de que RNAs de 20 interferência curtos exógenos (siRNAs) podem silenciar a expressão de gene através dessa via em células de mamífero (Elbashir e outros, *Nature* 411(6836): 494-8 (2001)). As propriedades de RNAi que são atraentes para produtos terapêuticos incluem 1) especificidade rigorosa pelo gene alvo, 2) imunogenicidade relativamente baixa dos siRNAs e 3) simplicidade de design e testagem dos siRNAs.

30 Um desafio técnico crítico para aplicações clínicas baseadas em RNAi é a distribuição de siRNAs através da membrana plasmática de células *in vivo*. Uma série de soluções para esse problema foram descritas, incluindo lipídios catiônicos (Yano e outros, *Clin Cancer Res.* 10(22): 7721-6 (2004)), vetores virais (Fountaine e outros, *Curr Gene Ther.* 5(4): 399-410 (2005), Devroe e Silver, *Expert Opin Biol Ther.* 4(3): 319-27 (2004), Anderson e outros, *AIDS Res Hum Retroviruses.* 19(8): 699-706 (2003)), injeção em alta

pressão (Lewis e Wolff, *Methods Enzymol.* 392: 336-50 (2005)) e modificações dos siRNAs (por exemplo, química, lipídio, esteróide, proteína) (Schiffelers e outros, *Nucleic Acids Res.* 32(19): e149 (2004), Urban-Klein e outros, *Gene Ther.* 12(5): 461-6 (2005), Soutschek e outros, *Nature* 432(7014): 173-8 (2004), Lorenz e outros, *Bioorg Med Chem Lett.* 14(19): 4975-7 (2004), Minakuchi e outros, *Nucleic Acids Res.* 32(13): e109 (2004), Takeshita e outros, *Proc Natl Acad Sci USA.* 102(34): 12177-82 (2005)). Contudo, a maioria das abordagens descritas até o momento têm a desvantagem de distribuição de siRNAs às células não especificamente, sem considerar o tipo de célula.

Para uso *in vivo*, é importante alvejar reagentes de siRNA terapêuticos a tipos de célula particulares (por exemplo, células cancerígenas), desse modo, limitando os efeitos colaterais que resultam de distribuição não específica, bem como redução da quantidade de siRNA necessário para tratamento, uma consideração de custo importante. Um estudo recente descreveu um método promissor para a distribuição alvejada de siRNAs no qual anticorpos que se ligam a receptores na superfície celular tipo de célula específicos foram fundidos à protamina e usados para distribuir siRNAs à células via endocitose (Song e outros, *Nat. Biotechnol.* 23(6): 709-17 (2005)).

A presente invenção se refere a uma abordagem muito mais simples para a distribuição específica de siRNAs e uma que, pelo menos em uma modalidade, usa apenas as propriedades do RNA. Com SELEX (evolução sistemática de ligantes através de enriquecimento exponencial), foi demonstrado que RNAs estruturais capazes de ligação a uma variedade de proteínas com alta afinidade e especificidade podem ser identificados. O método de distribuição da presente invenção explora o potencial estrutural de ácidos nucleicos (por exemplo, RNA) para alvejar siRNAs a um receptor na superfície celular em particular e, assim, um tipo de célula específico. A invenção, assim, proporciona um método para distribuir especificamente ácidos nucleicos que compreendem uma porção de alvejamento (por exemplo, um aptâmero) e uma porção de silenciamento de RNA (por exemplo, um siRNA) que é reconhecido e processado por Dicer de uma maneira similar ao processamento de microRNAs.

## SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção se refere, de modo geral, a RNA de interfe-  
rência (RNAi) e a um método de distribuição do mesmo. Mais especifica-  
mente, a invenção se refere a um método para obter distribuição alvejada de  
5 siRNA que envolve o uso de um ácido nucleico que compreende o siRNA a  
ser distribuído e uma porção de alvejamento, em que a porção de alveja-  
mento é um aptâmero.

Objetivos e vantagens da presente invenção se tornarão claros  
a partir da descrição que segue.

## 10 BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Figuras 1A-1D. Mecanismo esquemático e proposto de ação de  
quimeras de aptâmero-siRNA. (Fig. 1A) A quimera de aptâmero-siRNA se  
liga ao receptor na superfície celular (retângulo verde claro), sofre endocito-  
se e, subseqüentemente, é liberada do endossoma para entrar na via de  
15 RNAi. A via de silenciamento intracelular é mostrada para comparação. Um  
pré-microRNA (pré-miRNA) sai do núcleo quando de clivagem por Drosha, é  
reconhecido pela endonuclease Dicer, a qual processa o pré-miRNA em um  
miRNA maduro de 21 nt. O miRNA maduro é subseqüentemente incorpora-  
do no complexo de silenciamento (RISC), onde ele media a degradação al-  
20 vejada de mRNA. (Fig. 1B) Estruturas de RNA previstas para o aptâmero  
PSMA-específico A10 (SEQ ID N<sup>º</sup> 5) e os derivados de quimera de aptâmero  
A10-siRNA. A região do aptâmero A10 responsável pela ligação ao PSMA é  
esboçada em magenta. Essa região sofreu mutação no aptâmero mutante  
A10, mutA10-Plk1 (SEQ ID N<sup>ºs</sup> 8 e 9 (bases com mutação mostradas em  
25 azul). (A estrutura secundária do aptâmero A10 é mostrada). (Fig. 1C) Liga-  
ção tipo de célula-específica de quimeras de aptâmero A10-siRNA. A ligação  
na superfície celular de quimeras de aptâmero-siRNA fluorescentemente  
rotuladas (mostrado em verde) foi avaliada através de análise citométrica de  
fluxo e descobriu-se que estava restrita à células LNCaP expressando PS-  
30 MA. Células não coradas são mostradas em púrpura. (Fig. 1D) Ligação na  
superfície celular de quimeras de aptâmero-siRNA requer a região intacta de  
A10 responsável pela ligação ao receptor na superfície PSMA.

Figuras 2A-2C. Quimeras de aptâmero A10-siRNA se ligam especificamente ao antígeno na superfície celular, PSMA. (Fig. 2A) Ligação de quimeras de aptâmero A10-siRNA fluorescentemente rotuladas pode competirativamente com aptâmero A10 em excesso. A ligação é mostrada como Contagens % em G1. (Fig. 2B) Ligação na superfície celular de aptâmero A10 e das quimeras de aptâmero A10-siRNA à células LNCaP é rompida com um anticorpo específico ao PSMA humano. A ligação na superfície celular de aptâmero A10 fluorescentemente rotulado e quimeras de aptâmero A10-siRNA foi avaliada através de análise citométrica de fluxo e é apresentada como a Intensidade Média de Fluorescência (MFI). Valores de MFI + ou - competidor foram usados para calcular a competição %. (Fig. 2C) Ligação na superfície celular de aptâmero A10 e quimeras de aptâmero A10-siRNA à células LNCaP é reduzida quando de tratamento com 5- $\alpha$ -dihidrotestosterona (DHT a 2 nM), como um resultado de expressão reduzida de PSMA na superfície celular. A ligação é visualizada como Contagens % em G1 (gate 1).

Figuras 3A-3C. Silenciamento tipo de célula específico de genes com quimeras de aptâmero-siRNA. (Fig. 3A) Uma quimera de aptâmero A10-Plk1-siRNA silencia a expressão de Plk1 em LNCaP, mas não em células PC-3 (painéis superiores). Silenciamento se correlaciona com rotulação eficiente em células LNCaP com A10-Plk1 FITC-rotulado, conforme determinado através de análise citométrica de fluxo (painéis inferiores). (Fig. 3B) Quimeras de aptâmero A10-Bcl-2-siRNA silenciam a expressão de Bcl-2 em LNCaP, mas não em células PC-3 (painéis superiores). Silenciamento se correlaciona com rotulação de células LNCaP com A10-Bcl-2 FITC-rotulado (painéis inferiores). (Fig. 3C) Silenciamento A10-Plk1-mediado de Plk1 é reduzido quando de tratamento com 5- $\alpha$ -dihidrotestosterona (DHT a 2 nM) de células LNCaP.

Figuras 4A-4C. Silenciamento quimera de aptâmero-siRNA-mediado de genes Plk1 e Bcl-2 resulta em efeitos tipo de célula específicos sobre a proliferação de apoptose. (Fig. 4A) Proliferação de células PC-3 e LNCaP transfectadas (+ lipídios catiônicos) com um siRNA de Plk1 ou de controle ou tratadas (- lipídios catiônicos) com aptâmero A10 ou quimeras de

aptâmero A10-siRNA (A10-CON e A10-Plk1) foi determinada através de incorporação de <sup>3</sup>H-timidina. (Fig. 4B) Apoptose de células PC-3 e LNCaP tratadas com cisplatina, aptâmero A10 ou quimeras de aptâmero A10-siRNA (A10-CON e A10-Plk1) ou transfectadas com um siRNA de Plk-1 ou de controle foi avaliada através de análise citométrica de fluxo usando um anticorpo PE-conjugado específico para caspase 3 ativa. (Fig. 4C) Apoptose de células PC-3 e LNCaP tratadas com cisplatina, aptâmero A10 ou quimeras de aptâmero A10-siRNA (A10-CON e A10-Bcl2) ou transfectadas com um siRNA de Bcl-2 ou de controle foi avaliada conforme descrito acima.

Figuras 5A-5C. Silenciamento de gene quimera de aptâmero-siRNA-mediado ocorre através da via de RNAi. (Fig. 5A) Células LNCaP transfectadas com siRNAs, aptâmero A10 ou quimeras de aptâmero A10-siRNA (A10-CON e A10-Plk1) na presença ou ausência de um siRNA contra Dicer. (Fig. 5B) Ensaio de Dicer *in vitro*. RNAs tratados com ou sem Dicer foram decompostos sobre um gel de poliacrilamida de não-desnaturação e corados com brometo de etídio. Quimeras fita simples, ssA10-Plk1 e ssA10-CON (sem siRNA anti-senso). (Fig. 5C) Ensaio de Dicer *in vitro*. Quimeras de aptâmero-siRNA aneladas à fita de siRNA anti-senso complementar rotulada com <sup>32</sup>P foram incubadas com ou sem Dicer e os produtos da clivagem foram subseqüentemente decompostos sobre um gel de poliacrilamida de não-desnaturação. Os siRNAs anti-senso não eram complementares e, assim, não se anelam ao A10.

Figuras 6A e 6B. Atividade antitumor de quimeras de aptâmero A10-Plk1-siRNA em um modelo de câncer de próstata em camundongo (Fig. 6A). RNAs quiméricos foram administrados intratumoralmente em um modelo de camundongo trazendo células de câncer de próstata PSMA-negativas, PC-3 (painele esquerdo) ou células de câncer de próstata PSMA-positivas, LNCaP (painele direito) implantadas bilateralmente nos flancos traseiros de camundongos nus. Os volumes médios do tumor foram analisados usando um ANOVA de uma via. \*\*\*,  $P < 0,0001$ ; \*\*,  $P < 0,001$ ; \*,  $P < 0,01$ . ( $n = 6-8$  tumores). (Fig. 6B) Curvas de tumor para tumores derivados de células LNCaP individuais mostrando a regressão de crescimento de tumor após tra-

tamento com A10-Plk1, mas não tratamento com DPBS, A10-CON ou mutA10-Plk1.

Figuras 7A e 7B. Expressão tipo de célula-específica de PSMA. Expressão de PSMA foi avaliada através de (Fig. 7A) análise citométrica de fluxo e (Fig. 7B) imunoblotting usando anticorpos específicos ao PSMA humano. PSMA é expresso sobre a superfície de células de câncer de próstata LNCaP, mas não células de câncer de próstata PC-3 ou células HeLa, uma linhagem de células de câncer não derivada de próstata.

Figuras 8A e 8B. Medição de afinidade relativa de A10 e derivados de quimeras de aptâmero A10-siRNA. (Fig. 8A) Afinidades de ligação à superfície celular dos RNAs fluorescentemente rotulados (A10, A10-CON e A10-Plk1) foram avaliadas através de análise citométrica de fluxo. (Fig. 8B) Plat de MFI% (intensidade média de fluorescência) em G1 para dados em parte ((Fig. 8A). As afinidades relativas de A10 e quimeras de aptâmero para a superfície celular de LNCaP foram determinadas através de incubação de quantidades crescentes de RNAs A10, A10-CON ou A10-Plk1 fluorescentemente rotulados com células LNCaP. A fluorescência celular foi medida com citometria de fluxo. Descobriu-se que as quimeras de aptâmero e A10 têm afinidades comparáveis para a superfície celular de LNCaP.

Figuras 9A e 9B. Silenciamento de gene mediado por siRNAs funcionais contra quinase 1 Polo-semelhante (Plk1) e Bcl-2. Silenciamento de gene foi obtido através de distribuição por lipídio catiônico de siRNA específico ao Plk1 humano (Fig. 9A) ou bcl-2 humano (Fig. 9B) à células PC-3 e LNCaP. Silenciamento foi avaliado através de análise citométrica de fluxo (painéis superiores) e imunoblotting (painel inferior).

Figuras 10A e 10B. Silenciamento siRNA-mediado de Dicer. Silenciamento de expressão do gene de Dicer foi avaliado através de (Fig. 10A) citometria de fluxo e através de (Fig. 10B) ensaio imunoabsorvente enzima-ligado (ELISA) usando um anticorpo específico para Dicer humana. Células HeLa foram transfectadas com um controle, siRNA de não silenciamento ou um siRNA contra a Dicer humana. Silenciamento através do siRNA de Dicer foi específico e resultou em redução >80% na expressão de gene

da Dicer.

Figuras 11A e 11B. Quimeras de aptâmero não disparam uma resposta de interferon. (Fig. 11A) Células PC-3 e (Fig. 11B) LNCaP tratadas com siRNAs (con, Plk1 ou Bcl-2), aptâmero A10 ou quimeras de aptâmero (A10-CON, A10-Plk1 ou A10-Bcl2) foram avaliadas com relação à produção de interferon-β (IFN-β) através de um ensaio imunoabsorvente enzima-ligado (ELISA) usando um anticorpo específico para IFN-β. Células tratadas com o indutor de interferon Poli(I:C) foram usadas como um controle positivo nesse experimento.

10 **DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO**

A presente invenção se refere a um método para obter distribuição alvejada de RNAi's (por exemplo, siRNAs e RNAs de hairpina curtos (shRNA)). Esse método pode ser usado, por exemplo, para alvejar a distribuição de siRNAs a tipos de célula específicos (por exemplo, células trazendo 15 uma proteína, carboidrato ou lipídio em particular (por exemplo, um determinado receptor na superfície celular)). Em contraste à maioria dos métodos de distribuição descritos até o momento, o método descrito aqui pode ser realizado usando um composto que compreende apenas RNA. A molécula usada é uma molécula químérica compreendendo uma porção de alvejamento de ácido nucleico (por exemplo, um aptâmero) ligada a uma porção 20 de silenciamento de RNA (por exemplo, um siRNA (compreendendo RNA modificado ou não modificado)). (De acordo com a invenção, a porção de alvejamento (por exemplo, aptâmero) pode compreender RNA, DNA ou qualquer oligonucleotídeo baseado em ácido nucleico modificado).

25 A invenção é exemplificada abaixo com referência a RNAs químéricos de aptâmero-SiRNA que: i) se ligam especificamente à células de câncer de próstata (e endotélio vascular da maioria dos tumores sólidos expressando o receptor na superfície celular PSMA (em virtude do uso de um aptâmero de RNA selecionado contra PSMA humano (A10) (Lupold e outros, 30 Cancer Res. 62(14): 4029-33 (2002)) e ii) distribuem siRNAs terapêuticos que alvejam a quinase semelhante a pólo 1 (Plk1) (Reagan-Shaw e Ahmad, FASEB J. 19(6): 611-3 (2005)) e Bcl2 (Yang e outros, Clin Cancer Res.

10(22): 7721-6 (2004)) (dois genes de sobrevivência superexpressos na maioria dos tumores humanos (Takai e outros, *Oncogene* 24(2): 287-291 (2005), Eckerdt e outros, *Oncogene* 24(2): 267-76 (2005), Cory e Adans, *Cancer Cell* 8(1): 5-6 (2005)). Esses RNAs quiméricos atuam como substratos para a Dicer, assim, dirigindo os siRNAs para a via de RNAi e silencian-  
5 do seus mRNAs cognatos (Fig. 1A). (Assim, os aptâmeros-siRNA quiméricos podem, na verdade, ser encarados como aptâmero, uma vez que siRNAs resultam de clivagem pela Dicer). Espera-se que os reagentes em particular descritos no Exemplo abaixo tenham aplicação no tratamento de câncer de  
10 próstata e outros.

A invenção, contudo, não está limitada à quimeras específicas para PSMA. Antes, a presente abordagem pode ser adaptada para gerar produtos terapêuticos para tratar uma ampla variedade de doenças, além de câncer. Os dois requisitos para essa abordagem para uma determinada doença são que genes específicos para silenciamento em uma população definida de células produzam um benefício terapêutico e que receptores na superfície sejam expressos especificamente sobre a população de células de interesse que pode distribuir ligantes de RNA intracelularmente. Muitas doenças satisfazem ambos esses requisitos (exemplos incluem células T CD4+  
15 para inibição de HIV, receptor de insulina e diabetes, células receptoras no fígado e genes de hepatite, etc.).

Porções de alvejamento e silenciamento apropriadas podem ser projetadas/selecionadas usando métodos conhecidos na técnica baseado na natureza da molécula a ser alvejada e gene(s) a ser(em) silenciado(s) (vide  
25 Nimjee e outros, *Annu. Rev. Med.* 56: 555-83 (2005) e Pedido de Publicação U.S. 20060105975). As quimeras podem ser sintetizadas usando métodos de síntese de RNA conhecidos na técnica (por exemplo, via síntese química ou via RNA polimerases). Aptâmeros de RNA curtos (25-35 bases) que se ligam a vários alvos com altas afinidades foram descritos (Pestourie e ou-  
30 tros, *Biochimie* (2005), Nimjee e outros, *Annu. Rev. Med.* 56: 555-83 (2005)). Quimeras projetadas com tais aptâmeros curtos têm uma fita longa de apro-  
ximadamente 45-55 bases. RNA quimicamente sintetizado é passível de várias

modificações, tal como peguilação, que podem ser usadas para modificar sua meia-vida e biodisponibilidade *in vivo*. (Vide também, por exemplo, Pedidos U.S. N<sup>os</sup> 20020086356, 20020177570, 20060105975 e 20020055162 e USPs 6.197.944, 6.590.093, 6.399.307, 6.057.134, 5.939.262 e 5.256.555, 5 além disso, vide também Manoharan, Biochem. Biophys. Acta 1489: 117 (1999); Herdewijn, Antisense Nucleic Acid Drug Development 10: 297 (2000); Maier e outros, Organic Letters 2: 1819 (2000) e referências citadas no mesmo.)

As quimeras da invenção podem ser formuladas em composições farmacêuticas que podem incluir, além das quimeras, um veículo, diluente ou excipiente farmaceuticamente aceitável. A natureza precisa da composição dependerá, pelo menos em parte, da natureza da quimera e da via de administração. Regimes de dosagem ótimos podem ser prontamente estabelecidos por aqueles versados na técnica e podem variar com a quimera, 10 o paciente e o efeito desejado. Geralmente, a quimera pode ser administrada IV, IM, IP, SC ou topicalmente, conforme apropriado.

Na prática, o método de distribuição alvejado da presente invenção pode evitar efeitos colaterais adversos associados à distribuição de siRNAs à células não-alvejadas. Por exemplo, siRNAs são conhecidos por ativar receptores do tipo de aporte dentro de células dendríticas plasmacitoides, levando à secreção de interferon, o que pode resultar em vários sintomas adversos (Sledz e outros, Nat. Cell Biol. 5(9): 834-9 (2003), Kariko e outros, J. Immunol. 172(11): 6545-9 (2004)). No caso de distribuição de siRNAs que disparam apoptose, outro perigo que é evitado através do uso da 20 presente abordagem é a morte de células saudáveis. Pode ser esperado que os tratamentos envolvendo distribuição sistêmica de quimeras da invenção venham a requerer substancialmente menos reagente alvejado (quando comparado com não-alvejado) (por exemplo, siRNA) em virtude da redução 25 na captação por células não-alvejadas. Assim, o método descrito pode reduzir substancialmente o custo da terapia.

Uma vez que acredita-se que RNA seja menos imunogênico do que proteína, pode ser esperado que os RNAs quiméricos da invenção pro-

duzam menos ativação não específica do sistema imune do que abordagens de distribuição proteína-mediadas. Isso pode ser uma diferença importante, uma vez que uma série de proteínas atualmente usadas para produtos terapêuticos são conhecidas por ocasionalmente causar reações alérgicas perigosas, especialmente após administração repetida (Park, Int. Anesthesiol. Clin. 42(3): 135-45 (2004), Shepherd, Mt. Sinai J. Med. 70(2): 113-25 (2003)).

Kim e outros propuseram que processamento Dicer-mediado de RNAs pode resultar em incorporação mais eficiente de siRNAs resultantes em complexos RISC (Kim e outros, Nat. Biotechnol. 23(2): 222-6 (2005)).

Essa sugestão está baseada na observação de que RNAs fita dupla mais longos (~29 bps), os quais são processados pela Dicer, eliminam seus mRNAs cognatos em menores concentrações do que siRNAs (19-21 bps), os quais não são processados pela Dicer. Assim, embora não desejando estar preso pela teoria, especula-se que, em virtude do fato de as quimeras da invenção serem processadas pela Dicer, elas podem ser mais potentes em termos de capacidade de silenciamento de gene do que dsRNA de 19-21 bps que não são processados.

Vantajosamente, as quimeras da invenção:

- i) reconhecem um receptor na superfície celular,
- ii) internalizam em uma célula expressando o receptor e
- iii) são reconhecidas pela maquinaria de processamento de miRNA ou siRNA (tal como Dicer).

Ainda, a clivagem do produto de siRNA pode ser carregada em um complexo de silenciamento de RNAi ou miRNA (tal como RISC). Assim, pelo menos em uma modalidade preferida, o processamento de quimeras da invenção imita como as células reconhecem e processam miRNAs (por exemplo, os presentes RNAs químéricos podem ser substratos para a Dicer). (Vide também McNamara e outros, Nature Biotechnology 24: 1005-1015 (2006)).

Determinados aspectos da invenção podem ser descritos em maiores detalhes no Exemplo não limitativo que segue.

EXEMPLODETALHES EXPERIMENTAIS

A menos que de outro modo notado, todos os produtos químicos foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co., todas as enzimas de restrição foram obtidas da New England BioLabs, Inc. (NEB) e todos os produtos de cultura de célula foram adquiridos da Gibco BRL/Life Technologies, uma divisão da Invitrogen Corp.

siRNAs

seqüência alvo de con siRNA: AATTCTCCGAACGTGTCACGT (SEQ ID Nº 1)

10 seqüência alvo de siRNA de Plk1: AAGGGCGGCTTGCCAAGTGC(SEQ ID Nº 2)

seqüência alvo de siRNA Bcl-2: NNGTGAAGTCAACATGCCTGC(SEQ ID Nº 3)

seqüência alvo de siRNA de Dicer: NNCCTCACCAATGGGTCTTT (SEQ ID Nº 4) (onde "N" é qualquer um de A, T, G ou C)

15 siRNAs fluorescentes rotulados com FITC na extremidade 5' da fita anti-senso foram adquiridos da Dharmacon.

Quimeras de aptâmero

A10:

5'GGGAGGACGAUGCGGAUCAGCCAUGUUUACGUCACUCCUUGUCAAU

20 CCUCAUCGGCAGACGACUCGCCGA3'(SEQ ID Nº 5)

Fita senso de A10-CON:

5'GGGAGGACGAUGCGGAUCAGCCAUGUUUACGUCACUCCUUGUCAAU  
CCUCAUCGGCAGACGACUCGCCGA**AAUUCUCCGAACGUGUCACGU3'**  
(SEQ ID Nº 6)

25 siRNA anti-senso A10-CON:

5'ACGUGACACGUUCGGAGAAdTdT3'(SEQ ID Nº 7)

Fita senso de A10-Plk1:

5'GGGAGGACGAUGCGGAUCAGCCAUGUUUACGUCACUCCUUGUCAAU  
CCUCAUCGGCAGACGACUCGCCGA**AAAGGGCGGCUUUGCCAAGUGC**

30 3'(SEQ ID Nº 8)

siRNA anti-senso A10-Plk1:

5'GCACUUGGCAAAGCCGCCdTdT3'(SEQ ID Nº 9)

Fita senso de A10-Bcl-2:

5'GGGAGGACGAUGCGGAUCAGCCAUGUUUACGUCACUCCUUGUCAAU  
CCUCAUCGGCAGACGACUCGCCGAAAGUGAAGUACAACAU~~GGCCUGC3~~  
'(SEQ ID N° 10)

5 siRNA anti-senso A10-Bcl-2:

5'GCAGGCAUGUUGACUUCACUU-3'(SEQ ID N° 11)

Fita senso de mutA10-Plk1:

5'GGGAGGACGAUGCGGAUCAGCCAUC~~CCUUACGUCACUCCUUGUCAAU~~  
CCUCAUCGGCAGACGACUCGCCGAAAGGGCGGCUUUGCCAAGUGC

10 3'(SEQ ID N° 12)

siRNA anti-senso A10-Plk1:

5'GCACUUGGCAAAGCCGCCdTdT3'(SEQ ID N° 13)

5'-iniciador A10:

5'TAATACGACTCACTATA~~GGGAGGACGATGCGG3~~'(SEQ ID N° 14)

15 3'-iniciador A10:

5'TC~~GGGCGAGTCGTCTG3~~'(SEQ ID N° 15)

Modelo iniciador A10:

5'GGGAGGACGATGCGGATCAGCCATGTTACGTCACTCCTGTCAATCC  
TCATCGGCAGACGACTGCCGA3'(SEQ ID N° 16)

20 3'-iniciador de siRNA de controle:

5'ACGTGACACGTT~~GGAGAATTC~~CGGAGTCGTCTG3'(SEQ ID N° 17)

3'-iniciador de siRNA de Plk1:

5'GCAC~~TTGGCAAAGCC~~CC~~TT~~CGGGCGAGTCGTCTG3'(SEQ ID N° 18)

3'-iniciador de siRNA de Bcl-2:

25 5'GCAGGCAT~~GTTGACTT~~CACT~~TT~~CGGGCGAGTCGTCTG3'(SEQ ID N° 19)

iniciador A10 mutante:

5'AGGACGATGCGGATCAGCCATCCTACGTCA3'(SEQ ID N° 20)

Modelos de DNA de fita dupla foram gerados através de PCR como segue. O Modelo iniciador A10 foi usado como um *modelo* para as PCRs com o 5'-iniciador A10 e um dos seguintes 3'-primers: 3'-iniciador A10 (para o aptâmero A10), 3'-iniciador de siRNA de controle (para a quimera A10-CON), 3'-iniciador de siRNA de Plk1 (para a quimera A10-Plk1) ou 3'-iniciador de

siRNA de Bcl-2 (para a quimera A10-Bcl-2). *Modelos* para transcrição foram gerados dessa forma ou através de clonagem desses produtos de PCR em um vetor de clonagem (pGem-t-easy, Promega (Madison, WI)) e usando os clones como *modelos* para PCR com os primers apropriados.

5 O DNA que codifica a quimera mutA10-Plk1 foi preparado através de PCRs seqüenciais. Na primeira reação, o Modelo iniciador A10 foi usado como o *modelo* com o iniciador mutante A10 como o 5'-iniciador e o 3'-iniciador de siRNA de Plk1 como o 3'-iniciador. O produto dessa reação foi purificado e usado como o *modelo* para uma segunda reação com o 5'-10 iniciador A10 e o 3'-iniciador de siRNA de Plk1. O produto de PCR resultante foi clonado no pGem-t-easy e seqüenciado. Esse clone foi usado como o *modelo* em uma reação de PCR com 5'-iniciador A10 e o 3'-iniciador Plk1 para gerar o *modelo* para transcrição. aptâmero fluorescente e quimeras de Aptâmero foram transcritos *in vitro* na presença de 5'-(FAM)(espaçador 9)-G-15 3' (G FAM-rotulado) (TriLink), conforme descrito abaixo.

#### Transcritos *In vitro*

Transcrições foram feitas com ou sem G FAM-rotulado a 4 mM. Para reações de transcrição de 250 µL: 50 µL de 5X tampão T7 RNAP otimizado para transcrições de 2'F (PEG 8000 a 20% peso/v, Tris-HCl a 200 mM, 20 pH de 8,0, MgCl<sub>2</sub> a 60 mM, HCl de espermidina a 5 mM, triton X-100 a 0,01% peso/v, DTT a 25 mM), 25 µL de 10X 2'F-dNTPs (2'F-CTP a 30 mM, 2'F-UTP a 30 mM, 2'OH-ATP a 10 mM, 2' OH-GTP a 10 mM), 2 µL de IPPI (Roche), 300 pmols de *modelo* para PCR de quimeras de aptâmero, 3 µL de polimerase T7 (Y639F) (Padilla e Sousa, Nucleic Acids Res. 27(6): 1561-3 25 (1999)), composto até 250 µL com H<sub>2</sub>O milliQ.

#### Previsão da estrutura secundária de RNA

RNA Structure Program versão 4.1 ([rna.chem.rochester.edu/RNAstructure](http://rna.chem.rochester.edu/RNAstructure)) foi usado para prever as estruturas secundárias de aptâmero A10, A10-3 e derivados de quimeras de aptâmero A10-siRNA. As estruturas 30 mais estáveis com as menores energias livres para cada oligo de RNA foram comparadas.

### Cultura de células

Células HeLa foram mantidas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> em DMEM suplementado com soro fetal bovino a 10%. As linhagens de célula de carcinoma de próstata LNCaP (ATCC# CRL-1740) e PC-3 (ATCC# CRL-1435) 5 foram crescidas em meio RPMI 1640 e F12-K de Ham, respectivamente, suplementado com soro fetal bovino a 10% (FBS).

### Expressão de PSMA na superfície celular

Expressão de PSMA na superfície celular foi determinada através de citometria de fluxo e/ou imunoblotting usando anticorpos específicos 10 ao PSMA humano.

**Citometria de fluxo:** Células HeLa, PC-3 e LNCaP foram tripsinizadas, lavadas três vezes em solução salina tamponada com fosfato (PBS) e contadas usando um hemocitômetro. 200.000 células (1 X 10<sup>6</sup> células/mL) foram ressuspensas em 500 µl de PBS + soro bovino fetal (FBS) a 4% e incubadas em temperatura ambiente (RT) durante 20 min. As células foram, então, peletizadas e ressuspensas em 100 µL de PBS + FBS a 4% contendo 20 µg/mL de anticorpo primário contra PSMA (anti-PSMA 3C6: Northwest Biotherapeutics) ou 20 µg/mL de anticorpo de controle isotipo-específico. 15 Após uma incubação de 40 min em RT, as células foram lavadas três vezes com 500 µL de PBS + FBS a 4% e incubadas com uma diluição a 1:500 de anticorpo secundário (IgG-APC anti-camundongo) em PBS + FBS a 4% durante 30 min em RT. As células foram lavadas conforme detalhado acima, fixadas com 400 µL de PBS + formaldeído a 1% e analisadas através de citometria de fluxo.

25 **Imunoblotting:** células HeLa, PC-3 e LNCaP foram coletadas conforme descrito acima. Péletes de células foram ressuspensas em 1X tampão RIPA (NaCl a 150 mM, Tris-HCl a 50 mM, pH de 8,0, EDTA a 1 mM, NP-40 a 1%) contendo 1X coquetéis inibidores de protease e fosfatase (Sigma) e incubadas sobre gelo durante 20 min. As células foram, então, 30 peletizadas e 25 µg de proteína total dos sobrenadantes foram decompostos sobre um gel de SDS-PAGE a 7,5%. PSMA foi detectado usando um anticorpo específico ao PSMA humano (anti-PSMA 1D11; Northwest Biotherapeutics).

### Ligaçāo à superfície celular de quimeras de aptāmero

Células PC-3 ou LNCaP foram tripsinizadas, lavadas duas vezes com 500  $\mu$ L de PBS e fixadas em 400  $\mu$ L de solução FIX (PBS + formaldeído a 1%) durante 20 min em RT. Após lavagem das células para remover qualquer traço residual de formaldeído, os péletes de célula foram ressuspensas em 1X tampão de ligação (1X BB) (HEPES a 20 mM, pH de 7,4, NaCl a 150 mM, CaCl<sub>2</sub> a 2 mM, BSA a 0,01%) e incubadas a 37 °C durante 20 min. As células foram, então, peletizadas e ressuspensas em 50  $\mu$ L de 1XBB (pré-aquecido a 37 °C) contendo aptāmero A10 rotulado com FAM-G a 400 nM ou quimeras de aptāmero A10-siRNA rotuladas com FAM-G a 400 nM. Em virtude da baixa eficiência de incorporação de FAM-G durante a reação de transcrição, para comparação de ligação à superfície celular de A10-Plk1 e mutA10-Plk1, até 10  $\mu$ M de quimeras de aptāmero rotuladas com FAM-G foram usados. As concentrações de aptāmero e quimeras de aptāmero rotuladas com FAM-G para as medições de afinidade relativa variavam de 0 a 4  $\mu$ M. As células foram incubadas com RNA durante 40 min a 37 °C, lavadas três vezes com 500  $\mu$ L de 1X BB pré-aquecido a 37 °C e, finalmente, ressuspensas em 400  $\mu$ L de solução FIX pré-aquecida a 37 °C. As células foram, então, avaliadas usando citometria de fluxo conforme detalhado acima e as afinidades de ligação relativa à superfície celular do aptāmero A10 e derivados de quimeras de aptāmero A10-siRNA foram determinadas.

### Ensaios de competição por ligação na superfície celular

Células LNCaP foram preparadas conforme detalhado acima para os experimentos de ligação à superfície celular. Competição de 4  $\mu$ M de aptāmero A10 rotulado com FAM-G ou derivados de quimeras de aptāmero A10-siRNA foi feita com aptāmero A10 não rotulado (concentração variava de 0 a 4  $\mu$ M) em 1XBB pré-aquecido a 37 °C ou 2  $\mu$ g de anticorpo anti-PSMA 3C6 em PBS + FBS a 4%. As células foram lavadas três vezes conforme detalhado acima, fixadas em 400  $\mu$ L de FIX (PBS + formaldeído a 1%) e analisadas através de citometria de fluxo.

### Tratamento com 5- $\alpha$ -Dihidrotestosterona (DHT)

Células LNCaP foram crescidas em meio RPMI 1640 contendo

soro extraído em carvão ativado a 5% durante 24 h antes da adição de 5- $\alpha$ -dihidrotestosterona a 2 nM (DHT) (Sigma) em meio RPMI 1640 contendo FBS extraído em carvão a 5% durante 48 h. Expressão de PSMA foi avaliada através de imunoblotting, conforme detalhado acima. A expressão de PSMA na superfície celular foi analisada através de citometria de fluxo, conforme detalhado acima. Ligação à superfície celular de aptâmero A10 rotulado com FAM-G e quimeras de aptâmero A10-CON, A10-Plk1 e mutA10-Plk1 rotuladas com FAM-G foi feita conforme detalhado acima usando 40  $\mu$ M de RNA rotulado com FAM-G.

10 Ensaio de silenciamento de Gene

**siRNA:** (Dia 1) células PC-3 e LNCaP foram cultivadas em lâminas com 6 cavidades até 60% de confluência. As células foram transfectadas com siRNA a 200 nM ou 400 nM nos dias 2 e 4 usando Superfect Reagent (Qiagen), seguindo as recomendações do fabricante. As células foram coletadas no dia 5 para análise.

15 **Aptâmero A10 e quimeras de aptâmero A10-siRNA:** (Dia 1) células PC-3 e LNCaP foram cultivadas em lâminas com 6 cavidades em confluência de 60%. As células foram tratadas com aptâmero A10 a 400 nM ou quimeras de aptâmero A10-siRNA nos dias 2 e 4. As células foram cole-  
20 tadas no dia 5 para análise.

Silenciamento de gene foi avaliado através de citometria de fluxo ou imunoblotting usando anticorpos específicos ao Plk1 humano (Zymed) e Bcl-2 humano (Zymed), respectivamente.

25 **Citometria de fluxo:** células PC-3 e LNCaP foram tripsinizadas, lavadas três vezes em solução salina tamponada com fosfato (PBS) e contadas usando um hemocitômetro. 200.000 células ( $5 \times 10^5$  células/mL) foram ressuspensas em 400  $\mu$ L de tampão PERM/FIX (Pharmingen) e incubadas em temperatura ambiente (RT) durante 20 min. As células foram, então, pelletizadas e lavadas três vezes com tampão 1XPERM/WASH (Pharmingen).  
30 As células foram, então, ressuspensas em 50  $\mu$ L de tampão 1XPERM/WASH contendo 20  $\mu$ g/mL de anticorpo primário contra Plk1 humano ou Bcl-2 humano ou 20  $\mu$ g/mL de anticorpo de controle isotípo-

específico. Após 40 min de incubação em RT, as células foram lavadas três vezes com 500 µL de tampão 1XPERM/WASH e incubadas com uma diluição a 1:500 de anticorpo secundário (IgG-APC anticamundongo) em 1XPERM/WASH durante 30 min em RT. As células foram lavadas conforme 5 detalhado acima e analisadas através de citometria de fluxo.

**Imunoblotting:** células LNCaP foram transfectadas com siRNA de controle ou siRNAs ao Plk1 ou Bcl-2, conforme descrito acima. As células foram tripsinizadas, lavadas em PBS e péletes de células foram ressuspensas em 1X tampão RIPA e incubadas sobre gelo durante 20 min. As células 10 foram, então, peletizadas e 50 µg de proteína total dos sobrenadantes foram decompostos sobre gel de SDS-PAGE a 8,5% para Plk1 ou um gel de SDS-PAGE a 15% para Bcl-2. Plk1 foi detectado usando um anticorpo específico ao Plk1 humano (Zymed). Bcl-2 foi detectado usando um anticorpo específico ao Bcl-2 humano (Dykocytomation).

15 **Ensaio de Proliferação (síntese de DNA)**

células PC-3 e LNCaP previamente tratadas com siRNAs ou quimeras de aptâmero conforme detalhado acima, foram tripsinizadas e cultivadas em lâminas com 12 cavidades a ~20.000 células/cavidade. As células foram, então, forçadas em um bloco G1/S através da adição de hidróxi 20 uréia a 0,5 µM (HU). Após 21 h, as células foram liberadas do bloco de HU através da adição de meio carecendo de HU e incubadas com meio contendo  $^3$ H-timidina (1µCi/mL de meio) para monitorar a síntese de DNA. Após 24 h de incubação na presença de meio contendo  $^3$ H-timidina, as células foram lavadas duas vezes com PBS, lavadas uma vez ácido tricloroacético (TCA) a 25 5% peso/v (VWR), coletadas em 0,5 mL de NaOH a 0,5N (VWR) e colocadas em frascos de cintilação para medição da incorporação de  $^3$ H-timidina.

**Ensaio de Caspase 3 ativa**

Células PC-3 ou LNCaP foram transfectadas com siRNAs ao Plk1 ou Bcl-2 ou tratadas com quimeras de aptâmero A10-siRNA conforme 30 descrito acima. As células também foram tratadas com meio contendo 100 µM (1X) ou 200 µM (2X) de cisplatina durante 30 h como um controle positivo para apoptose. As células foram, então, fixadas e coradas para caspase 3

ativa usando um anticorpo PE-conjugado específico à caspase 3 clivada, conforme especificado no protocolo do fabricante (Pharmingen). Análise citométrica de fluxo foi usada para quantificar o % de células PE-positivas como uma medida de apoptose.

5 siRNA de Dicer

Células HeLa foram cultivadas em lâminas com 6 cavidades a 200.000 células por cavidade. Após 24 h, as células foram transfectadas com 400 nM de siRNA de controle ou um siRNA contra dicer humana usando Superfect Reagent, conforme descrito acima. As células foram, então, 10 coletadas e processadas para análise citométrica de fluxo usando um anticorpo específico para a Dicer humana (IMX-5162; IMGENEX), conforme descrito acima para análise de Plk1 e Bcl-2 através de fluxo.

Ensaio imunoabsorvente enzima-ligado (ELISA)

células HeLa foram cultivadas em lâminas com 6 cavidades a 15 200.000 células por cavidade. Após 24 h, as células foram transfectadas com 400 nM de siRNA de controle de não silenciamento ou um siRNA contra a Dicer humana usando Superfect Reagent, conforme descrito acima. As células foram, então, coletadas e submetidas à lise em 1X tampão RIPA contendo 1X protease e coquetel inibidor de fosfatase (Sigma) durante 20 20 min sobre gelo. 100  $\mu$ L de lisatos de célula foram, então, adicionados a cada lâmina com 96 cavidades para ELISA e incubados em RT durante 24 h. As cavidades foram lavadas três vezes com 300 (L de 1X RIPA e incubadas com 100 (L de diluição a 1:200 de anticorpo primário à Dicer humana em 1X RIPA durante 2 h. As 25 cavidades foram lavadas conforme acima e incubadas com 100 (L de diluição a 1:200 de anticorpo IgG-HRP anticoe-1ho secundário em 1X RIPA durante 1 h. As cavidades foram lavadas conforme acima antes da adição de 100 (L de solução de substrato TMB (PBL Biomedical Laboratories). Após 30 20 min, 50 (L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 1M (Stop Solution) foram adicionados a cada cavidade e a OD450-OD540 foi determinada usando um leitor para lâmina.

### Ensaio de Dicer *In vivo*

Células LNCaP foram cultivadas em lâminas com 6 cavidades a 200.000 células por cavidade. Após 24 h, as células foram co-transfetadas com 400 nM de siRNA de controle, 400 nM de siRNA de Plk1, 400 nM de aptâmero A10 ou 400 nM de quimeras de aptâmero A10-siRNA sozinhas ou com um siRNA à Dicer humana, usando Superfect Transfection Reagent, conforme descrito acima. As células foram, então, coletadas e processadas para análise citométrica de fluxo usando um anticorpo específico para Plk1 humano, conforme descrito acima.

### 10 Ensaio de Dicer *In vitro*

1-2 µg de aptâmero A10 ou quimeras de aptâmero A10-siRNA foram digeridos usando enzima Dicer recombinante seguindo as recomendações do fabricante (Recombinant Human Turbo Dicer Kit; GTS) (Myers e outros, Nat. Biotechnol. 21(3): 324-8 (2003)). ssA10-CON e ssA10-Plk1 correspondem às quimeras de aptâmero sem a fita de siRNA anti-senso complementar. Digestões foram, então, decompostas sobre um gel de PAGE de não-desnaturação a 15% e coradas com brometo de etídio antes de visualização usando a câmera de gel GEL.DOCXR (BioRad). Alternativamente, 1-2 µg de aptâmero A10 ou fitas sendo de quimeras de aptâmero A10-siRNA foram anelados a siRNAs anti-senso complementares com a extremidade rotulada com <sup>32</sup>P (sonda). Os siRNAs tiveram a extremidade rotulada usando quinase de polinucleotídeo T4 (NEB) seguindo as recomendações do fabricante. O siRNA anti-senso não era complementar ao aptâmero A10. A10 ou as quimeras aneladas (A10-CON ou A10-Plk1) foram incubadas com ou sem enzima Dicer e subsequentemente decompostos sobre um gel de PAGE de não-desnaturação a 15%, conforme descrito acima. O gel foi seco e exposto a um filme BioMAX MR (Kodak) durante 5 min.

### Ensaio de Interferon

IFN-β secretado de células PC-3 e LNCaP tratadas e não tratadas foi detectado usando um kit ELISA para Interferon beta humano seguindo as recomendações do fabricante (PBL Biomedical Laboratories). Resumidamente, as células foram cultivadas a 200.000 células/cavidade em lâminas

com 6 cavidades. Vinte e quatro horas depois, as células foram transfectadas com uma mistura de Superfect Transfection Reagent (Qiagen) mais quantidades variadas de Poli(I:C) (2,5, 5, 10, 15 µg/ml) como um controle positivo para Interferon beta ou com uma mistura de Superfect Transfection Reagent e com siRNAs ou siRNAs ao Plk1 ou Bcl2 (200 nm ou 400 nm). Além disso, as células foram tratadas com 400 nM cada de aptâmero A10 e quimeras de aptâmero A10-siRNA conforme descrito acima. 48 h após os vários tratamentos, 100 µL de sobrenadante de cada grupo de tratamento foram adicionados a uma cavidade de uma lâmina com 96 cavidades e incubadas em RI durante 24 h. A presença de IFN-beta nos sobrenadantes foi detectada usando um anticorpo específico ao IFN-beta humano seguindo as recomendações do fabricante.

#### Experimentos *In vivo*

Camundongos atípicos nus (nu/nu) foram obtidos do Cancer Center Isolation Facility (CCIF) na Duke University e mantidos em um ambiente estéril de acordo com as diretrizes estabelecidas pelo US Department of Agriculture and the American Association for Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC). Esse projeto foi aprovado pelo Institutional Animal Care and Utilization Committee (IAUCUC) of Duke University. Camundongos atípicos foram inoculados com  $5 \times 10^6$  (em 100 µl de matriz a 50%) células PC-3 ou LNCaP propagadas *in vitro* subcutaneamente injetadas em cada flanco. Aproximadamente trinta e dois tumores não necróticos para cada tipo de tumor, os quais excediam a 1 cm de diâmetro, foram aleatoriamente divididos em quatro grupos de oito camundongos por grupo de tratamento como segue: *grupo 1*, sem tratamento (DPBS); *grupo 2*, tratado com quimera A10-CON (200 pmols/injeção X 10); *grupo 3*, tratado com quimera A10-Plk1 (200 pmols/injeção X 10); *grupo 4*, tratado com quimera mut-A10-Plk1 (200 pmols/injeção X 10). Os compostos foram injetados intratumoralmente em volumes de 75 µL dia sim, dia não durante um total de 20 dias. O Dia 0 marca o primeiro dia de injeção. As injeções em pequeno volume são pequenas o bastante para excluir os compostos que estão sendo forçados dentro das células em virtude de uma injeção em alta pressão não específica. Os tumo-

res foram medidos a cada três dias com calibradores em três dimensões. A seguinte fórmula foi usada para calcular o volume do tumor:  $V_T = (W \times L \times H) \times 0,5236$  (W, a dimensão mais curta, L a dimensão mais longa). As curvas de crescimento são plotadas como o volume médio do tumor  $\pm$  SEM. O experimento foi terminado através de eutanásia 3 dias após o último tratamento, quando os tumores foram excisados e fixados em formalina para imunohistoquímica.

#### Análise estatística

Análise estatística foi conduzida usando um ANOVA de uma via.

10 Um p-valor de 0,05 ou menos foi considerado como indicando uma diferença significativa. Além de um ANOVA de uma via, testes não emparelhados duplamente configurados foram conduzidos para comparar cada grupo de tratamento uns com os outros. Para tumores expressando PSMA, o Grupo 3 (A10-Plk1) era significativamente diferente do grupo 1 (DPBS), grupo 2 (A10-CON) e grupo 4 (mutA10-Plk1),  $P < 0,01$ , nos Dias 12, 15, 18 e 21. O grupo 15 2 (A10-CON) e grupo 4 (mutA10-Plk1) não eram significativamente diferente do grupo de controle com DPBS,  $P > 0,05$ , em qualquer ponto durante o tratamento. Para tumores PSMA-negativos, não havia diferença significativa entre os grupos.

## 20 RESULTADOS

#### Quimeras de aptâmero A10-siRNA

25 RNAs quiméricos de aptâmero-siRNA foram gerados de forma a alvejar especificamente siRNAs à células expressando o receptor na superfície celular PSMA. A porção de aptâmero da quimera (A10) media a ligação ao PSMA. A porção de siRNA objetiva a expressão de genes de sobrevivência, tais como Plk1 (A10-Plk1) e Bcl2 (A10-Bcl2). Um siRNA de não silenciamento foi usado como um controle (A10-CON). O RNA Structure Program (versão 4.1) foi usado para prever as estruturas secundárias de A10 e derivados de quimeras de aptâmero A10-siRNA (Fig. 1B). Para prever a região 30 de A10 responsável pela ligação ao PSMA, uma comparação foi feita da estrutura secundária prevista para A10 com aquela de um aptâmero A10 truncado, A10-3 (dados não mostrados) (Lupold e outros, Cancer Res. 62(14):

4029-33 (2002)). Em virtude do fato de A10-3 também se ligar ao PSMA, o componente estrutural retido em A10-3 provavelmente é aquele necessário para ligação a PSMA (caixa em magenta na Fig. 1B). As estruturas previstas dos aptâmeros-siRNAs retêm esse componente de ligação a PSMA previsto, 5 sugerindo que elas também retêm a ligação ao PSMA (Fig. 1B, mostrada para A10-Plk1). Como um controle, duas mutações de ponto foram feitas dentro dessa região (mutA10-Plk1), as quais são previstas como rompendo a estrutura secundária da porção de ligação a PSMA putativa do aptâmero A10 (Fig. 1B, mostrado em azul).

10 Quimeras de A10 aptâmero se ligam especificamente à células expressando PSMA

Primeiro, a capacidade das quimeras de aptâmero A10-siRNA de se ligar à superfície de células expressando PSMA foi testada. Anteriormente, foi mostrado que PSMA é expresso sobre a superfície de células 15 LNCaP, mas não a superfície de células PC-3 (uma célula de câncer de próstata distinta), uma descoberta que foi verificada com citometria de fluxo e imunoblotting (Fig. 7). Para determinar se as quimeras-siRNA de aptâmero A10-siRNA podem se ligar à superfície de células expressando PSMA, A10 fluorescentemente rotulado, A10-CON ou A10-Plk1 foram incubados com 20 células LNCaP ou PC-3 (Fig. 1C). Ligação de A10 e quimeras de aptâmero A10-siRNA foi específica à células LNCaP e era dependente da região do aptâmero A10 prevista como se ligando ao PSMA, uma vez que mutA10-Plk1 foi incapaz de se ligar (Fig. 1D). Além disso, descobriu-se que as quimeras de aptâmero e o aptâmero A10 se ligam à superfície de células LN- 25 CaP com afinidades comparáveis (Fig. 8).

Para verificar se as quimeras de aptâmero A10-siRNA estavam, na verdade, se ligando ao PSMA, células LNCaP foram incubadas (1  $\mu$ M) com RNA de A10 fluorescentemente rotulado, A10-CON ou A10-Plk1 e competiu com quantidades crescentes (de 0  $\mu$ M a 4  $\mu$ M) de aptâmero A10 30 não rotulado (Fig. 2A) ou com um anticorpo específico para PSMA humano (Fig. 2B). RNAs ligados fluorescentemente rotulados na presença de quantidades crescentes de competidor foram avaliados usando citometria de fluxo.

Ligaçāo do aptāmero A10 rotulado e quimeras de aptāmero A10-siRNA (A10-CON e A10-Plk1) à células LNCaP competiu igualmente com A10 nāo rotulado ou o anticorpo anti-PSMA, indicando que esses RNAs estāo se ligando ao PSMA sobre a superfície de células LNCaP. Para confirmar adicionalmente se o alvo das quimeras de aptāmero é na verdade o PSMA, ligação das quimeras foi testada à células LNCaP pré-tratadas com 5-α-dihidrotestosterona (DHT), uma vez que foi mostrado que DHT reduz a expressão de PSMA (Israeli e outros, Cancer Res. 54(7): 1807-11 (1994)). Inibição DHT-mediada de expressão de gene de PSMA foi avaliada através de citometria de fluxo e imunoblotting ( Fig. 2C, painéis superiores). Tratamento de células LNCaP com DHT a 2 nM durante 48 h reduziu grandemente a expressão de PSMA. Expressão na superfície celular de PSMA foi reduzida de 73,2% para 13,4%, conforme determinado através de citometria de fluxo e se correlacionava com a ligação reduzida de A10 e quimeras de aptāmero A10-siRNA (A10-CON e A10-Plk1) à células LNCaP (Fig. 2C). Conforme esperado, mutA10-Plk1 nāo se liga à superfície de células LNCaP, na presença ou ausência de tratamento com DHT (Fig. 2C).

Quimeras de aptāmero-siRNA silenciam especificamente a expressão de gene

Para determinar se as quimeras de aptāmero-siRNA podem silenciar a expressão de gene, quimeras de aptāmero A10-siRNA foram usadas para distribuir siRNAs contra Plk1 (Reagan-Shaw e Ahmad, FASEB J. 19(6): 611-3 (2005)) ou Bcl2 (Yano e outros, Clin. Cancer Res. 10(22): 7721-6 (2004)) em células expressando PSMA (Fig. 3). Células PC-3 e LNCaP foram tratadas com quimeras de aptāmero-siRNA A10-Plk1 (Fig. 3A) ou A10-Bcl-2 (Fig. 3B) na ausência de reagentes de transfecção. Silenciamento de genes Plk1 e Bcl-2 foi avaliado através de citometria de fluxo e/ou imunoblotting. Em contraste à transfecção dos siRNAs nāo-alvejados (Fig. 9), silenciamento através de A10-Plk1 e A10-Bcl-2 foi específico para células LNCaP expressando PSMA e se correlacionava com a captação de quimeras de aptāmero fluorescentemente rotuladas em células LNCaP (Figs. 3A e 3B). A redução tipo de célula-específica em proteínas de Plk1 e Bcl-2 indica

que os siRNAs estão sendo distribuídos especificamente à células expressando PSMA via a porção de aptâmero das quimeras. Para verificar adicionalmente se silenciamento através de quimeras de aptâmero A10-siRNA era, na verdade, dependente de PSMA, células LNCaP foram incubadas 5 com ou sem DHT a 2 nM durante 48 h antes de adição de A10-Plk1 (Fig. 3C). Captação de A10-Plk1 em células e silenciamento de expressão de gene de Plk1 foram substancialmente diminuídos em células tratadas com DHT. Esses dados, junto com os dados de ligação à superfície celular, indicam que silenciamento tipo de célula específico é dependente da expressão 10 de PSMA na superfície celular.

Quimeras de aptâmero-siRNA inibem a proliferação celular e induzem à apoptose de células expressando PSMA

Para determinar se as quimeras de aptâmero-siRNA que alvejam oncogenes e genes antiapoptóticos podem obter o objetivo de reduzir a 15 proliferação celular e indução de apoptose, esses processos celulares foram medidos em células tratadas com as quimeras. células PC-3 e LNCaP foram tratadas com quimeras de aptâmero-siRNA A10-CON ou A10-Plk1 (Fig. 4A) e a proliferação celular foi medida através de incorporação de 3H-timidina. Em células LNCaP, a proliferação foi eficazmente reduzida pela quimera 20 A10-Plk1, mas não a quimera de controle A10-CON. Esse efeito era específico para células expressando PSMA, uma vez que ele não foi observado nas células PC-3. A proliferação foi reduzida até aproximadamente o mesmo ponto conforme observado quando lipídios catiônicos foram empregados para transfectar siRNA de Plk1, mesmo embora nenhum reagente de trans- 25 fecção tenha sido utilizado para a distribuição de aptâmero-siRNA (Fig. 4A).

Em seguida, a capacidade das quimeras de A10-Plk1 e A10-Bcl-2 de induzir a apoptose de células de câncer de próstata expressando PSMA foi avaliada (Figs. 4B e 4C). células PC-3 e LNCaP foram tratadas através da adição de A10, A10-CON, A10-Plk1 ou A10-Bcl2 ao meio ou transfectadas com siRNAs ao Plk1 ou Bcl-2 usando lipídios catiônicos. A apoptose foi 30 avaliada através de medição da produção de caspase 3 ativa (Casp3) através de citometria de fluxo. Enquanto siRNAs transfectados ao Plk1 e Bcl-2

induziram à apoptose de células PC-3 e LNCaP, apoptose induzida pelas quimeras de aptâmero-siRNA foi específica à células LNCaP e não requer um reagente de transfecção. Tratamento de células PC-3 e LNCaP com cisplatina foi usado como um controle positivo para apoptose.

5 Silenciamento de gene aptâmero-siRNA ocorre através da via de RNAi

Em seguida, uma determinação foi feita se o mecanismo pelo qual quimeras de aptâmero-siRNA silenciam a expressão de gene é dependente de atividade da Dicer. Portanto, o nível de proteína de Dicer foi reduzido através de alvejamento de sua expressão com um siRNA contra Dicer humana (Doi e outros, *Curr. Biol.* 13(1): 41-6 (2003)) (Fig. 10). Em seguida, silenciamento de gene mediado por quimera-siRNA A10-Plk1 foi testado com relação à sua dependência da expressão de Dicer. Células LNCaP foram co-transfetadas com aptâmero A10 ou quimeras de aptâmero (A10-CON ou A10-Plk1) sozinhas ou junto com o siRNA de Dicer (Fig. 5A). Silenciamento de expressão de gene Plk1 através da quimera A10-Plk1 foi inibido através de co-transfecção de siRNA de Dicer (Fig. 5A, painéis superiores), sugerindo que silenciamento de gene mediado por quimera de aptâmero é dependente da Dicer e ocorre através da via de RNAi. Em contraste, conforme esperado, inibição de Dicer não teve efeito sobre silenciamento mediado por siRNA de Plk1 (Fig. 6A, painéis inferiores) porque foi mostrado que siRNAs de 21-23 nt de comprimento ultrapassam a etapa com a Dicer (Murchison e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102(34): 12135-40 (2005), Kim e outros, *Nat. Biotechnol.* 23(2): 222-6 (2005)).

Para testar se as quimeras de aptâmero eram diretamente clivadas pela Dicer para produzir fragmentos de siRNA de 21-23 nt correspondendo às seqüências de siRNA manipuladas nas estruturas químéricas dos RNAs foram digeridas com a enzima Dicer recombinante *in vitro* e os fragmentos resultantes foram decompostos com PAGE de não-desnaturação (Figs. 5B e 5C). conforme mostrado na Fig. 5B, as quimeras de aptâmero (A10-CON ou A10-Plk1), mas não A10 ou a fita sendo fita simples mais longa das quimeras de aptâmero (ssA10-CON ou ssA10-Plk1), foram digeridas pela enzima Dicer para liberar fragmentos de 21-23 nt de comprimento. Para

verificar se esses fragmentos de Dicer de 21-23 nt de comprimento correspondem aos siRNAs de controle e Plk1, as quimeras de aptâmero A10-siRNA foram rotuladas através de anelamento da fita anti-senso com extremidade rotulada com  $^{32}\text{P}$  complementar dos siRNAs e incubadas com ou 5 sem Dicer recombinante (Fig. 5C). Digestão de A10-CON ou A10-Plk1 rotulada com Dicer recombinante resultou na liberação de fragmentos de 21-23 nt de comprimento que retiveram a fita anti-senso rotulada com  $^{32}\text{P}$  na extremidade, indicando que esses fragmentos são, na verdade, a porção de siRNA das quimeras de aptâmero-siRNA.

10 Quimeras de aptâmero-siRNA não disparam respostas de interferon

Vários grupos reportaram que os siRNAs distribuídos podem ativar potencialmente respostas inflamatórias não específicas, levando à toxicidade celular (Sledz e outros, *Nat. Cell Biol.* 5(9): 834-9 (2003), Kariko e outros, *J. Immunol.* 172(11): 6545-9 (2004)). Portanto, uma determinação foi 15 feita da quantidade de IFN- $\beta$  produzida por células PC-3 e LNCaP que foram não tratadas, transfectadas com siRNAs ao Plk1 ou Bcl-2 ou tratadas com quimeras de aptâmero-siRNA usando um ensaio imunoabsorvente enzima-ligado (ELISA) (Fig. 11). Tratamento com siRNAs ou quimeras de aptâmero-siRNA não induz à produção de IFN- $\beta$  sob essas condições experimentais, 20 sugerindo que a distribuição de quimeras de aptâmero-siRNA às células não dispara uma resposta de interferon substancial.

A10-Plk1 media a regressão de tumor em um modelo de câncer de próstata em camundongo

A eficiência e especificidade da quimera A10-Plk1 em camundongos atípicos trazendo tumores derivados de células de câncer de próstata humano PSMA-positivas (LNCaP) ou células de câncer de próstata humano PSMA-negativas (PC-3) foi em seguida considerada (Fig. 6). Camundongos atípicos foram inoculados com células LNCaP ou PC-3 e os tumores foram deixados crescer até que eles atingissem 1 cm de diâmetro na dimensão mais longa. Os tumores foram, então, injetados (Dia 0) com DPBS apenas ou com os RNAs quiméricos (A10-CON, A10-Plk1 ou mutA10-Plk1) dia sim, dia não para um total de dez injeções administradas. Tumores foram

medidos a cada três dias. Nenhuma diferença no volume do tumor foi observada com os tumores PC-3 com qualquer um dos diferentes tratamentos, indicando que os RNAs quiméricos não têm qualquer efeito de morte celular não-específica. Em contraste, uma redução pronunciada no volume do tumor 5 foi observada para tumores LNCaP tratados com a quimera A10-Plk1. Na verdade, do Dia 6 ao Dia 21, os vários tumores de controle tratados aumentaram 3,63 vezes de volume ( $n = 22$ ), enquanto que aqueles tratados com A10-Plk1 tiveram uma redução de 2,21 vezes no volume ( $n = 8$ ). Regressão 10 do volume do tumor LNCaP foi específica à A10-Plk1 e não foi observada com tratamento com DPBS ou tratamento com os RNAs quiméricos A10-CON ou mutA10-Plk1. De modo importante, nenhuma morbidez ou mortalidade foi observada após o 20º de tratamento com os RNAs quiméricos, sugerindo que esses compostos não são tóxicos para os animais sob as condições desses experimentos.

15 Em resumo, quimeras de aptâmero foram desenvolvidas e caracterizadas como tipos de célula alvo-específicos e atuam como substratos para Dicer, desse modo, disparando o silenciamento de gene tipo de célula específico. No estudo descrito acima, genes antiapoptóticos foram alvejados com RNAi especificamente em células cancerígenas expressando o receptor 20 na superfície celular, PSMA. Depleção dos produtos genéticos alvejados resultou em proliferação diminuída e apoptose aumentada das células alvejadas em cultura (Fig. 4). Alvejamento celular dos RNAs quiméricos foi mediada através da interação da porção de aptâmero das quimeras com PSMA sobre a superfície celular. De modo significativo, um RNA químérico mutante 25 trazendo duas mutações de ponto dentro da região do aptâmero responsável pela ligação ao PSMA resultou em perda de atividade de ligação (Fig. 1D). A especificidade de ligação foi ainda verificada demonstrando que células PC-3, as quais não expressam PSMA, e células LNCaP com depleção de PSMA através de tratamento com 5- $\alpha$ -dihidrotestosterona não foram alvejadas pelas quimeras, enquanto que células LNCaP não tratadas, as quais expressam PSMA, foram alvejadas (Fig. 2C). Adicionalmente, anticorpos específicos para PSMA competiram com as quimeras pela ligação à superfície das 30

células LNCaP (Fig. 2B).

Foi mostrado que silenciamento de gene através dos RNAs quiméricos é dependente da via de RNAi porque ela requer Dicer, uma endonuclease que processa dsRNAs antes de montagem de complexos RISC (Fig. 5A). Também descobriu-se que a Dicer cliva a porção de alvejamento de gene fita dupla das quimeras a partir da porção de aptâmero, uma etapa que seria esperado preceder a incorporação da fita mais curta desses reagentes em complexos RISC (Figs. 5B e 5C).

De modo importante, essa abordagem de distribuição de siRNA mediou eficazmente a regressão de tumor em um modelo de câncer de próstata com camundongos (Fig. 6). As quimeras de RNA são, portanto, adequadas para alvejamento de tumores em camundongos *in vivo* na forma na qual elas foram geradas e podem, no futuro, provar ser produtos terapêuticos úteis para câncer de próstata humano. Esses reagentes exibiram a mesma especificidade para expressão de PSMA *in vivo* conforme para *in vitro*, uma vez que os tumores PC-3 PSMA-negativos não regredem quando tratados. É notável que o RNA usado para fazer as quimeras seja protegido de degradação rápida por RNases extracelulares através da modificação 2'-fluor das pirimidinas na fita sendo do aptâmero o que, provavelmente, é essencial para seu desempenho *in vivo* (bem como *in vitro* na presença de soro) (Allerson e outros, *J. Med. Chem.* 48(4): 901-4 (2005), Layzer e outros, *RNA* 10(5): 766-71 (2004), Cui e outros, *J. Membr. Biol.* 202(3): 137-49 (2004)).

Embora vários métodos tenham sido descritos para a distribuição de siRNAs à células, a maioria desses métodos realiza distribuição não especificamente (Yano e outros, *Clin Cancer Res.* 10(22): 7721-6 (2004), Fountaine e outros, *Curr Gene Ther.* 5(4): 399-410 (2005), Devroe e Silver, *Expert Opin Biol Ther.* 4(3): 319-27 (2004), Anderson e outros, *AIDS Res Hum Retroviruses.* 19(8): 699-706 (2003), Lewis e Wolff, *Methods Enzymol.* 392: 336-50 (2005), Schiffelers e outros, *Nucleic Acids Res.* 32(19): e149 (2004), Urban-Klein e outros, *Gene Ther.* 12(5): 461-6 (2005), Soutschek e outros, *Nature* 432(7014): 173-8 (2004), Lorenz e outros, *Bioorg Med Chem*

Lett. 14(19): 4975-7 (2004), Minakuchi e outros, Nucleic Acids Res. 32(13): e109 (2004), Takeshita e outros, Proc Natl Acad Sci USA. 102(34): 12177-82 (2005)). A distribuição tipo de célula-específica de siRNAs é, portanto, um objetivo crítico para a aplicabilidade difundida dessa tecnologia em produtos terapêuticos em virtude de considerações de custo e segurança.

Todos os documentos e outras fontes de informação citadas acima são aqui incorporados em sua totalidade por referência.

## LISTAGEM DE SEQÜÊNCIA

<110> Bruce, SULLENGER A.  
<120> MÉTODO DE DISTRIBUIÇÃO  
<130> 1579-1237  
<140> PCT/US2007/012927 <141> 01/06/2007  
<150> 60/809,842 <151> 01/06/2007  
<160> 20  
<170> PatentIn versão 3.4  
<210> 1  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial  
<220>  
<223> seqüência alvo de siRNA  
<400> 1

**aattctccga acgtgtcacg t**

**21**

<210> 2  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial  
<220>  
<223> seqüência alvo de siRNA  
<400> 2

**aaggcggtt tgccaaatg c**

**21**

<210> 3  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial  
<220>  
<223> seqüência alvo de siRNA  
<220>

<221> misc\_feature  
 <222> (1)..(2)  
 <223> n é a, c, g ou t

<400> 3

nngtgaagtc aacatgcctg c

21

<210> 4  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>

<223> seqüência alvo de siRNA

<220>

<221> misc\_feature  
 <222> (1)..(2)  
 <223> n é a, c, g ou t

<400> 4

nncctcacca atgggtcctt t

21

<210> 5  
 <211> 71  
 <212> RNA  
 <213> Artificial  
 <220>

<223> aptâmero de siRNA quimérico

<400> 5

ggggaggacga ugcggauacg ccauguuuac gucacuccuu gucaauccuc aucggcagac  
 gacucgcgg a

60

71

<210> 6

<211> 92

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Aptâmero de siRNA quimérico

<400> 6

gggaggacga ugcggauca  
g ccauguuuac gucacuccuu gucaauccuc aucggcagac 60  
gacucgccccg aaauucuccg aacgugucac gu 92

<210> 7

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Aptâmero de siRNA quimérico

<400> 7

acouugacacg uucggagaat t 21

<210> 8

<211> 92

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Aptâmero de siRNA quimérico

<400> 8

gggaggacga ugcggauca  
g ccauguuuac gucacuccuu gucaauccuc aucggcagac 60  
gacucgccccg aaagggcgcc uuuugccaagu gc 92

<210> 9

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Aptâmero de siRNA quimérico

<400> 9

gcacuuggca aagccgccc t 21

<210> 10

<211> 92  
<212> RNA  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Aptâmero de siRNA quimérico  
<400> 10  
gggaggacga ugcggaucag ccauguuuac gucacuccuu gucaauccuc aucgccagac 60  
gacucgcccg aaagugaagu caacaugccu gc 92

<210> 11  
<211> 21  
<212> RNA  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Aptâmero de siRNA quimérico  
<400> 11  
gcaggcaugu ugacuuucacu u 21

<210> 12  
<211> 92  
<212> RNA  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Aptâmero de siRNA quimérico  
<400> 12  
gggaggacga ugcggaucag ccauccuuac gucacuccuu gucaauccuc aucgccagac 60  
gacucgcccg aaagggcggc uuugccaagu gc 92

<210> 13  
<211> 21  
<212> RNA  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Aptâmero de siRNA quimérico

<400> 13

gcacuuggca aagccgccc t

21

<210> 14

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador

<400> 14

taatacgact cactataggg aggacgatgc gg

32

<210> 15

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador

<400> 15

tcgggcgagt cgtctg

16

<210> 16

<211> 71

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador

<400> 16

gggaggacga tgcggatcg ccatgtttac gtcactccctt gtcaatcctc atcggcagac  
gactcgcccc a

60

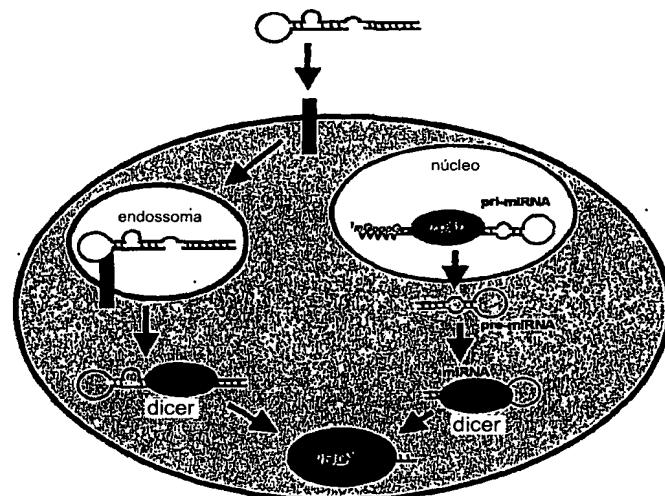
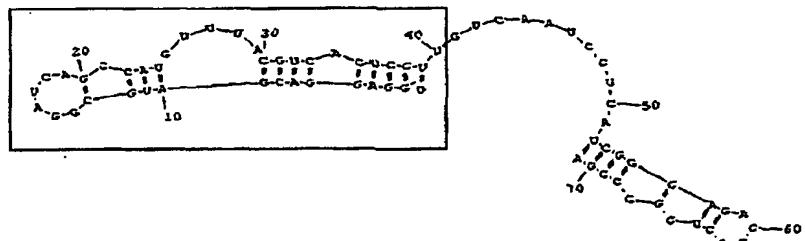
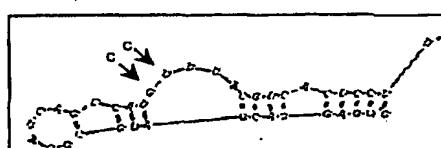
71

<210> 17

<211> 37

## REIVINDICAÇÕES

1. Molécula quimérica compreendendo uma porção de alvejamento de ácido nucleico e uma porção de silenciamento de RNA, em que a referida molécula é um substrato Dicer.  
5                   2. Molécula de acordo com a reivindicação 1, em que a referida porção de alvejamento é um aptâmero.  
                 3. Molécula de acordo com a reivindicação 1, em que a referida porção de alvejamento objetiva um receptor na superfície celular.  
10               4. Molécula de acordo com a reivindicação 1, em que tal porção de alvejamento objetiva PSMA, Plk1 ou Bcl2.  
                 5. Molécula de acordo com a reivindicação 1, em que a referida molécula é uma molécula de RNA.  
15               6. Molécula de acordo com a reivindicação 1, em que a referida molécula compreende um aptâmero e um pré-siRNA, um aptâmero e um shRNA, um aptâmero e um pré-miRNA ou um aptâmero e um pri-miRNA.  
                 7. Composição compreendendo a molécula como definida na reivindicação 1 e um veículo.  
20               8. Método para obter distribuição alvejada, a uma célula, de uma porção de silenciamento de RNA compreendendo contato de uma célula com a molécula quimérica de como definida na reivindicação 1 sob condições de modo que a referida célula internaliza a referida molécula e Dicer presente na referida célula processa a referida molécula, de modo que o referido silenciamento é, desse modo, realizado.  
25               9. Método de acordo com a reivindicação 8, em que a referida célula é uma célula *in vivo*.  
                 10. Método de acordo com a reivindicação 9, em que a referida célula é uma célula humana.  
30               11. Método de acordo com a reivindicação 10, em que a referida célula é uma célula cancerígena.  
                 12. Método de acordo com a reivindicação 11, em que a referida célula é uma célula de câncer de próstata.

**Fig 1A****Fig 1B****A10****A10-Pik1**

Plk1 ou outro siRNA

Fig 1C

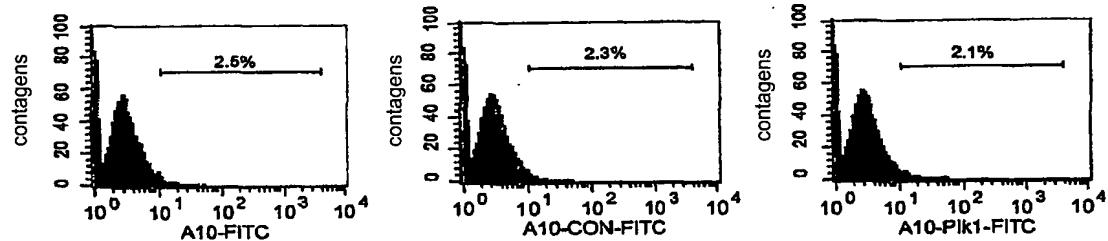
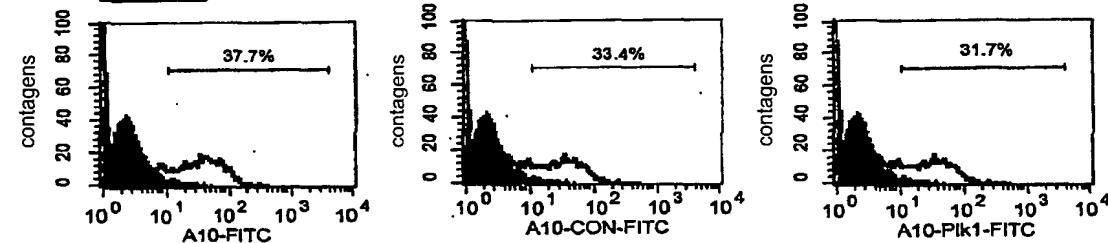
PC-3LNCaP

Fig 1D

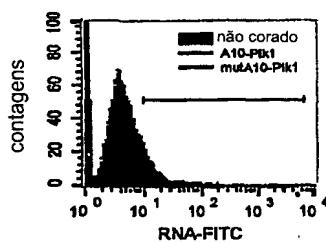
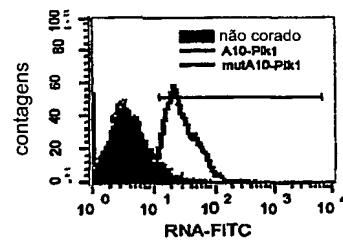
PC-3LNCaP

Fig 2A

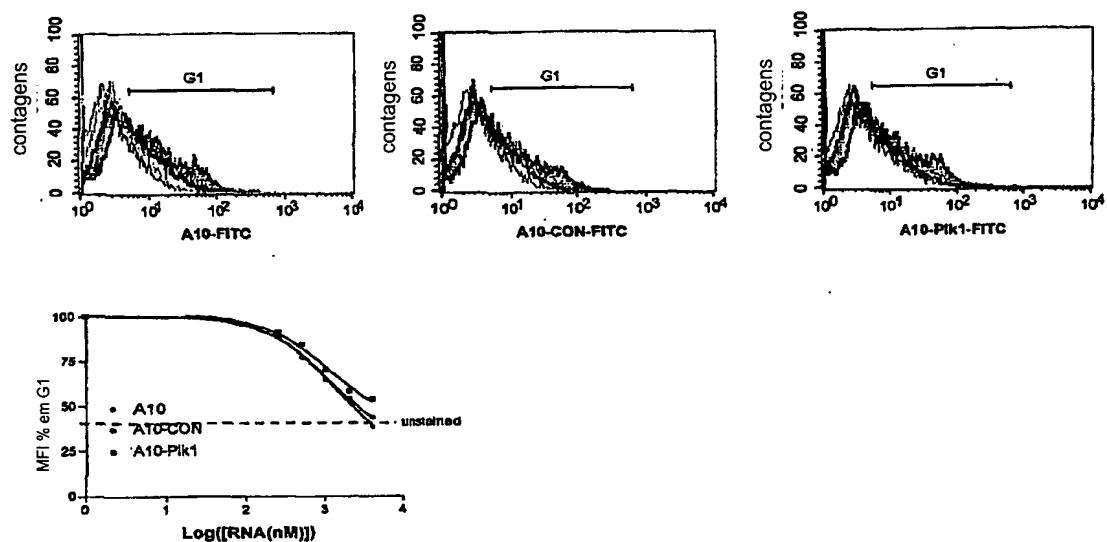


Fig 2B

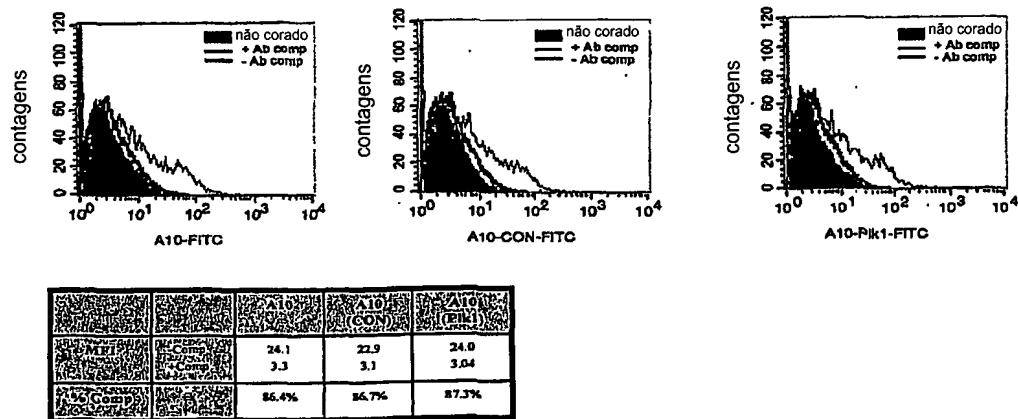


Fig 2C

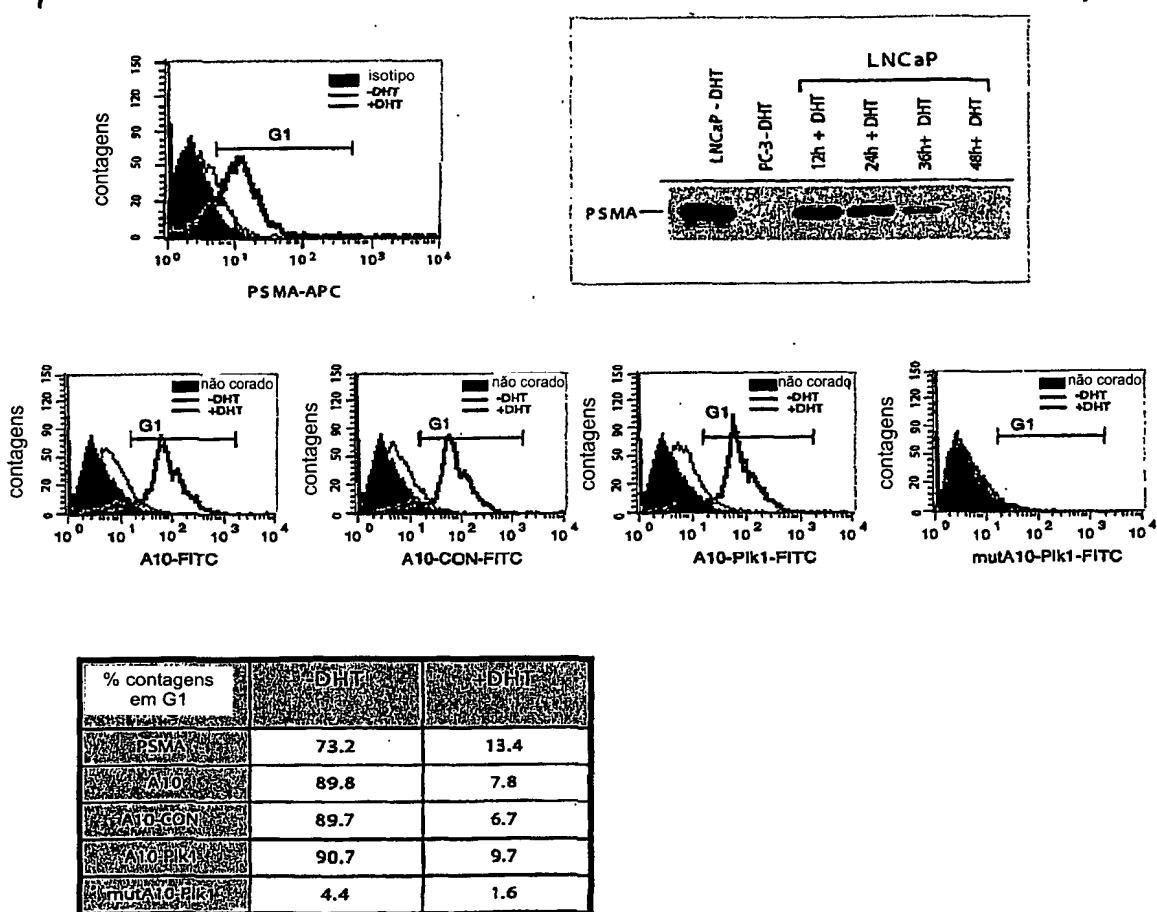


Fig 3A

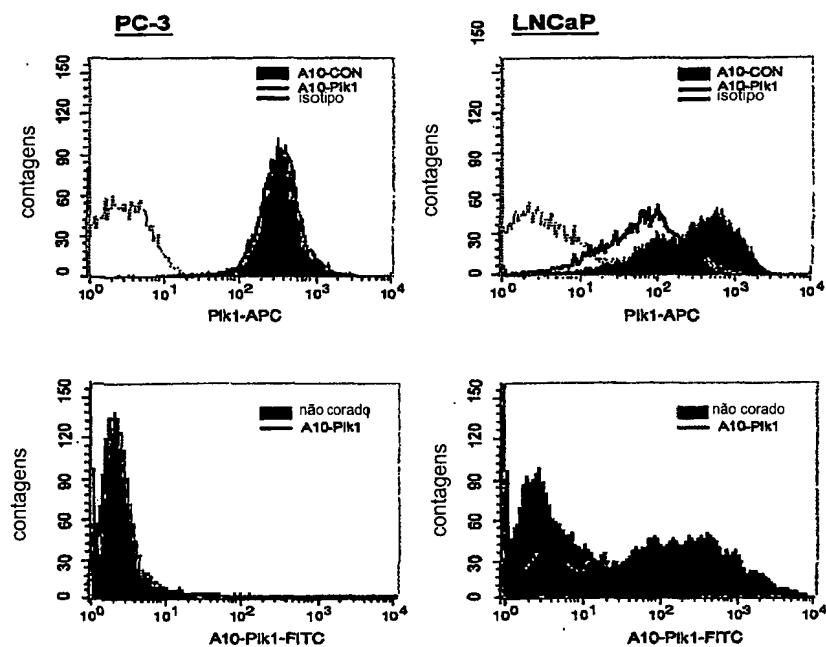


Fig 3B

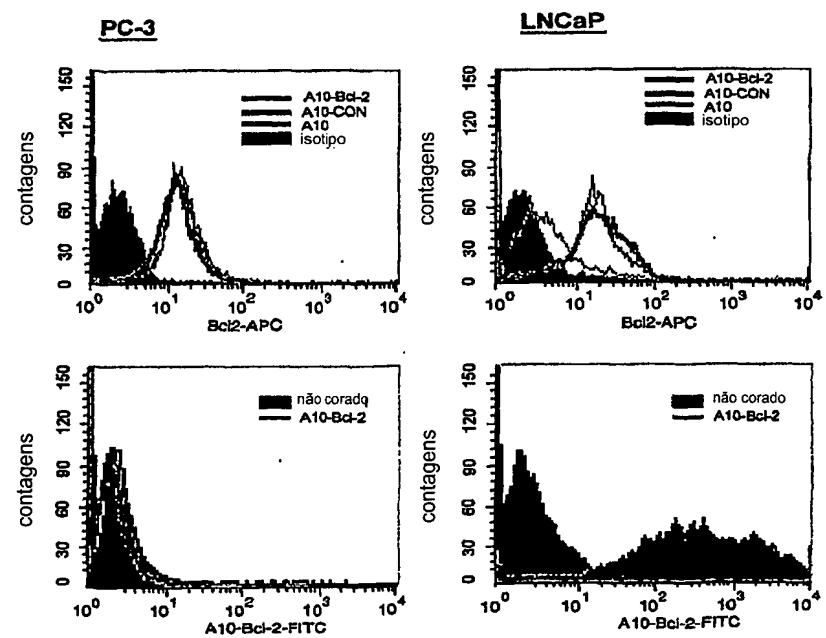


Fig 3C

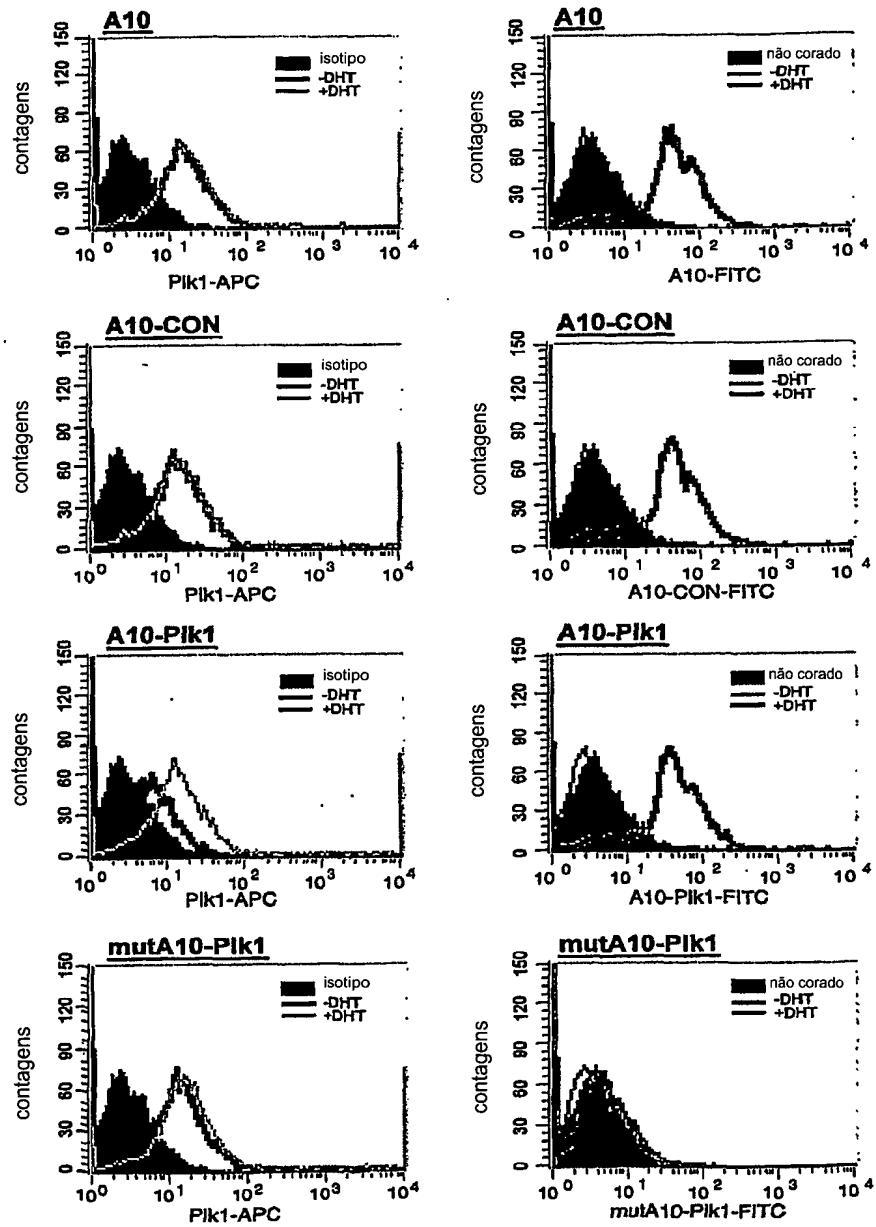


Fig 4A

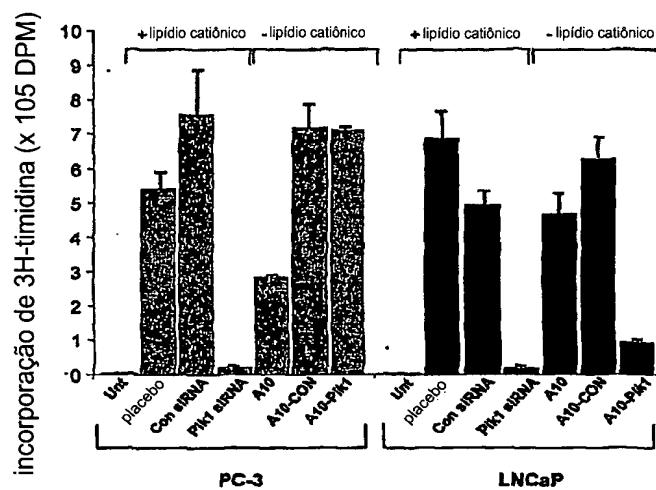


Fig 4B

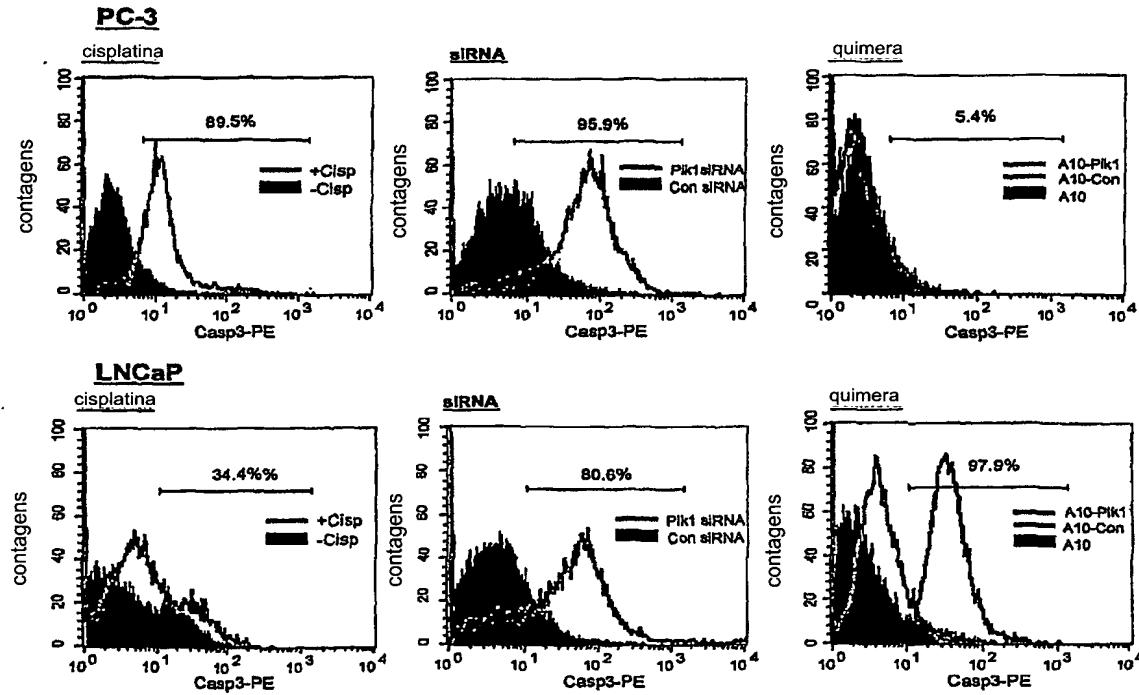
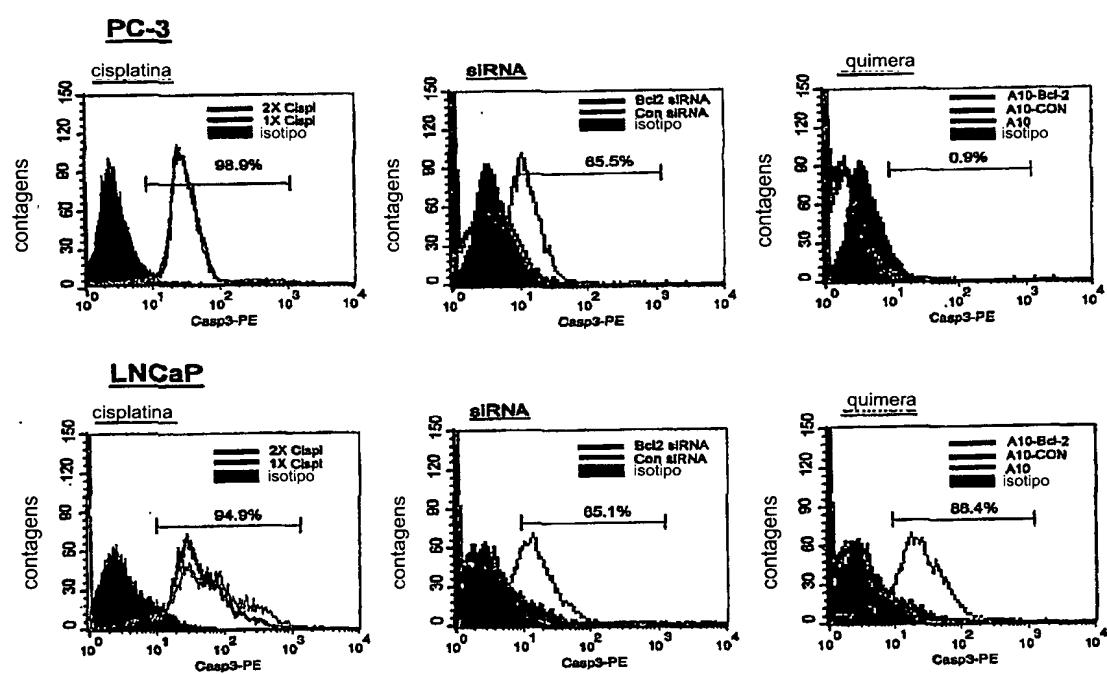


Fig 4C



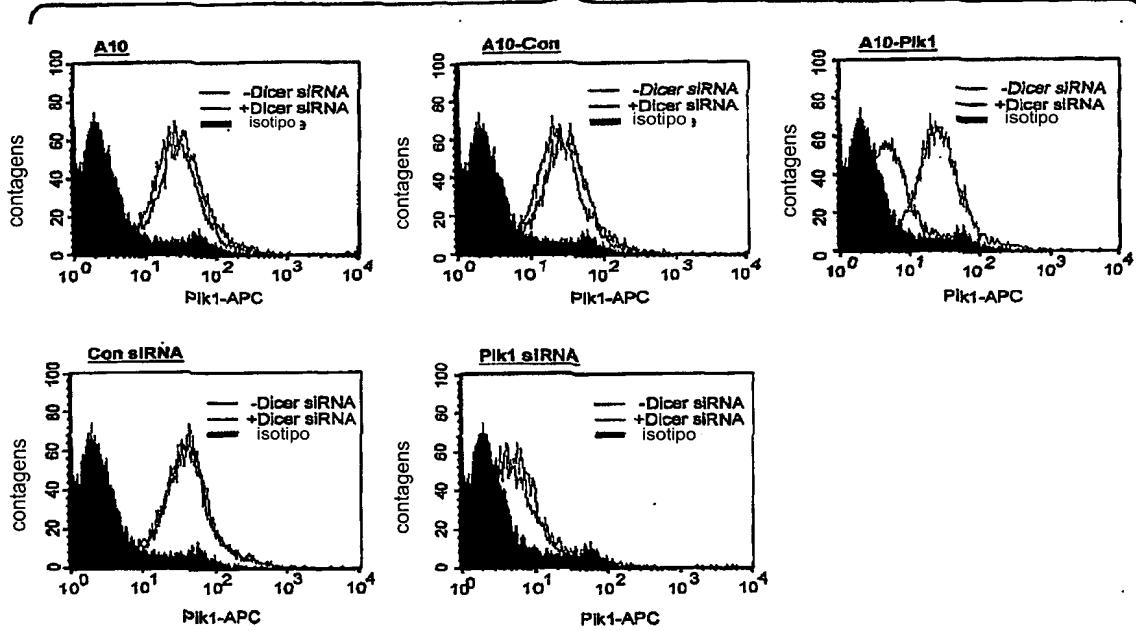
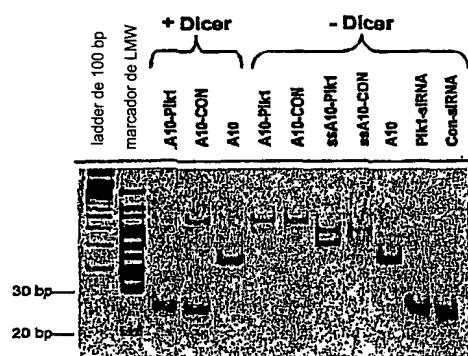
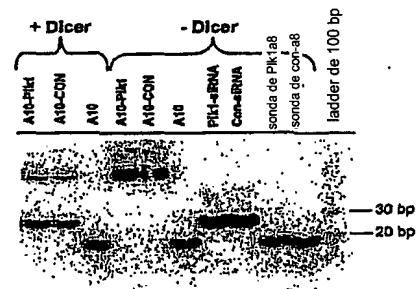
**Fig 5A****Fig 5B****Fig 5C**

Fig 6A

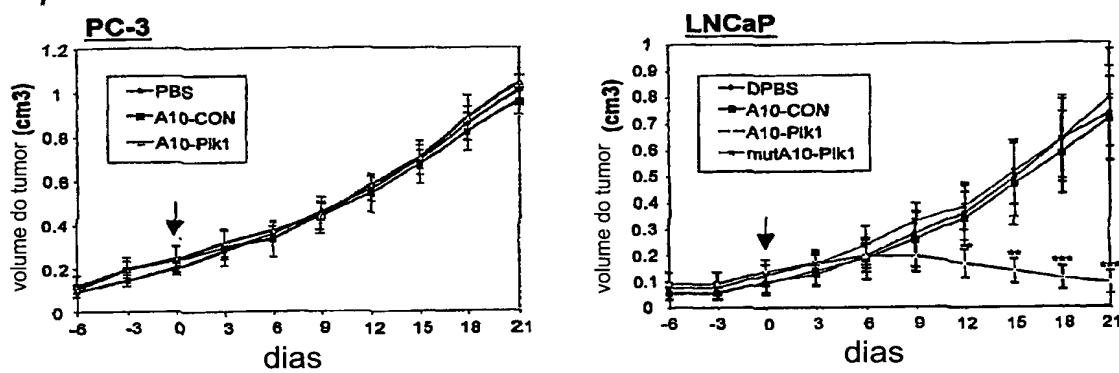


Fig 6B

tumores individuais

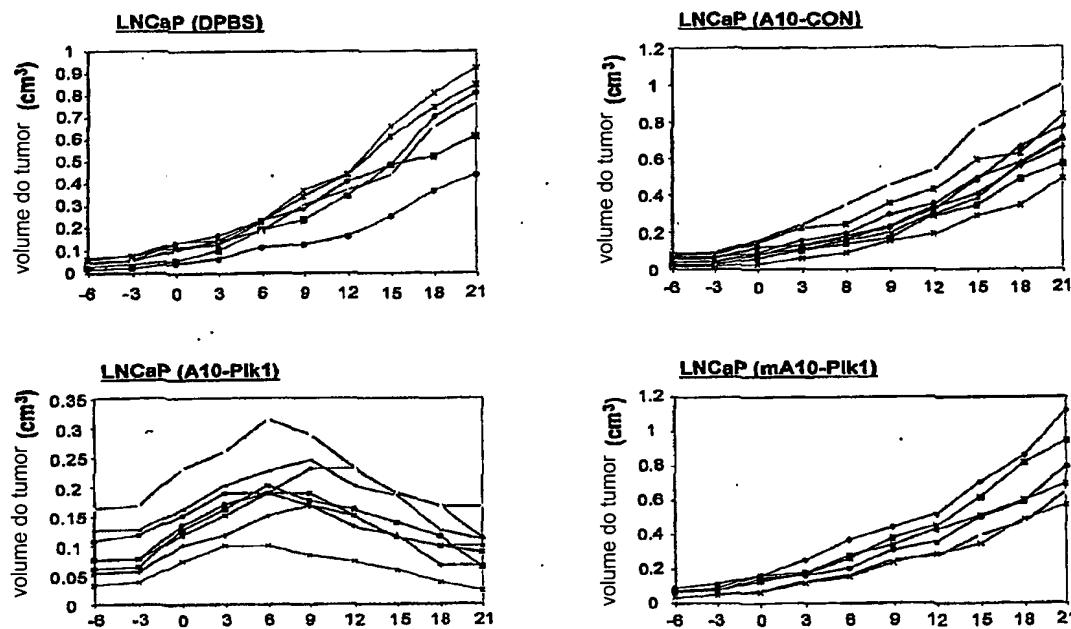


Fig 7A

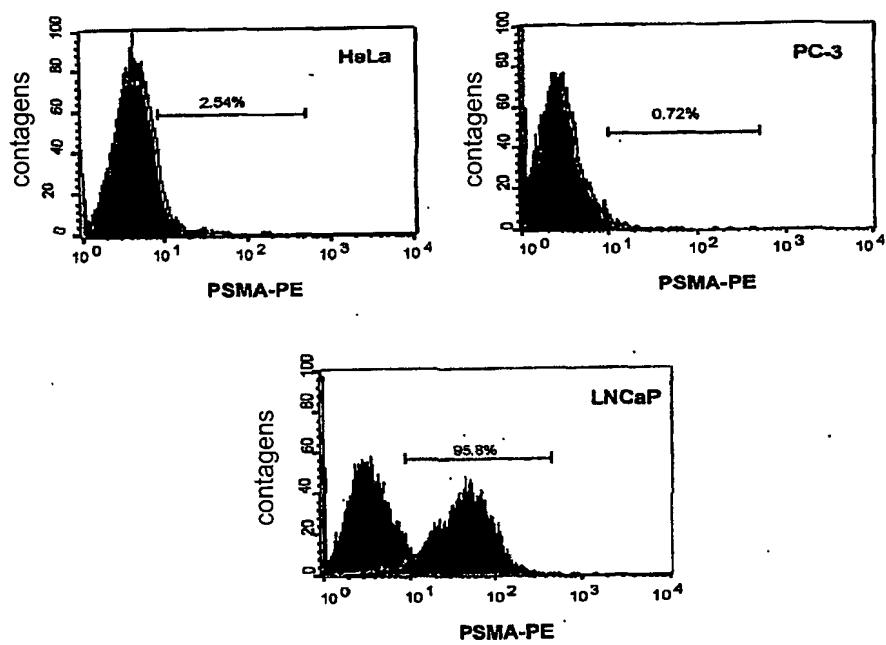


Fig 7B

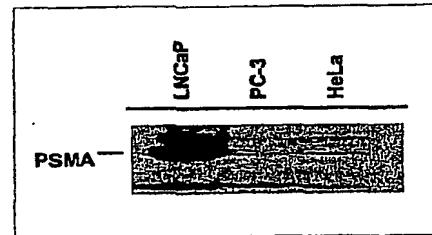


Fig 8A

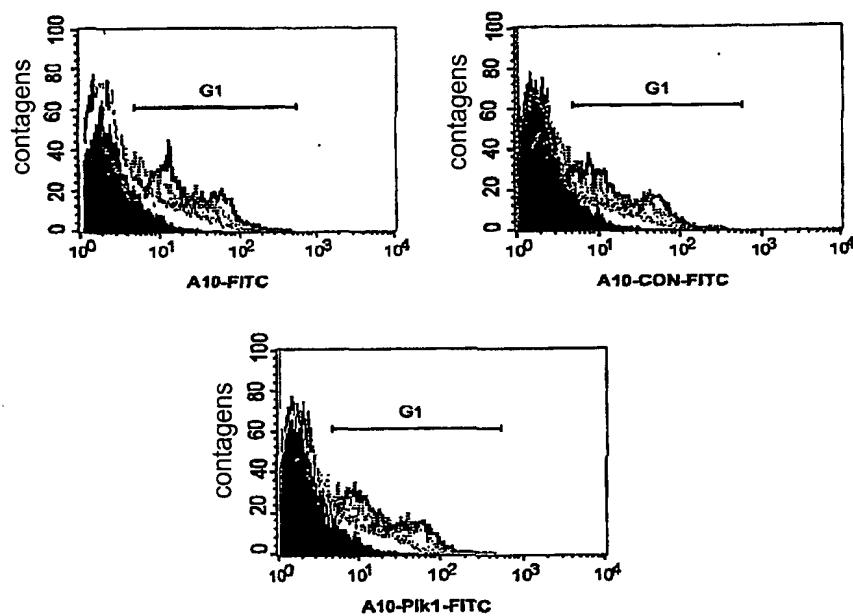


Fig 8B

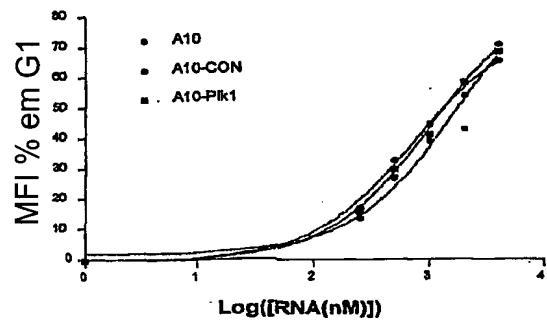


Fig 9A

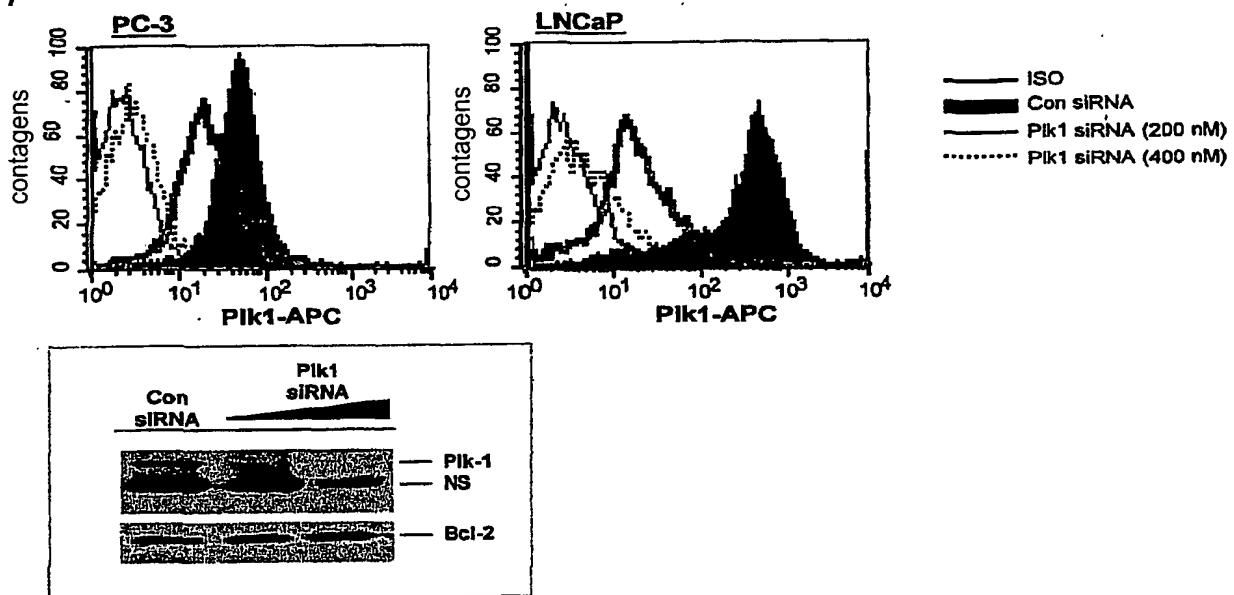
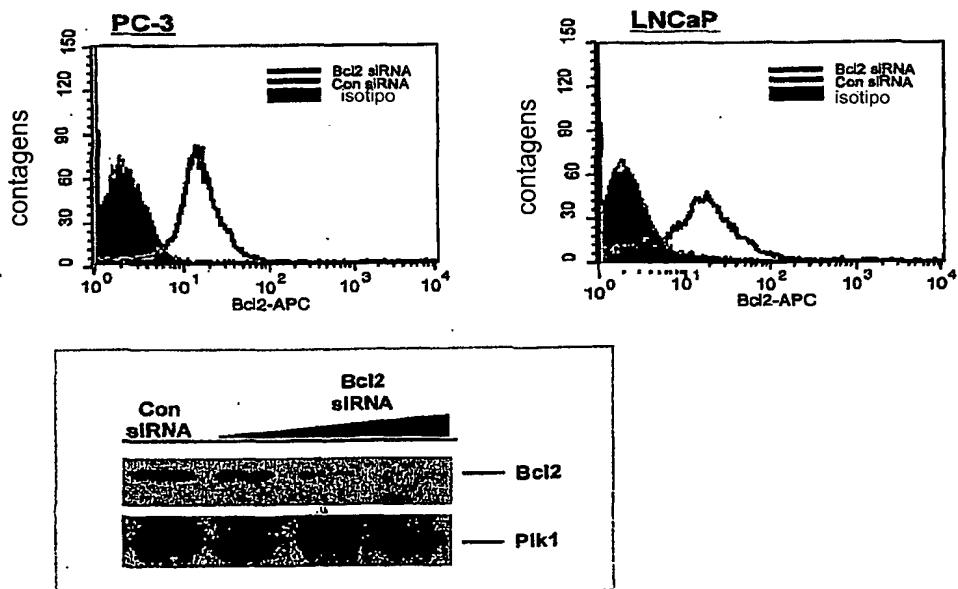
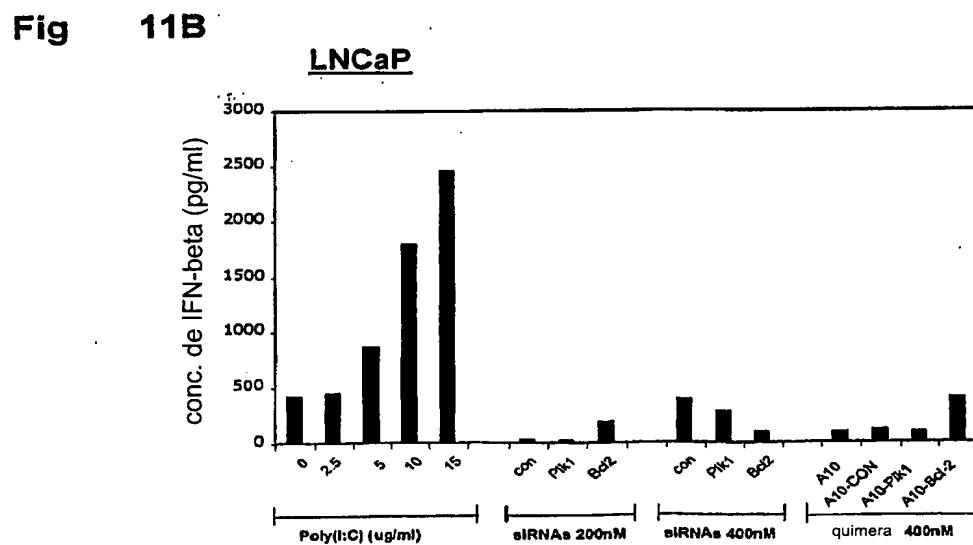
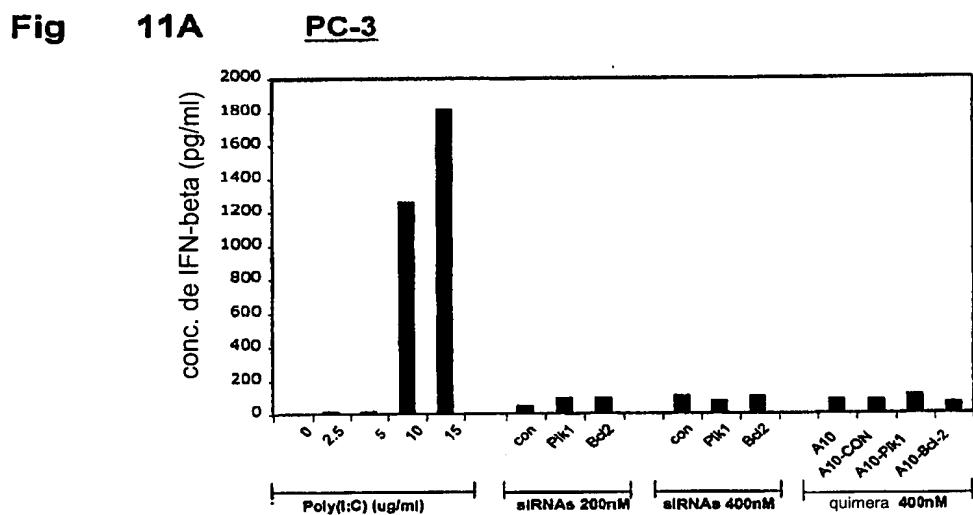
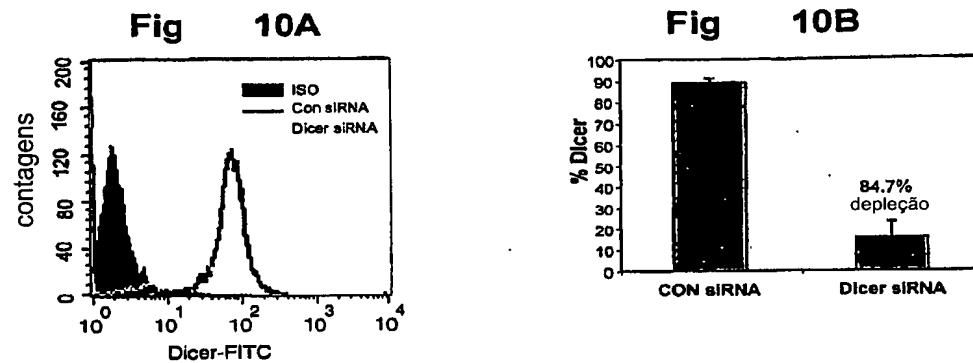


Fig 9B





## RESUMO

Patente de Invenção: "**MÉTODO DE DISTRIBUIÇÃO**".

A presente invenção refere-se, em geral, a siRNA e, em particular, a um método para obter distribuição alvejada de siRNAs e a compostos 5 adequados para uso em tal método.