



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0410789-6 B1



(22) Data do Depósito: 21/05/2004

(45) Data de Concessão: 10/11/2020

(54) Título: COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, USO DE UM OU MAIS OLIGONUCLEOTÍDEOS, E, MÉTODO DE DETECÇÃO

(51) Int.Cl.: C07H 21/04; A61K 48/00; C12Q 1/68.

(30) Prioridade Unionista: 21/05/2003 US 60/472,106.

(73) Titular(es): ANDES BIOTECHNOLOGIES GLOBAL, INC..

(72) Inventor(es): LUIS O. BURZIO; JAIME E. VILLEGAS; VERONICA A. BURZIO.

(86) Pedido PCT: PCT US2004015929 de 21/05/2004

(87) Publicação PCT: WO 2005/001030 de 06/01/2005

(85) Data do Início da Fase Nacional: 21/11/2005

(57) Resumo: MOLÉCULAS DE ÁCIDO NUCLEICO, COMPOSTO OU OLIGONUCLEOTÍDEO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, MÉTODOS PARA INDUZIR A MORTE DA CÉLULA PRÉ-CANCEROSA OU CANCEROSA EM CÉLULAS OU TECIDOS, PARA TRATAR UM SER HUMANO OU ANIMAL SUSPEITO DE TER PRÉ-CÂNCER OU CÂNCER, PARA MELHORAR A EFICÁCIA DE UM TRATAMENTO DE CÂNCER COM MEDICAMENTO QUIMIOTERAPÊUTICO E DE HIBRIDIZAÇÃO PARA DISTINGUIR ENTRE CÉLULAS NORMAIS, PRÉ-CANCEROSAS OU CANCEROSAS, KIT, E, MÉTODO DE HIBRIDIZAÇÃO IN SITU PARA DETERMINAR A LOCALIZAÇÃO DA CÉLULA DO RNA QUIMÉRICO MITOCONDRIAL ANTI-SENTIDO OU SENTIDO NO CITOPLASMA, NÚCLEO E NUCLÉOLO DAS CÉLULAS PRESENTES NA AMOSTRA. Uma nova família de RNAs mitocondriais humanos, aludidos como RNAs quiméricos, que são diferencialmente expressados em células normais, pré-cancerosas e cancerosas, é descrita. Oligonucleotídeos cujos alvos são os RNAs quiméricos são fornecidos. Os oligonucleotídeos descritos ou seus análogos podem ser usado para diagnósticos do câncer e terapia do câncer assim como para pesquisa. Em uma forma de realização desta invenção, estes oligonucleotídeos hibridizam com os RNAs quiméricos mitocondriais sentido ou anti-sentido e o resultado da hibridização é útil para diferenciar entre células proliferativas normais, células pré-cancerosas e células cancerosas. Em uma outra forma de realização da invenção, as composições compreendem oligonucleotídeos que hibridizam com (...).

“COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, USO DE UM OU MAIS OLIGONUCLEOTÍDEOS, E, MÉTODO DE DETECÇÃO”

Este pedido reivindica o benefício do pedido Provisório US Ser. Nº 60/472.106, depositado em 21 de Maio, 2003.

CAMPO DA INVENÇÃO

A invenção diz respeito à terapia do câncer, à diagnose do câncer e aos reagentes de pesquisa relativos a uma nova família de RNAs mitocondriais humanos referidos como RNAs quiméricos mitocondriais humanos. Em particular, esta invenção diz respeito aos oligonucleotídeos alvejados aos RNAs quiméricos mitocondriais humanos. Os oligonucleotídeos da invenção hibridizam aos RNAs quiméricos induzindo a morte da célula cancerosa. A composição e os métodos fornecidos na invenção são úteis como uma nova terapia do câncer. Além disso, os oligonucleotídeos podem ser usados para a diagnose de células cancerosas e pré cancerosas com base na expressão diferencial dos RNAs quiméricos mitocondriais no repouso e proliferação da célula normal, células pré cancerosas e cancerosas.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Mitocôndrias

As mitocôndrias são organelas subcelulares que fabricam a molécula essencial trifosfato de adenosina (ATP) por fosforilação oxidativa.

- 5 O DNA mitocondrial humano (mtDNA) de 16.654 pares de base codifica os dois RNAs ribossômicos, 22 RNAs de transferência (tRNAs) e 13 matrizes de leitura abertas (ORF) que codificam um número similar de polipeptídeos (Clayton, Hum Reprod. Suppl 2: 11 a 17, 2000; Taanman, Biochim. Biophys. Acta, 1410: 103 a 123, 1999). Na base do teor da
- 10 composição de base G+T, os dois filamentos do mtDNA diferem em densidade flutuante e podem ser separados em gradientes de cloreto de céσιο desnaturantes. O filamento pesado ou filamento H codifica dois RNAs ribossômicos (12S e 16S), 14 tRNAs e 12 polipeptídeos correspondendo a ND 1, ND 2, ND 3, ND 4L, ND 4, ND 5, COX I, COX II, COX III, ATP6, ATP8
- 15 e Cyt b. O filamento leve ou filamento L codifica 8 tRNAs e a subunidade da desidrogenase ND6 de NAD complexo (Clayton, Hum Reprod. Suppl 2: 11 a 17, 2000; Taanman, Biochim. Biophys. Acta, 1410: 103 a 123, 1999).

- 20 Uma proporção grande do mtDNA contém uma estrutura de três filamentos curtos denominada alça de deslocamento ou alça D. Esta região, que em seres humanos é de 1.006 pares de bases, é flanqueada pelos genes para o tRNA de fenilalanina (tRNA^{Phe}) e o tRNA de prolina (tRNA^{Pro}) e contém um filamento de ácido nucléico curto complementar ao filamento L e que desloca o filamento H (Clayton, Hum Reprod. Suppl 2: 11 a 17, 2000; Taanman, Biochim. Biophys. Acta, 1410: 103 a 123, 1999). Esta região
- 25 desenvolveu como o sítio de controle principal para a expressão de mtDNA e contém o filamento principal ou a origem do filamento H de replicação e os promotores principais para a transcrição do filamento H (HSP) e L (LSP). Apesar da proximidade imediata dos HSP e LSP (cerca de 150 pb), estes elementos reguladores são funcionalmente independentes *in vitro* (Shuey e

a 801, 2000). A desregulação da apoptose é implicada no aparecimento de várias patologias. Assim, a inibição anormal da apoptose é uma marca de neoplasia, ao passo que a apoptose maciça foi ligada com as doenças agudas tais como acidente vascular cerebral, choque séptico e distúrbios neurodegenerativos. No momento o processo de apoptose é descrito como dois caminhos principais conhecidos como os caminhos extrínsecos e intrínsecos (Zornig *et al.*, Biochim. Biophys. Acta, 1551: F1 a F37, 2001). O caminho extrínseco é um processo que é iniciado na membrana celular pela ligação de ligandos diferentes aos receptores mortais (Krammer, Nature 407: 789 a 795, 2000; Körnig *et al.*, Biochim. Biophys. Acta, 1551: F1 a f37, 2001).

As caspases, são responsáveis pela cascata proteolítica na apoptose. As caspases são sintetizadas como proteínas precursoras inativas que sofrem maturação ou processamento proteolíticos na indução da apoptose (Zornig *et al.*, Biochim. Biophys. Acta, 1551: F1 a F37, 2001). Entretanto, mais recentemente várias evidências experimentais indicam que as proteases lisossômicas constituem um caminho alternativo de proteólise depois de insultos apoptóticos (Guicciardi *et al.*, Oncogene, 23: 2881 a 2890, 2004).

Por outro lado, as proteínas anti-apoptóticas homólogas à oncoproteína Bcl-2 humana foram descritas. Esta proteína pertence a uma família de proteínas que são anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w) ou pró apoptóticas (Bax, Bak, Bim, Bid, etc.) (Zörning *et al.*, Biochim. Biophys. Acta, 1551: F1 a F37, 2001).

As mitocôndrias são particularmente afetadas primeiro durante o processo apoptótico e no tempo presente elas são reconhecidas como os coordenadores centrais da morte celular (Boya *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 304: 575 a 581, 2003; Ferri e Kroemer, Nature Cell Biol. 3: E255 a E263, 2001; Zörnig *et al.*, Biochim. Biophys. Acta, 1551: F1 a F37, 2001). Vários caminhos de sinal e dano pró apoptóticos convergem em mitocôndrias

para induzir a permeabilização de membrana mitocondrial, fenômeno que está sob o controle das proteínas Bcl-2 (Boya *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 304: 575 a 581, 2003; Zörnig *et al.*, Biochim. Biophys. Acta, 1551: F1 a F37, 2001). Depois que as células recebem os insultos apoptóticos, o potencial de trans-membrana ($\Delta\psi_m$) dissipa resultando na permeabilização completa da membrana mitocondrial externa e a vazamento conseqüente das proteínas de intermembrana mitocondrial tóxicas. O primeiro exemplo do vazamento de uma proteína mitocondrial foi a liberação do citocromo c (Liu *et al.*, Apoptose, 6: 453 a 462, 2001). Quando o citocromo c está presente no citosol, ele induz a construção do complexo ativador de caspase denominado o apoptossoma. O citocromo c se liga ao Apaf-1 (fator-1 de ativação da protease apoptótica) facilitando a ligação de dATP/ATP ao complexo e a oligomerização de Apaf-1 (Adrain *et al.*, 1999; Benedict *et al.*, 2000). A oligomerização de Apaf-1 permite o recrutamento da pró caspase-9 que catalisa a ativação proteolítica do precursor e a geração da caspase-9 ativa (Adrain *et al.*, J. Biol. Chem. 274: 20855 a 20860, 1999; Benedict *et al.*, J. Biol. Chem., 275: 8461 a 8468, 2000).

Uma família de inibidor citossólico de proteínas de apoptose foi descrita e é conhecida como XIAP, c-IAP1 e c-IAP2. Estas proteínas se ligam a e inibem a caspase-3 e caspase-9 processadas e conseqüentemente interrompem a cascata de degradação. Entretanto, a célula também contém mecanismos de contramina para desviar este caminho anti-apoptótico. Em células que sofrem apoptose, as caspases são liberadas deste efeito inibitório ligando-se aos IAPs de uma proteína conhecida como Smac (Segundo Ativador Mitocondrial de Caspases) ou DIABLO (Proteína de Ligação de IAP Direta com pl Baixo) (Verhagen *et al.*, Apoptosis, 7: 163 a 166, 2002). Ligando-se aos IAPs, a Smac/DIABLO desloca as caspases ativas dos IAPs e promove assim a morte celular. Uma outra proteína, conhecida como HtrA2, é liberada das mitocôndrias no citosol depois do insulto apoptótico onde a

proteína se liga a IAPs em uma forma similar como faz a Smac/DIABLO e desse modo facilita a ativação das caspases (Verhagen *et al.*, Apoptose, 7: 163 a 166, 2002; Martins *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, Mol. Cell, 8: 613 a 621, 2001; Hedge *et al.*, Apoptose, 7: 123 a 132, 2002).

5 O fator de indução de apoptose (AIF) é um outro componente da cascata apoptótica. Depois da indução da apoptose, o AIF se desloca ao citosol e ao núcleo. No núcleo, o AIF induz a condensação de cromatina periférica e a fragmentação do DNA. O AIF também induz várias marcas de apoptose como a dissipação $\Delta\psi_m$ e exposição a fosfatidilserina (Zornig *et al.*, Biochim. Biophys. Acta, 1551: F1 a F37, 2001). Um fator que parece regular a atividade apoptótica de AIF é a proteína de choque de calor 70 (Ravagnan *et al.*, Nature Cell Biol. 3: 839 a 843, 2001). Um outro fator mitocondrial que sai das mitocôndrias e se desloca no núcleo como AIF é a endonuclease G ou Endo G. No núcleo, a Endo G gera a fragmentação do DNA mesmo na presença de inibidores de caspase (Li *et al.*, Nature, 412: 95 a 99, 2001). A Endo G pode agir em forma similar como a CAD (DNase ativada por caspase), uma nuclease cuja ativação conta criticamente com as caspases (Samejima *et al.*, J. Biol. Chem., 276: 45427 a 45432, 2001).

20 Câncer e Pré Câncer

O câncer é uma malignidade celular cujo traço único, a perda de controle normal do ciclo celular, resulta no crescimento desregulado, falta de diferenciação e capacidade de invadir outros tecidos e espalhar-se por metástase. A carcinogênese é o processo pelo qual uma célula normal é transformada em uma célula maligna. A carcinogênese é um processo de 25 etapa múltipla que começa com o evento genético de iniciação seguido pela expansão seletiva de células alteradas durante a promoção para formar adenomas precoces. Na ausência da promoção contínua, o adenoma regride e desaparece. Com um segundo evento genético, um número pequeno de adenomas promovidos progride para formar alguns adenomas tardios dos

quais podem depois passar por conversão maligna (McKinnell *et al.*, "The Biology Basis of Cancer", Ch. 3, 1998).

5 A etiologia do câncer é complexa e inclui a alteração da regulação do ciclo celular, anormalidades cromossômicas e quebra dos cromossomos. Os agentes infecciosos tais como vários tipos de vírus oncogênicos, produtos químicos, radiação (radiação ultravioleta ou ionizante) e distúrbios imunológicos são considerados serem as causas principais de carcinogênese (McKinnell *et al.*, "The Biological Basis of Cancer, Ch. 3, 1998).

10 Foi proposto durante um longo tempo que o câncer também é relacionado à disfunção mitocondrial. Uma destas teorias sugere que a mutação mitocondrial pode ser a causa primária de transformação celular e câncer (Warburg, 1956; Carew e Huang, *Mol. Cancer*, 1: 1 a 12, 2002). As alterações do DNA mitocondrial (mtDNA) foram relatadas em malignidades
15 hematológicas (Clayton e Vinograd, *Nature*, 216: 652 a 657, 1967) e no câncer de mama (Tan *et al.*, 2002; Parrella *et al.*, 2001). As mutações de várias regiões do mtDNA e as supressões também foram identificadas em
20 pacientes com câncer colorretal, câncer de próstata, câncer ovariano, câncer gástrico, câncer pancreático, carcinoma hepatocelular, câncer esofágico, câncer renal, câncer tireoidal e tumores cerebrais (revisado por Carew e Huang, *Mol. Cancer*, 1: 1 a 12, 2002). No geral, parece haver dois aspectos principais de alterações de mtDNA no câncer sem restrição do tipo de tumor. A maioria das mutações são transições de base de T a C e G a A. Segundo, enquanto existe diversidade nos genes particulares em que as mutações
25 ocorrem, a alça D parece ser a região mutada somática mais freqüente do mtDNA na maioria dos tipos de tumor.

As células pré cancerosas são definidas aqui como uma célula transformada que pode evoluir ou diferenciar-se em uma célula maligna. Alguns exemplos são as células transformadas pelos oncovírus de DNA ou

RNA.

A presente invenção diz respeito a uma nova família de RNAs mitocondriais e o uso aqui destes RNAs como alvos para os diagnósticos e terapia do câncer. A presente invenção fornece composições e métodos e que são úteis para diferenciar as células normais das células tumorosas ou das células pré malignas ou células transformadas com os vírus oncogênicos. Em particular, como elaborado abaixo, a presente invenção fornece a composição e os métodos para os ensaios de diagnósticos para diferenciar as células normais das células pré cancerosas e cancerosas. Em uma outra forma de realização da invenção, a composição e os métodos são fornecidos para induzir a morte de célula tumoral maciça e seletiva. Portanto, a presente invenção fornece composições e métodos que podem ser usados no diagnóstico e terapia do câncer e pré câncer assim como para pesquisa.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO.

A presente invenção é direcionada às composições e aos métodos úteis para detectar uma família de novos RNAs mitocondriais humanos, referidos como RNAs quiméricos mitocondriais, que são expressados diferencialmente em células em repouso e de proliferação normais, células pré cancerosas e cancerosas.

RNAs quiméricos mitocondriais de sentido

Em um aspecto desta invenção as composições e os métodos são fornecidos para detectar um RNA quimérico mitocondrial compreendido de uma repetição invertida de 815 nucleotídeos unidos covalentemente à extremidade 5' do RNA ribossômico mitocondrial 16S (SEQ ID NO 1). A repetição invertida corresponde a um fragmento de 815 nucleotídeos do RNA transcrito do filamento L do gene 16S do mtDNA. Assim, a síntese deste novo RNA requer a transcrição do filamento L e do filamento H do gene 16S do mtDNA. Visto que a transcrição de ambos os filamentos do mtDNA é regulada por promotores diferentes, referimos a este novo RNA na presente

invenção como o RNA quimérico mitocondrial (SEQ ID NO 1). Além disso, visto que a repetição invertida de 815 nucleotídeos é unida ao RNA 16S “de sentido” (transcrito do filamento H) referimos a este novo RNA como o “RNA quimérico mitocondrial de sentido”.

5 Esta invenção fornece métodos e composições para detectar a expressão do RNA quimérico mitocondrial de sentido em células cultivadas, em amostras de célula e em seções de tecido. A detecção pode ser realizada por hibridização *in situ*, síntese do cDNA correspondente e amplificação por PCR, amplificação mediada por transcrição (TMA) (Comanor *et al.*, J. Clin Virol., 28: 14 a 26, 2003) ou Northern blot ou outros métodos evidentes a
10 uma pessoa habilitada na técnica.

 Em um aspecto desta invenção, os ensaios de hibridização *in situ* revelaram que o RNA quimérico mitocondrial de sentido é expressado em células proliferativas normais, em células tumorosas em cultura assim como
15 em células tumorosas presentes em biópsias humanas de tipos de tumor diferentes. O RNA quimérico mitocondrial de sentido não é expressado em células em repouso normais. Ainda em uma outra forma de realização da invenção, os métodos e as composições são fornecidos para detectar um
20 segundo novo RNA quimérico mitocondrial de sentido nas células transformadas com o papiloma vírus 16 ou 18 (Hausen, Biochim. Biophys. Acta, 1288: F55 a F78, 1996). Nestas células transformadas, um RNA quimérico mitocondrial de sentido novo que compreende uma repetição invertida de 754 nucleotídeos unidos covalentemente à extremidade 5’ do RNA mitocondrial 16S é expressado (SEQ ID NO 2). Este RNA não está
25 presente em células proliferativas normais ou em células tumorosas. Os métodos e composições também demonstraram que um terceiro RNA quimérico mitocondrial de sentido, compreendendo uma repetição invertida de 694 nucleotídeos unidos covalentemente à extremidade 5’ do RNA mitocondrial 16S (SEQ ID NO 3), está presente em células transformadas

com HTLV-1.

RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido

5 Esta invenção também fornece métodos e composições que
 revelaram que as células proliferativas normais sobreexpressam um RNA
 quimérico mitocondrial de anti-sentido correspondendo a SEQ ID NO 4, SEQ
 ID NO 5, SEQ ID NO 6. Estes transcritos contêm repetições invertidas de
 comprimento variável (transcrito do filamento H) unidos à extremidade 5' do
 RNA ribossômico mitocondrial 16S de anti-sentido (transcrito do filamento
 L), conseqüentemente o nome do RNA quimérico mitocondrial de anti-
 10 sentido. A expressão do RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido é
 infrarregulada em linhagens de célula tumerosa em cultura assim como em
 células tumorosas presentes em biópsias humanas de diferentes tipos de
 tumores assim como em células transformadas ou pré cancerosas.
 Conseqüentemente, a presente invenção fornece métodos e composição para
 15 detectar a expressão dos RNAs quiméricos mitocondriais de sentido e de anti-
 sentido, distinguindo as células proliferativas normais das células cancerosas
 e pré cancerosas e fornece portanto um novo marcador para as células
 malignas e câncer.

Terapia do câncer

20 Em um outro aspecto desta invenção, os métodos e as
 composições são fornecidos para interferir com os RNAs quiméricos
 mitocondriais de sentido e de anti-sentido. Uma forma de realização preferida
 é interferir com o RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido em células
 tumorosas que contêm número de cópia inferior deste transcrito. A
 25 interferência é realizada com os oligonucleotídeos ou análogos de
 oligonucleotídeo, cujas seqüências são complementares às seqüências do
 RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido (SEQ ID NO 4 e/ou SEQ ID NO
 5 e/ou SEQ ID NO 6). O tratamento das células tumorosas de tipos diferentes
 com um ou mais destes oligonucleotídeos complementares induz a morte

celular ou apoptose. Os oligonucleotídeos são compostos de 15 a 50 nucleotídeos onde pelo menos 15 nucleobases são complementares a SEQ ID NO 4 e/ou SEQ ID NO 5 e/ou SEQ ID NO 6. Os exemplos destes oligonucleotídeos complementares são mostrados nas SEQ ID NOS 9 a 98. A indução de apoptose é seletiva visto que o tratamento de linfócitos humanos (célula em repouso normal) ou os linfócitos humanos estimulados com fitoemaglutinina (células proliferativas normais) não sofrem apoptose depois do tratamento com os oligonucleotídeos complementares às seqüências do RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido sob as mesmas condições. Se as células tumorosas são tratadas com oligonucleotídeos alvejados ou complementares ao RNA quimérico mitocondrial de sentido (SEQ ID NO 1 e/ou SEQ ID NO 2 e/ou SEQ ID NO 3) uma indução diminuída de morte celular ou apoptose é obtida.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

FIGs. 1A, B e C. Os desenhos gráficos que apresentam a estrutura dos RNAs quiméricos mitocondriais de sentido correspondem a SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2 e SEQ ID NO 3.

As setas indicam a posição relativa dos iniciadores usados para amplificar o RNA em partes. As setas abaixo das linhas são iniciadores reversos e as setas no topo das linhas são iniciadores dianteiros. O iniciador 1 é posicionado junto à extremidade 5' do RNA mitocondrial 16S. As linhas pretas correspondem ao RNA mitocondrial 16S de sentido, enquanto que as linhas pontilhadas correspondem ao RNA mitocondrial 16S de anti-sentido.

Fig. 2. A eletroforese em gel de agarose mostra o produto de amplificação obtido entre o iniciador 1 e o iniciador 3 indicado na FIG. 1A. A amplificação foi realizada por RT-PCR usando como padrão uma célula tumoral (SiHa), queratinócitos humanos transformados com HPV 16 (HFK698) ou linfócitos B transformados com HTLV-1. Com o RNA das células SiHa apenas um único amplicon de 210 pb foi obtido e corresponde a

um segmento da SEQID NO 1. No RNA total dos queratinócitos transformados com HPV 16, além do amplicon de 210 pb, um segundo amplicon de 150 pb foi obtido e corresponde a um segmento da SEQ ID NO 2. Com o RNA das células transformadas com HTLV-1, além dos amplicons de 210 pb e 150 pb, um terceiro amplicon foi obtido e corresponde a um segmento da SEQ ID NO 3.

FIG. 3. Os desenhos gráficos que apresentam a estrutura dos RNAs quiméricos mitocondriais de anti-sentido correspondem a SEQID NO 4, SEQ ID NO 5 e SEQID NO 6. As setas representam o iniciador usado para a amplificação e o iniciador 1 é posicionado junto à extremidade 5' do RNA mitocondrial 16S de anti-sentido. A estratégia para se obter a seqüência destes transcritos é similar àquela descrita na Fig. 1.

FIGs. 4A e 4B. Ensaio de hibridização *in situ* realizados com várias linhagens de célula tumoral em cultura. As células foram hibridizadas com sondas de oligonucleotídeo complementares ao RNA quimérico mitocondrial de sentido e rotuladas com digoxigenina (painéis esquerdos). Além disso, as células também foram hibridizadas em paralelo com as sondas de oligonucleotídeo complementares ao RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido rotulado com digoxigenina (painéis direitos). As linhagens celulares são identificadas na esquerda.

FIG. 5A. Hibridização *in situ* de várias seções das biópsias humanas correspondendo aos tipos de tumor diferentes. As seções tumorosas foram hibridizadas com sondas de oligonucleotídeo complementares ao RNA quimérico mitocondrial de sentido e rotuladas com digoxigenina (painéis esquerdos). Além disso, as seções tumorosas em paralelo foram hibridizadas com sondas de oligonucleotídeo complementares ao RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido rotulado com digoxigenina (painéis direitos). A Fig. 5B é a hibridização *in situ* de tumores humanos diferentes realizados com sondas de oligonucleotídeo complementares ao RNA quimérico mitocondrial

de sentido rotulado com digoxigenina.

FIG. 6 Hibridização *in situ* de células proliferativas normais. As amostras foram hibridizadas com sondas alvejadas ao RNA quimérico mitocondrial de sentido ou anti-sentido e rotuladas com digoxigenina. O sinal de hibridização forte foi obtido com ambas as sondas, uma complementar ao RNA quimérico mitocondrial de sentido (painéis esquerdos) assim como ao RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido (painéis direitos). Os tecidos ou células são identificados na esquerda.

FIG. 7. Imunocitoquímica e hibridização *in situ* para apresentar mudanças na expressão em linfócitos humanos estimulados para proliferar com o PHA de mitógeno. Depois de 48 horas de estimulação com PHA, os linfócitos expressam os antígenos Ki-67 e PCNA (painéis direitos). Estes antígenos não são expressados nos linfócitos de controle ou em repouso (painéis esquerdos). A hibridização *in situ* foi realizada com sondas de oligonucleotídeo alvejadas ao RNA quimérico mitocondrial de sentido e anti-sentido e rotuladas com digoxigenina. Os linfócitos estimulados sobexpressam o RNA quimérico mitocondrial de sentido assim como o de anti-sentido (painéis direitos).

Fig. 8 Hibridização *in situ* de células tumorosas apresentando localização do RNA quimérico mitocondrial de sentido no nucléolo. As seções celulares ou tumorosas são indicadas na esquerda.

FIG. 9 Microscopia fluorescente para revelar as mudanças que ocorrem nas células HL-60 tumorais tratadas com sondas de oligonucleotídeos alvejadas ao RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido. A, B, C e D mostram manchamento com um composto (VAD-fmok) que se liga com afinidade alta às caspases ativadas. Este composto é rotulado com fluoresceína. As sondas de oligonucleotídeo alvejadas ao RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido induzem a ativação das caspases na maneira similar que não o medicamento estaurosporina (comparar B e C). As caspases

ativadas não são detectadas nas células não tratadas de controle (A) ou nas células tratadas com sondas de oligonucleotídeo alvejadas ao RNA mitocondrial 12S (D), como controle. E e F mostram manchamento das células HL-60 com DAPI. As células de controle (não tratadas) mostram
5 manchamento homogêneo do núcleo (E), enquanto que as células tratadas com as sondas de oligonucleotídeo alvejadas ao RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido apresentam fragmentação maciça do núcleo (F).

FIG. 10 Porcentagem de células apoptóticas depois de condições de tratamento diferentes de linfócitos em repouso e de proliferação. A apoptose foi medida nos linfócitos em repouso ou linfócitos estimulados por PHA por manchamento com DAPI. As barras 1 e 2 correspondem às células não tratadas. Uma apoptose espontânea inferior do controle (1) ou linfócitos estimulados por PHA (2) foi observada. Um nível baixo similar de apoptose foi observado nos linfócitos em repouso (3) ou linfócitos
15 estimulados por PHA (4) tratados com sondas de oligonucleotídeo de 15 uM alvejadas ao RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido durante 15 horas, mostrando que a apoptose não é induzida em células normais. Como um controle, os linfócitos em repouso e o linfócito estimulado por PHA foram tratados com estaurosporina. Sob estas condições, em torno de 90 % de
20 linfócitos em repouso (5) ou linfócitos estimulados por PHA (6) sofrem apoptose.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A família de RNA quimérico mitocondrial humano

A presente invenção é fundamentada na descoberta
25 surpreendente de que as células humanas expressam uma família de novos RNAs mitocondriais, referidos como os RNAs quiméricos mitocondriais humanos.

Um destes transcritos contém uma repetição invertida longa de 815 nucleotídeos covalentemente unidos à extremidade 5' do RNA

ribossômico 16S mitocondrial, denominado RNA quimérico mitocondrial de sentido. A repetição invertida longa é completamente complementar ao RNA ribossômico 16S das posições 51 a 866, formando um ramo de filamento duplo longo e uma alça de 50 nucleotídeos. Como mostrado na Fig. 1A, o

5 ramo de 815 pares de bases representa um problema significativo para qualquer transcriptase reversa para sintetizar o cDNA correspondente. Portanto uma nova estratégia foi usada para amplificar este RNA pela RT-PCR que é ilustrada na Fig. 1A. Depois de se obter a seqüência de cada fragmento sobreposto, eles foram construídos como contíguos para obter a

10 seqüência completa do RNA quimérico mitocondrial de sentido mostrado na SEQ ID NO 1 (Fig. 1A).

Outro aspecto desta invenção é a descoberta de outros RNAs quiméricos mitocondriais de sentido novos que são expressados em células transformadas com o papiloma vírus humano oncogênico 16 ou 18. Os

15 queratinócitos de prepúcio humano (HFK) onde infectados com HPV 16 ou 18 (Hausen, Biochim. Biophys. Acta, 1288: F55 a F78, 1996). A infecção induz a transformação ou imortalização do HFK. Entretanto, estas células não são tumorigênicas tais como as células SiHa relacionadas (infectadas com HPV 16) ou células HeLa (infectadas com HPV18). Estas células expressam o

20 RNA quimérico mitocondrial de sentido (SEQ ID NO 1) similar ao SiHa e células HeLa. Entretanto, as células transformadas também expressam um outro segundo RNA quimérico mitocondrial de sentido que contém uma repetição invertida de 754 nucleotídeos unidos ao RNA ribossômico 16S (Fig. 1B) (SEQ ID NO 2). Este novo RNA quimérico mitocondrial de sentido é

25 infrarregulado ou não é expressado em células humanas normal (HFK) ou em células tumorigênicas (células SiHa ou HeLa).

Em uma outra forma de realização desta invenção nós determinamos a expressão de um terceiro RNA quimérico mitocondrial de sentido em células transformada com HTLV-1 (Kobayashi *et al.*, EMBO J., 3:

1339 a 1343, 1984). As células MT-2 infectadas com HTLV-1 expressam o RNA quimérico mitocondrial de sentido (SEQ ID NO 1) e o RNA quimérico mitocondrial de sentido expressado em células transformada com HPV 16 ou 18 (SEQ ID NO 2). Além destes transcritos, a célula infectada com HTLV-1
5 expressa um terceiro RNA quimérico mitocondrial de sentido contendo uma repetição invertida de 694 nucleotídeos unidos à extremidade 5' do RNA ribossômico 16S. Este novo RNA (Fig. 1C) (SEQ ID NO 3) não é expressado em células proliferativas normais, em células tumorosas ou em HFK transformado com HPV 16 ou 18.

10 As células proliferativas normais tais como os queratinócitos de prepúcio humano (HFK) como descrito na seção prévia também sobreexpressam o RNA quimérico mitocondrial de sentido (Fig. 6) (SEQ ID NO 1). Os linfócitos humanos estimulados com os mitógenos tais como a fitoemaglutinina (PHA) entram na fase S do ciclo celular e começam a síntese
15 do DNA (Yu *et al.*, J. Biol. Chem., 266: 7588 a 7595, 1991). Como as células proliferativas, os linfócitos também expressam os antígenos relacionados à proliferação tais como Ki-67 e antígeno nuclear de célula proliferativa ou PCNA (Bantis *et al.*, Cytopathology, 15: 25 a 31, 2004). Os linfócitos estimulados também sobreexpressam o RNA quimérico mitocondrial de
20 sentido (SEQ ID NO 1). Outras células proliferativas tais como os linfócitos no centro germinal do baço, células espermatogônias e embrionárias também sobreexpressam o RNA quimérico mitocondrial de sentido (SEQ ID NO 1) (Fig. 4). Ao contrário, as células não proliferativas tais como os linfócitos não estimulados ou as células musculares não expressam o RNA quimérico
25 mitocondrial de sentido (Fig. 7).

Em uma outra forma de realização da invenção, os métodos para diferenciar uma célula proliferativa normal de uma célula tumorosa são fornecidos. Como descrito antes, as células tumorais e proliferativas normais sobreexpressam o RNA quimérico mitocondrial de sentido descrito na SEQ ID

NO 1. Além disso, em situações específicas de infecção com HPV e HTLV-1, o RNA quimérico adicional é encontrado (SEQ ID NO 2 e SEQ ID NO 3). Entretanto, a presente invenção também é fundamentada na descoberta surpreendente de que as células proliferativas normais também sobreexpressam um RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido. A expressão do RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido foi confirmada nos linfócitos humanos estimulados com PHA (Fig. 7), em HFK normal e em outras células proliferativas normais (Fig. 6). Uma outra descoberta surpreendente da presente invenção é que diferente das células proliferativas normais, as células tumorosas não expressam o RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido ou marcadamente infrarregularam a produção (comparar a Fig. 4 com a Fig. 6 e a Fig. 7).

O uso da mesma estratégia para amplificar pela RT-PCR o RNA quimérico com base nos fragmentos sobrepostos descritos mais no início, a estrutura do RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido foi determinada (Fig. 3). O seqüenciamento e construção em contíguos revela uma família complexa de RNAs quiméricos mitocondriais de anti-sentido contendo repetição invertida de comprimentos diferentes unidos à extremidade 5' do RNA ribossômico mitocondrial 16S de anti-sentido (Figs. 3A, B e C) (SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6). A seqüência também revela a formação de estruturas ou ramos de filamento duplo neste RNA e a formação de laços com 17, 96 e 451 nucleotídeos, respectivamente (Fig. 3A, B e C, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6).

Em outra forma de realização da invenção, os métodos e as composições são fornecidas para seguir a transformação oncogênica das células por um vírus oncogênico. As células HeLa (infectadas com HPV 18) ou as células SiHa (infectadas com HPV 16) sobreexpressam o RNA quimérico mitocondrial de sentido mas infrarregulam a expressão dos RNAs quiméricos mitocondriais de anti-sentido. Por outro lado, o HFK como as

células proliferativas normais, sobreexpressam tanto os RNAs quiméricos mitocondriais de sentido assim como os de anti-sentido. Depois da transformação de HFK com HPV 16 ou HPV 18, as células adquirem o fenótipo tumoral: elas sobreexpressam o RNA quimérico mitocondrial de sentido e infrarregulam a expressão do RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido. A sobreexpressão do RNA quimérico mitocondrial de sentido e infrarregulação do RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido podem ser determinadas por hibridização *in situ*, amplificação do RNA por RT-PCR ou pelo uso de outros métodos para determinar um RNA por caminhos bem conhecidos à pessoa habilitada na técnica. Estes métodos e composições podem ser usados também para determinar a mudança na expressão da família de RNA quimérico nas células transformadas com outro vírus oncogênico ou pelos compostos que induzem as transformações ou carcinogênese (McKinnell *et al.*, "The biological basis of Cancer, Cambridge University Press 1998).

Diagnósticos do câncer e pré câncer.

De acordo com a presente invenção os métodos e as composições são fornecidos para detectar em uma amostra biológica a presença dos RNAs quiméricos mitocondriais de sentido e os RNAs quiméricos mitocondriais de anti-sentido. Em uma forma de realização preferida, a detecção é realizada por hibridização *in situ*. A detecção do RNA quimérico mitocondrial de sentido e dos RNAs quiméricos mitocondriais de anti-sentido nas células da amostra biológica indica que as células são células proliferativas normais. Em uma outra forma de realização, o resultado da hibridização *in situ* com células tumorosas mostrará a expressão do RNA quimérico mitocondrial de sentido e a infrarregulação ou ausência do RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido. Se a amostra biológica contém células não proliferativas normais a hibridização *in situ* mostrará que nem o RNA quimérico mitocondrial de sentido nem o RNA quimérico mitocondrial de

anti-sentido são expressados.

As amostras biológicas são entendidas como células normais (células em repouso ou proliferativas) em cultura ou em esfregaços de sangue ou esfregaços de medula óssea, células tumorosas em cultura e células normais transformadas com o vírus oncogênico. Adicionalmente, as amostras biológicas compreendem as células obtidas da urina ou a lavagem de bexiga de pacientes suspeitando de ter câncer de bexiga ou renal ou as células da saliva em pacientes suspeitando de ter cânceres de cabeça e pescoço ou as células da lavagem broncoalveolar de pacientes suspeitando de ter câncer pulmonar. Também, as amostras biológicas compreendem os esfregaços de células do sangue de pacientes suspeitando de ter leucemia ou esfregaços de célula do sangue ou linfa, linfonodo de pacientes suspeitando de ter metástase.

As amostras biológicas de acordo com a invenção incluem o uso de amostras de tecido ou células rapidamente congeladas para a análise histopatológica, bem conhecida na técnica pelos técnicos no campo. Alternativamente, a amostra biológica pode ser biópsias de seções fixadas pelo uso de tratamento químico que pode ser realizado pela variedade ampla de protocolos de fixação conhecidos na técnica (Frederick *et al*, Current Protocols in Molecular Biology, Volume 2, Unidade 14, Frederick M. Ausubul *et al*. edS., 1995; Celis, Cell Biology, A Laboratory Handbook, Julio E. Celis, ed., 1994). As amostras biológicas também podem ser materiais biológicos não fixados que não foram quimicamente modificados ou tratados com formalina ou outro fixador bem conhecido na técnica.

Alternativamente, a hibridização *in situ* pode ser realizada pelo uso de amostras biológicas embutidas em materiais tais como parafina ou outros polímeros de encaixe. Os blocos obtidos depois do encaixe podem ser selecionados com um micrótomo na seção de cerca de 4 a cerca de 10 μm de espessura. A seção depois pode ser aplicada às lâminas de vidro ou plástico

revestidas com uma substância adesiva conhecida na técnica tal como polilisina ou proteína adesiva de mexilhão (Burzio *et al.*, Curr. Opin. Biotechnol., 8: 309 a 312, 1997).

5 A hibridização *in situ* da presente invenção pode ser realizada em caminhos bem conhecidos às pessoas habilitadas na técnica. Por exemplo, uma solução de hibridização compreendendo uma ou mais sondas rotuladas alvejadas a uma ou mais das seqüências de RNA quimérico mitocondrial de sentido (SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3) ou de RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido (SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6) dentro da célula, é contatada com a célula sob condições de hibridização. O
10 sinal de hibridização depois é comparado com um padrão de hibridização predeterminado de células cancerosas e pré cancerosas normais ou de controle.

Como aqui usado, as sondas rotuladas para realizar a
15 hibridização *in situ* são ácidos nucléicos de RNA, DNA ou sintéticos que podem ser preparado por qualquer método conhecido na técnica. Os ácidos nucléicos sintéticos incluem as ribossondas transcritas *in vitro* ou fragmentos de PCR. Em uma forma de realização preferida desta invenção, os oligonucleotídeos complementares sintéticos podem ser usados. As sondas de
20 oligonucleotídeo complementares são pelo menos cerca de 10 nucleotídeos em comprimento, o mais preferivelmente pelo menos cerca de 14 e o mais preferivelmente pelo menos 18 nucleotídeos em comprimento. O técnico habilitado entende que o comprimento pode se estender de 10 nucleotídeos ou mais a qualquer comprimento que ainda permita a hibridização aos RNAs
25 quiméricos mitocondriais de sentido ou aos RNAs quiméricos mitocondriais de anti-sentido. Em uma forma de realização preferida aqui, o comprimento é cerca de 30 nucleotídeos, mais preferivelmente cerca de 25 nucleotídeos e o mais preferivelmente entre 10 a 50 nucleotídeos em comprimento. Os ácidos nucléicos de sondagem mais longos também podem ser usado. As seqüências

da sonda é pelo menos noventa e cinco por cento homóloga às seqüências listadas na SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5 e SEQ ID NO 6.

5 As sondas de oligonucleotídeo complementares da presente invenção no geral conterão ligações de fosfodiéster, embora em alguns casos, os análogos de sonda de oligonucleotídeos são incluídos que podem ter ligações de nucleosídeo internas alternadas, compreendendo, mas não limitadas a, fosforotioato (Mag *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 19: 1437 a 1441, 1991; e Pat. U.S. 5.644.048), ácido nucléico de peptídeo ou PNA (Egholm, *Nature*, 365: 566 a 568, 1993; e Pat. U.S. 6.656.687), fosforamida (Beaucage, *Methods Mol. Biol.* 20: 33 a 61, 1993), fosforoditioato (Capaldi *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 28: E40, 2000). Outros análogos de oligonucleotídeos complementares incluem tais como, mas não limitados a, morfolino (Summerton, *Biochim. Biophys. Acta*, 1489: 141 a 158, 1999),
10 oligonucleotídeos bloqueados (Wahlestedt *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, 97: 5633 a 5638, 2000), ácidos nucléicos peptídicos ou PNA (Nielsen *et al.*, 1993; Hyrup e Nielsen, 1996) ou oligonucleotídeos de extremidade 5' e 3' modificados por 2-o-(2-metóxi)etila (McKay *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 274: 1715 a 1722, 1999). Todas estas referências são por meio desta expressamente
15 incorporadas por referência. O ácido nucléico pode conter qualquer combinação de desoxirribo- e ribo-nucleotídeos e qualquer combinação de bases, incluindo uracila, adenina, timina, citosina, guanina, inosina, xantanina hipoxantanina, isocitosina, isoguanina, etc.
20

Em uma outra forma de realização da invenção, o ácido nucléico ou sondas de oligonucleotídeo foram rotulados para detectar a hibridização com os RNAs quiméricos mitocondriais de sentido ou os RNAs quiméricos mitocondriais de anti-sentido. As sondas podem ser rotuladas com um marcador detectável por qualquer método conhecido na técnica. Os métodos para rotular as sondas incluem impressão aleatória, rotulagem final,
25

PCR e tradução de entalhe. A rotulagem enzimática é conduzida na presença de polimerase de ácido nucléico, três nucleotídeos não rotulados e um quarto nucleotídeo que é diretamente rotulado, contém um braço ligador para ligar um rótulo ou é ligado a um hapteno ou outra molécula à qual uma molécula de ligação rotulada pode ligar-se. Os rótulos diretos adequados incluem os rótulos radioativos tais como .sup.32 P, .sup.3 H, e .sup.35 S e rótulos não radioativos tais como os marcadores fluorescentes. Os fluorocromos preferidos (fluoróforos) incluem 5(6)-carboxifluoresceína, ácido 6-((7-amino-4-metil-coumarina-3-acetil)amino)hexanóico, 5(e 6)-carbóxi-X-rodamina, Corante de Cianina 2 (Cy2), Corante de Cianina 3 (Cy3), Corante de Cianina 3,5 (Cy3,5), Corante de Cianina 5 (Cy5), Corante de Cianina 5,5 (Cy5,5), Corante de Cianina 7 (Cy7), Corante de Cianina 9 (Cy9) (os corantes de Cianina 2, 3, 3,5, 5 e 5,5 estão disponíveis como ésteres de NHS da Amersham, Arlington Heights, III.) ou os corantes de Alexa compreendendo Alexa 488, Alexa 532, Alexa 556, Alexa 590, etc. (Molecular Probes, Eugene, Oreg.).

As sondas podem ser indiretamente rotuladas incorporando-se um nucleotídeo covalentemente ligado a um hapteno ou outra molécula. Os haptenos preferidos, mas não limitados a, incluem 5(6)-carboxifluoresceína, 2,4-dinitrofenila, digoxigenina e biotina e realizam a detecção da sonda com um anticorpo rotulado direcionado àquele hapteno ou outra molécula. No caso da biotina, a detecção pode ser realizada com avidina ou estreptavidina conjugadas a um rótulo detectável. Os anticorpos, estreptavidina e avidina podem ser conjugados com um marcador fluorescente ou com um marcador enzimático tal como fosfatase alcalina ou peroxidase de rábano para torná-los detectáveis. A estreptavidina, avidina e anticorpos anti-digoxigenina conjugados estão comercialmente disponíveis das companhias tais como Vector Laboratories (Burlingame, Calif.) e Boehringer Mannheim (Indianapolis, Ind.). Em uma outra forma de realização, os anticorpos ou a

estreptavidina podem ser conjugados ao ponto quântico com emissão de fluorescência superior e mais estável (Wu *et al.*, Nature Biotechnol. 21: 41 a 46, 2003).

5 A enzima nos conjugados de anticorpos e estreptavidina pode ser detectada através de uma reação calorimétrica fornecendo-se um substrato para a enzima. Na presença de vários substratos, cores diferentes são produzidas pela reação e estas cores podem ser visualizadas para detectar separadamente as sondas múltiplas. Qualquer substrato conhecido na técnica pode ser usado. Os substratos preferidos para a fosfatase alcalina incluem 10 fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolila (BCIP) e nitro azul de tetrazólio (NBT). O substrato preferido para a peroxidase de rábano é o diaminobenzoato (DAB). Aqueles habilitados na técnica entendem que outras atividades enzimáticas também podem ser usadas.

15 Em uma outra forma de realização da presente invenção, as condições para realizar a hibridização *in situ* para obter resultados exatos e reproduzíveis são descritas. Aqueles de habilidade comum na técnica de hibridização de ácido nucléico reconhecerão que os fatores comumente usados para controlar a severidade da hibridização incluem concentração de formamida ou outro reagente químico desnaturante, a concentração de sal ou 20 força iônica variável, temperatura de hibridização, concentração de detergente, pH e a presença ou ausência de agentes caotrópicos. Estes fatores de severidade pode ser modulados para controlar desse modo a severidade de hibridização das sondas de oligonucleotídeo para o RNA quimérico. A severidade ótima para um ensaio pode ser experimentalmente determinada 25 por examinação de cada fator de severidade até que o grau desejado de discriminação seja obtido.

Outras condições que devem ser controlada para a hibridização *in situ* ótima são por exemplo o uso de agente químico para bloquear a ligação não específica da sonda aos componentes presentes nas amostras biológicas

outros que não os RNAs quiméricos alvo. O agente de bloqueio, mas não limitado a, são RNA, DNA ou oligonucleotídeos sem um rótulo. O agente de bloqueio incorporado na solução de hibridização suprimirá a ligação não específica da sonda rotulada e conseqüentemente, aumentará o sinal para razão de ruído do ensaio. Ainda em um outro aspecto da invenção, a sonda tem uma seqüência complementar à seqüência dos RNAs quiméricos mitocondriais de sentido ou anti-sentido (ver as SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5 e SEQ ID NO 6).

A fixação da seqüência biológica também é um aspecto importante de hibridização *in situ* que deve ser determinado experimentalmente. O fixador altamente reticulante tal como glutaraldeído não é recomendado visto que ele pode bloquear o acesso da sonda ao RNA quimérico mitocondrial de sentido ou RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido alvos. O método preferido desta invenção é fixar a amostra biológica com formalina, embora as amostras congeladas também sejam preferidas. Para expor os RNAs quiméricos mitocondriais de sentido ou o RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido à sonda rotulada, procedimentos adicionais podem ser usados. Por exemplo, a amostra biológica pode ser digerida com a proteinase K para remover as proteínas que podem bloquear o acesso da sonda aos RNAs quiméricos alvos. O tratamento das amostras biológicas com proteinase K ou outras proteases anterior à hibridização *in situ* é bem conhecido para aqueles técnicos no ramo.

Como descrito antes, a presença de repetições invertidas longas no RNA quimérico e nos RNAs quiméricos de anti-sentido, induz a formação de estruturas de filamento duplo altamente estáveis. Estas estruturas junto com as estruturas secundárias da região de filamento único dos RNAs quiméricos podem constituir barreiras para o acesso da sonda aos RNAs quiméricos alvos. Portanto, em um outro aspecto da invenção, a amostra biológica é tratada com HCl 0,2 M durante 10 min na temperatura ambiente

para desnaturar o RNA quimérico. Depois a amostra é rapidamente neutralizada por várias lavagens com um solução tampão no pH 7,4 antes de aplicar o protocolo de hibridização *in situ* aqui descrito. Auxiliado por não mais do que a experimentação de rotina e a divulgação fornecida aqui, 5 aqueles de habilidade na técnica serão facilmente capazes de determinar as condições de hibridização adequadas para realizar os ensaios utilizando os métodos e as composições descritas aqui. As condições de hibridização *in situ* adequadas são aquelas condições adequadas para realizar um procedimento de hibridização *in situ*. Assim, as condições de hibridização *in situ* adequadas 10 tornar-se-ão evidente usando a divulgação e referências aqui; com ou sem experimentação de rotina adicional.

Em uma outra forma de realização da presente invenção, a localização dos RNAs quiméricos mitocondriais de sentido como determinado pela hibridização *in situ* pode ter informação importante para o prognóstico e 15 manejo do paciente com câncer. Em células tumorosas, o RNA quimérico mitocondrial de sentido é encontrado a maioria das vezes no citoplasma em associação limitada com os últimos endossomas/lisossomas. Entretanto, a localização no nucléolo também é encontrada em certas células. Em células tumorosas presentes em biópsias humanas, o sinal de hibridização revela que 20 o RNA quimérico mitocondrial de sentido está no citoplasma apenas ou no citoplasma e no nucléolo ou no citoplasma e no núcleo. Portanto as localizações diferentes podem ter um valor de prognóstico importante. Em uma forma de realização preferida, o quadro das biópsias humanas, por exemplo de tumores de mama, colorretal ou de próstata, pode ser estudado 25 pela hibridização *in situ* para detectar o RNA quimérico. Junto com o sinal de hibridização positivo (independente de como a sonda foi rotulada), a localização intracelular (apenas citoplasma, citoplasma e núcleo ou citoplasma e nucléolo) deve ser estabelecida em cada tumor e os resultados comparados com a sobrevivência de cada paciente.

Em um outro aspecto desta invenção, a mistura de células individuais contendo células normais e/ou tumorosas pode ser submetida à hibridização em suspensão com sondas de oligonucleotídeo rotuladas com fluorocromos e complementares ao RNA quimérico mitocondrial de sentido e ao RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido. Por exemplo a sonda ou as sondas alvejadas ao RNA quimérico mitocondrial de sentido podem ser rotuladas com rodamina e a sonda ou sondas alvejadas ao RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido podem ser rotuladas com Alexa 488. Depois da hibridização e lavagem sob as condições descritas antes, as células podem ser analisadas por citometria de fluxo de rotulagem intracelular.

A forma de realização preferida da invenção é usar a hibridização *in situ* visto que a informação obtida a cerca da localização específica do RNA quimérico na célula tumoral fornece informação adicional importante de prognóstico.

Ainda em uma outra forma de realização da invenção, os métodos moleculares alternativos podem ser usados para detectar a expressão do RNA quimérico e a expressão diferencial do RNA quimérico de sentido e anti-sentido em células normais, pré cancerosas e cancerosas. Estes métodos alternativos incluem, mas não são limitados a, Northern blot, dot blot, arranjos de oligonucleotídeo para o RNA quimérico e os RNAs quiméricos de anti-sentido, amplificação do RNA por RT-PCR, amplificação do RNA por amplificação *in vitro* mediada por transcrição ou TMA, S1 ou ensaios de proteção de ribonuclease, etc.

Em uma forma de realização da presente invenção, o RNA quimérico mitocondrial de sentido pode ser detectado para propósitos de diagnóstico com uma sonda obtida por amplificação de uma região que contém parte da extremidade 5' do RNA ribossômico 16S e uma região parcial ou completa da repetição invertida. Como mostrado na Fig. 1, o iniciador reverso pode ser por exemplo o iniciador 1 (SEQ ID NO 139) e os

iniciadores dianteiros podem ser os iniciadores 3, 4, 5, 6 ou 7 (SEQ ID NOS 129, 116, 106, 102, 63). Os iniciadores localizado em outras posições também podem ser usados e eles são facilmente designados por aqueles habilitados na técnica. Em um outro aspecto desta invenção, o cDNA que pode ser

5 sintetizado com uma enzima com atividade de transcrição reversa e iniciadores aleatórios tais como hexâmeros ou mais longos, familiares àqueles habilitados na técnica.

Os amplicons de 210, 350, 500 ou 850 pb obtidos ou de outros tamanhos que resultam usando-se os iniciadores localizados em outras

10 posições, podem ser detectados por eletroforese em gel em gel de agarose ou géis de poliacrilamida (Sambrook *et al.*, 1989) e manchamento com brometo de etídio ou outros corantes de intercalação. Os amplicons podem ser purificados de acordo com os fabricantes instrutivos.

A detecção do RNA quimérico mitocondrial pode ser realizada

15 pela análise de Northern blot (Sambrook *et al.*, 1989). Depois da separação dos RNAs em um gel de agarose, os fragmentos são transferidos a uma membrana (nitrocelulose ou Náilon) por procedimentos bem conhecidos àqueles habilitados na técnica (Sambrook *et al.*, 1989). Para sondar as

20 membranas, um fragmento de 250 pb correspondendo à posição 1000 a 125 do RNA quimérico mitocondrial de sentido pode ser amplificado. O amplicon é purificado (Wizard, Promega) de acordo com a instrução do fabricante e 10 nanogramas são usados como padrão para uma segunda amplificação. Esta amplificação é realizada com a mistura de PCR padrão (Invitrogen) mais 5 micro Curie de ^{32}P - α -dCTP (Amersham). O fragmento de amplificação

25 radioativa é desnaturado por incubação a 95°C durante 10 minutos e a sonda desnaturada foi adicionada à mistura de hibridização. As membranas são hibridizadas durante 16 horas a 65°C e depois lavadas duas vezes com 2 vezes de tampão SSC, duas vezes com 0,5 de SSC a 60°C e 0,2 de SSC a 45°C (Sambrook *et al.*, 1989). A membrana lavada foi exposta à película de raio X

durante a noite a -70°C (Sambrook *et al.*, 1989). O sinal de hibridização na membrana corresponde a um componente principal de cerca de 2.400 nucleotídeos que é o tamanho que corresponde ao RNA ribossômico 16S (1559 nucleotídeos) mais a repetição invertida de 815 nucleotídeos.

5 Em uma outra forma de realização da invenção, parte do RNA quimérico mitocondrial de sentido pode ser detectada depois da digestão de ribonuclease de RNA total extraído das células ou tecidos. A estrutura de filamento duplo ou o ramo do RNA quimérico mitocondrial de sentido é resistente à digestão com ribonuclease A. O RNA total das células ou tecidos
10 extraído com TriZol (Invitrogen) é dissolvido em um volume pequeno de 2 vezes SSC. A solução é incubada com ribonuclease A (Sigma) em uma concentração final de 50 microgramas por ml. Depois de 30 min a 25°C , o RNA resistente à nuclease é extraído com TriZol e precipitado com isopropanol a -20°C durante a noite. O RNA resistente à nuclease é dissolvido
15 em água tratada com DEPC destilada e usado como padrão para a amplificação por RT-PCR. Esta amplificação, realizada com os iniciadores alvejados às posições 55 e 790 do RNA ribossômico 16S, produz um fragmento de cerca de 730 pares de bases com uma seqüência que apresenta 100 % de identidade com a seqüência do ramo do RNA quimérico
20 mitocondrial de sentido (SEQ ID NO 1). Ao contrário, o filamento único do RNA quimérico e correspondendo à metade 3' ou o RNA ribossômico mitocondrial 12S ou o RNA ribossômico 18S ou então o RNA para GAPDH são totalmente digeridos pelo tratamento com a ribonuclease A e portanto, nenhum produto de amplificação é obtido quando os iniciadores alvejados a
25 estes RNAs são usados.

Em um outro aspecto da invenção, o ramo do RNA quimérico mitocondrial de sentido obtido depois do tratamento do RNA total com a ribonuclease A pode ser detectado por Northern blot. O RNA resistente à nuclease e recuperado por extração com TriZol e precipitação com

isopropanol, é separado por eletroforese em um gel de agarose. Depois da transferência, a membrana é blotted com a sonda descrita antes e usada para Northern blot (Sambrook *et al.*, 1989) para o RNA quimérico mitocondrial de sentido.

5 Ainda em uma outra forma de realização, esta invenção é direcionada aos kits adequados para realizar um ensaio que detecta os RNAs quiméricos mitocondriais de sentido ou o RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido em amostras biológicas. O geral e a forma de realização preferida, as composições e os métodos são fornecidos que são adequados para a detecção do RNA quimérico e do RNA quimérico de anti-sentido por hibridização *in situ* foram previamente descritos aqui. As seqüências de sondas de oligonucleotídeo preferidas, mas não limitadas a, são listadas. Além disso, os métodos adequados para usar as sondas de oligonucleotídeo ou grupo de sondas de oligonucleotídeo de um kit para detectar os RNAs quiméricos ou os RNAs quiméricos de anti-sentido em uma amostra foram previamente descritos aqui.

15 O kit desta invenção compreende uma ou mais sondas de oligonucleotídeo e outros reagentes ou composições que são selecionados para realizar a hibridização *in situ* usada para detectar os RNAs quiméricos mitocondriais de sentido ou os RNAs quiméricos mitocondriais de anti-sentido em uma amostra. Cada grupo de duas ou mais sondas de oligonucleotídeo é preferivelmente rotulado com porções detectáveis independentes de modo que em uma célula individual da amostra biológica os RNAs quiméricos mitocondriais de sentido ou os RNAs quiméricos mitocondriais de anti-sentido podem ser detectados. Em uma forma de realização preferida, as sondas de oligonucleotídeo do kit que é usado para detectar os RNAs quiméricos mitocondriais de sentido ou os RNAs quiméricos mitocondriais de anti-sentido são cada rotuladas por grupo com um hapteno diferente. O hapteno pode ser biotina, digoxigenina ou

fluoresceína que podem ser reconhecidos no método de hibridização *in situ* com anticorpos ou estreptavidina rotulados com enzimas diferentes (por exemplo, fosfatase ou peroxidase alcalina). Alternativamente, cada sonda de oligonucleotídeo de cada grupo de sondas pode ser rotulada com grupos fluorescentes detectáveis independentes. Por exemplo, o grupo de sondas de oligonucleotídeos para detectar o RNA quimérico mitocondrial de sentido pode ser rotulado com rodamina, enquanto que o grupo de sondas de oligonucleotídeos para detectar os RNAs quiméricos mitocondriais de anti-sentido pode ser rotulado com Alexa 488. Além disso, os métodos são fornecidos para determinar a localização do RNA quimérico ou dos RNAs quiméricos de anti-sentido em células da amostra biológica. Adicionalmente, as composições e os métodos da invenção podem ser usados para determinar a co-localização do RNAs quiméricos ou dos RNAs quiméricos de anti-sentido com marcadores específicos das organelas celulares diferentes, pelo uso de análise de microscopia confocal.

As composições e os métodos fornecidos aqui são considerados particularmente úteis para a detecção e diagnóstico de pré câncer e câncer. O termo câncer como fornecido aqui, inclui as células afligidas por qualquer uma das condições anômalas identificadas seguintes. Estas incluem leucemia mielóide aguda ou crônica, leucemia linfoblástica aguda ou crônica, mieloma múltiplo, doença de Hodgkin, linfoma que não de Hodgkin ou linfoma maligno; carcinoma estomacal, carcinoma esofágico ou adenocarcinoma, adenocarcinoma dutal pancreático, insulinooma, glucagonoma, gastrinoma, adenocarcinoma de intestino pequeno, carcinomas colorretais; carcinoma hepatocelular, adenoma hepatocelular; carcinóides, trato genitourinário tal como adenocarcinoma renal, tumor de Wilm, carcinoma de bexiga e uretra e adenocarcinoma prostático, câncer de testículo como seminoma, teratoma, teratocarcinoma, carcinoma de célula intersticial; carcinoma endometrial do útero, carcinoma cervical, carcinoma ovariano,

carcinoma de vulva e vagina, tumores de célula de Sertoli-Leydig, melanoma e carcinoma das trompas de falópio; carcinomas pulmonares, alveolares e bronquiolares; tumores cerebrais; melanoma maligno de pele, carcinoma de célula basal, carcinoma de célula escamosa e sarcoma de Kaposi. Também fibrossarcoma, angiossarcoma e rhabdomiossarcoma do coração e outras malignidades que são familiares àqueles habilitados na técnica.

Terapia do câncer e pré câncer

Os medicamentos quimioterapêuticos podem induzir uma série de respostas celulares que sofre impacto na proliferação e sobrevivência de célula tumoral. A mais estudada destas respostas celulares é a apoptose e é evidente no momento que os medicamentos anti-câncer podem matar as células tumorosas ativando-se caminhos apoptóticos comuns. Infelizmente, estes medicamentos também afetam rapidamente as células normais de divisão da medula óssea, células hematopoiéticas e intestinais normais e queratinócitos da matriz capilar (McKinnell *et al.*, *The biological Basis of cancer*, 1998; Komarov *et al.*, *Science* 285 : 1733 a 1737, 1999; Johnstone *et al.*, *Cell* 108: 153 a 164, 2002).

Por outro lado, muitas células tumorosas têm fatores iniciadores apoptóticos mutados, fatores reguladores e fatores executores de apoptose, que explicam porque a célula tumoral de diferentes tipos de câncer torna-se resistente a uma variedade de medicamentos quimioterapêuticos e à radiação. As mutações foram relatadas dos fatores do caminho intrínseco, eventos pós mitocondriais e caminho extrínseco de apoptose (Rampino *et al.*, *Science* 275: 967 a 969, 1997; Vogelstein *et al.*, *Nature* 408: 307 a 310, 2000; Teitz *et al.*, *Nature Med.* 6: 529 a 535, 2000; Reed, *J. Clin. Oncol.*, 17: 2941 a 2953, 1999; Johnston *et al.*, *Cell* 108: 153 a 164, 2002). Portanto, uma paradigma de um tratamento de terapia do câncer é um procedimento que seletivamente provoca a apoptose de células tumorosas, que não alteram as células proliferativas normais e que desviam os fatores alterados ou mutados

dos caminhos apoptóticos diferentes.

As composições e os métodos da presente invenção, são fundamentados na descoberta de que as células tumorosas e pré tumorosas sobexpressam o RNA quimérico mitocondrial de sentido em níveis similares das células proliferativas normais. Entretanto, e ao contrário das células proliferativas normais, as células tumorosas e pré tumorosas infrarregulam a expressão do RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido.

As estruturas destes transcritos são mostradas na Fig. 1 e Fig. 3 e as seqüências correspondentes nas SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5 e SEQ ID NO 6.

Ao contrário, e constituindo uma outra descoberta surpreendente, as células pré tumorosas e tumorosas sobexpressam o RNA quimérico mitocondrial de sentido e infrarregulam a expressão do RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido. A supressão ou inibição da síntese do RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido em células pré tumorosas e tumorosas constitui uma nova diferença no fenótipo entre uma célula cancerosa e uma célula proliferativa normal, que é considerada como uma das formas de realização principais da presente invenção. Além disso, as células tumorosas em biópsias humanas de diferentes tipos de câncer, também exibem o mesmo fenótipo das células cancerosas em cultura (Figs. 5A e 5B).

Embora a função do RNA quimérico mitocondrial de sentido e do RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido não seja clara, uma correlação restrita existe entre a expressão destes RNAs e a proliferação celular. Por exemplo, as células proliferativas normais nos tecidos como fígado, rim e baço e definidos como tais pela expressão dos antígenos tais como Ki-67, PCNA ou histona H3 fosforilada, sobexpressam o RNA quimérico mitocondrial de sentido assim como o RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido. Nas células não proliferativas dos mesmos tecidos, que não expressam Ki-67 ou PCNA, o RNA quimérico mitocondrial

de sentido e o RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido não são expressados. Além disso e como ilustrado na Fig.7, os linfócitos humanos estimulados com o mitógeno PHA sintetizam o DNA e expressam os antígenos proliferativos Ki-67 e PCNA. Os linfócitos estimulados também sobressomem o RNA quimérico mitocondrial de sentido assim como o RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido (Fig. 7). Ao contrário, os linfócitos em repouso ou os linfócitos não estimulados não expressam nem o RNA quimérico mitocondrial de sentido nem o RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido.

10 A descoberta prévia, que é uma parte fundamental da presente invenção, mostra que enquanto as células proliferativas normais expressam os RNAs quiméricos mitocondriais de sentido e de anti-sentido, as células tumorosas expressam o RNA quimérico mitocondrial de sentido e infrarregulam a expressão do RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido.

15 Para entender a função destes RNAs na proliferação celular, as células cancerosas em cultura foram tratadas com os oligonucleotídeos de anti-sentido alvejados aos RNAs quiméricos mitocondriais de sentido (SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3) ou ao RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido (SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6). Os resultados, que constituem uma outra descoberta surpreendente, mostraram que sob estas condições as células sofrem a programação da morte celular ou apoptose.

20 Depois do tratamento com os oligonucleotídeos complementares aos RNAs quiméricos mitocondriais de sentido ou anti-sentido durante 6 a 15 horas, entre 75 a 96 % das células sofrem apoptose (Tabela 2). A mudança observada nas células tratadas foram condensação de cromatina, fragmentação nuclear, fragmentação do DNA, ativação das caspases e processo alterado da membrana celular. Os oligonucleotídeos de controle com 4 ou mais desemparelhamentos ou oligonucleotídeos misturados não induzem a apoptose. Também, as células não foram afetadas se tratadas com os

oligonucleotídeos alvejados ao RNA mitocondrial 12S de sentido ou anti-sentido ou alvejados ao mRNA ou ao transcrito de anti-sentido da subunidade ND1 mitocondrial. No geral, os oligonucleotídeos alvejados ao RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido foram muito mais eficazes, na mesma concentração, do que os oligonucleotídeos alvejados ao RNA quimérico mitocondrial de sentido. Isto foi um resultado esperado visto que as células tumorosas sobreexpressam o RNA quimérico mitocondrial de sentido e portanto é mais difícil alcançar uma concentração de oligonucleotídeos dentro da célula para interferir com todas as cópias deste transcrito. Por outro lado, visto que as células tumorosas infrarregulam o RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido, deve ser mais fácil interferir com este RNA visto que existe um número inferior de cópias por células.

A indução da apoptose também é seletiva para as células tumorosas. Os linfócitos humanos em repouso ou os linfócitos humanos estimulados durante 48 horas com PHA não são afetados pelo tratamento com os oligonucleotídeos complementares aos RNAs quiméricos mitocondriais de anti-sentido ou alvejados ao RNA quimérico mitocondrial de sentido mesmo depois do tratamento durante a noite e com uma dose alta de oligonucleotídeos complementares (15 uM).

A indução de apoptose pelo tratamento com os oligonucleotídeos complementares alvejados ao RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido (SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6) foi obtida, mas não limitada a, célula HL-60 de leucemia pró mielocítica, MOLT-4 de leucemia linfoblástica aguda, uma célula de leucemia linfocítica T, Jurkat, uma leucemia de célula T, Devernelle ou linfoma B, NSO/2 ou mieloma, células HeLa, DU145, PC- 3, Caco-2, Hep-2 e HepG2. Duas células, MCF/7 (carcinoma de mama) e melanoma, que podem ser consideradas como o paradigma das células tumorosas resistentes ao tratamento (quimioterapia ou radioterapia) sofrem apoptose acima de 80 % quando tratadas durante 15

horas com os oligonucleotídeos complementares alvejados ao RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido (SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6). Um efeito apoptótico inferior foi obtido com os oligonucleotídeos complementares ao RNA quimérico de sentido (SEQ ID NO 1). Como
5 relatado antes, os oligonucleotídeos com 4 desemparelhamentos ou oligonucleotídeos misturados não induzem a morte celular.

Descritos abaixo estão os métodos e as composições para tratar o câncer usando os RNAs quiméricos de sentido e os RNAs quiméricos de anti-sentido como um alvo terapêutico.

10 A forma de realização preferida, mas não limitada a, são os métodos e as composições para tratar o câncer usando oligonucleotídeos complementares aos RNAs quiméricos de anti-sentido. O resultado deste tratamento é pelo menos produzir em um paciente tratado um benefício
15 saudável, que no caso do câncer, inclui mas não é limitado a redução do câncer, palição dos sintomas do câncer e controle da propagação metastática do câncer. Todos os tais métodos envolvem a indução de apoptose nas células tumorosas e com efeito menor nas células normais. Os oligonucleotídeos complementares que alvejam os RNAs específicos foram usados para
20 diminuir ou abrogar a expressão de uma variedade grande de mRNA ou da síntese das proteínas correspondentes (por exemplo, Vickers *et al.*, J. Biol. Chem., 278: 7108 a 7118, 2003). No momento, cerca de 42 oligonucleotídeos de anti-sentido com químicas diferentes correntemente estão sendo triados como medicamentos potenciais (Stephens e Rivers, Curr. Opin. Mol. Therapeut., 5: 118 a 122, 2003) (ver também como exemplos as Pat. U.S.^s
25 5.801.154; 6.576.759; 6.720.413; 6.573.050 e 6.673.917). Todas destas referências são por meio desta expressamente incorporadas por referência.

Em um aspecto desta invenção, um ou mais oligonucleotídeos alvejados ao RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido podem ser usados. O uso de dois ou mais oligonucleotídeos complementares é mais eficaz e

apresenta algum grau de sinergismo.

O oligonucleotídeo da invenção pode ser complementar ao RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido ou ao RNA quimérico mitocondrial de sentido. Os oligonucleotídeos complementares ligar-se-ão aos RNAs quiméricos mitocondriais de anti-sentido ou aos RNAs quiméricos mitocondriais de sentido e interferirão com suas funções. A complementaridade absoluta, embora preferida, não é requerida. Uma seqüência de oligonucleotídeo "complementar" a uma porção de um RNA, como referido aqui, significa uma seqüência tendo complementaridade suficiente para ser capaz de hibridizar com o RNA, formando um duplex estável. A capacidade de hibridizar dependerá tanto do grau de complementaridade quanto do comprimento do oligonucleotídeo. No geral, quanto mais longa a hibridização do ácido nucléico, mais desemparelhamentos de base com um RNA pode conter e ainda forma um duplex estável. Aqueles habilitados na técnica podem determinar um grau tolerável de desemparelhamento pelo uso de procedimentos padrão para determinar o ponto de fusão do complexo hibridizado.

No geral, os oligonucleotídeos complementares para hibridizar com os mRNAs por proteínas diferentes são alvejados à região não traduzida 5' do mRNA incluindo o complemento do códon de início AUG ou à região não traduzida 3' para serem mais eficazes. Os oligonucleotídeos complementares às regiões de codificação de mRNA são inibidores menos eficientes da tradução (ver as referências prévias). O RNA quimérico mitocondrial de sentido e o RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido são RNA de não codificação e portanto a região alvo dos oligonucleotídeos pode ser complementar a qualquer região destes transcritos. As regiões mais eficazes estão localizadas em torno dos segmentos de filamento único do RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido determinado varrendo-se as seqüências do RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido ou sentido com

oligonucleotídeos complementares designados a todos os 30 nucleotídeos. Aqueles habilitados na técnica entenderão que outras seqüências dentro das seqüências completas dos transcritos da SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5 e SEQ ID NO 6, são alvos para
5 designar os oligonucleotídeos complementares alternativos.

Os oligonucleotídeos complementares alvejados ao RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido ou ao RNA quimérico mitocondrial de sentido que resultam na indução de morte de célula tumoral de acordo com a presente invenção no geral conterão suportes principais diferentes para as
10 ligações de fosfodiéster naturais. Os oligonucleotídeos podem ter ligações de nucleosídeo internas alternadas, compreendendo, mas não limitados a, fosforotioato (Mag *et al.*, Nucleic Acids Res. 19: 1437 a 1441, 1991; e Pat. U.S. 5.644.048), ácido nucléico de peptídeo ou PNA (Egholm, Nature, 365: 566 a 568, 1993; e Pat. U.S. 6.656.687), fosforamida (Beaucage, Methods
15 Mol. Biol. 20: 33 a 61, 1993), fosforoditioato (Capaldi *et al.*, Nucleic Acids Res., 28: E40, 2000). Outros análogos de oligonucleotídeo incluem tais como, mas não limitados a, morfolino (Summerton, Biochim. Biophys. Acta, 1489: 141 a 158, 1999), oligonucleotídeos bloqueados (Wahlestedt *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. US, 97: 5633 a 5638, 2000), ácidos nucléicos peptídicos ou PNA
20 (Nielsen *et al.*, 1993; Hyrup e Nielsen, 1996) ou oligonucleotídeos de extremidade 5' e 3' modificados por 2-o-(2-metóxi)etila (McKay *et al.*, J. Biol. Chem., 274: 1715 a 1722, 1999). Todas estas referências são por meio desta expressamente incorporadas por referência. Os ácidos nucléicos podem conter qualquer combinação de desoxirribo- e ribo-nucleotídeos e qualquer
25 combinação de bases, incluindo uracila, adenina, timina, citosina, guanina, inosina, xantantina hipoxantantina, isocitosina, isoguanina, etc.

Os oligonucleotídeos complementares de acordo com a invenção podem compreender pelo menos uma porção básica modificada que é selecionada do grupo incluindo mas não limitado a 5-fluorouracila, 5-

bromouracila, 5-clorouracila, 5-iodouracila, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxiidroxilmetil)uracila, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracila, diidrouacila, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-adenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracila, 5-metoxiaminometil-2-tiouracila, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxicarboximetiluracila, 5-metoxiuracila, 2-metil-N6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), vibutoxosina, pseudouracila, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracila, 2-tiouracila, 4-tiouracila, 5-metiluracila, éster metílico do ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético (v), 5-metil-2-tiouracila, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil)uracila, (acp3)w, e 2,6-diaminopurina.

Os oligonucleotídeos complementares também podem compreender pelo menos uma porção de açúcar modificado selecionada do grupo incluindo mas não limitado a arabinose, 2-fluoroarabinose, xilulose, e hexose.

Em uma outra forma de realização da presente invenção, os oligonucleotídeos complementares são designados para hibridizar com qualquer região do RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido ou a qualquer região do RNA quimérico mitocondrial de sentido. Os oligonucleotídeos complementares devem ser pelo menos de dez nucleotídeos em comprimento e são preferivelmente oligonucleotídeos complementares que variam de 10 a cerca de 50 nucleotídeos em comprimento. Em aspectos específicos, o oligonucleotídeo complementar é pelo menos de 12 nucleotídeos, pelo menos de 18 nucleotídeos, pelo menos de 22 nucleotídeos, pelo menos de 30 nucleotídeos, pelo menos de 50 nucleotídeos.

É importante considerar para os experimentos *in vitro* assim como *in vivo* utilizar os controles que distinguem entre a interferência de anti-

sentido com a função do RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido ou RNA quimérico mitocondrial de sentido com efeitos biológicos não específicos dos oligonucleotídeos de anti-sentido ou complementares. Portanto, o projeto dos oligonucleotídeos deve evitar a presença na sequência de trilhas de CpG, trilhas de 5' GGGG e outras seqüências que têm efeito tóxico nas células animais como relatado na Pat. U.S. 6.673.917, incorporada aqui por referência. Também a presença da seqüência 5' CGTTA foi evitada para o efeito que não de anti-sentido que foi relatado (Tidd *et al.*, Nucleic Acids Res. 28: 2242 a 2250, 2000).

Em uma outra forma de realização da presente invenção, os oligonucleotídeos complementares alvejados aos RNAs quiméricos mitocondriais de anti-sentido ou alvejados aos RNAs quiméricos mitocondriais de sentido como agentes terapêuticos para animais ou para os pacientes que têm câncer podem induzir sensibilidade aos medicamentos terapêuticos anti-câncer e radiação. A sensibilidade induzida, também conhecida como sensibilização ou hipersensibilidade, pode ser medida em células tumorosas que apresentam tolerância ao produto terapêutico anti-câncer ou radiação. Os medicamentos anti-câncer compreendem aqueles já conhecidos na técnica e em uso ou os medicamentos não descobertos até agora. Dentre os medicamentos quimioterapêuticos convencionais estão os agentes alquilantes, anti-metabólito, antibióticos e agentes anti-microtubulares. Alguns exemplos destes medicamentos são cisplatina, metotrexato, doxorubicina dactinomicina, mitomicina, ciclofosfamida, etc.

Em um outro aspecto da invenção, junto ou depois do tratamento de um animal ou de um paciente que tem câncer com oligonucleotídeos complementares alvejados ao RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido e/ou ao RNA quimérico mitocondrial de sentido, o paciente pode ser tratado com radioterapia, em que a dita radioterapia inclui radiação ultravioleta, radiação gama, partículas alfa, partículas beta, raio X e feixes de

elétron.

Em um outro aspecto desta invenção, a interferência com a função do RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido ou do RNA quimérico mitocondrial de sentido para induzir a morte de célula tumoral pode ser obtida por interferência de RNA ou silenciamento de RNA. Durante os seis últimos anos a interferência de RNA (RNAi) tem emergido como um método novo e promissor para o silenciamento de gene nas células de mamífero (Elbashir *et al.*, Nature 411: 494 a 498, 2001; McManus *et al.*, Nature Rev. Genet. 3: 737 a 747, 2002). As moléculas de RNA de filamento duplo sinteticamente sintetizadas de cerca de 19 a 21 nucleotídeos em comprimento hibridizam especificamente ao seu mRNA alvo complementar, levando à degradação do mRNA e desmonte de proteína subsequente. Vários genes diferentes foram silenciados com êxito pelo RNA interferente pequeno ou siRNA (Lu *et al.*, Curr. Opin. Mol. Ther. 5: 225 a 234, 2003.; Wacheck *et al.*, Oligonucleotides 13: 393 a 400, 2003). Portanto, o RNA de filamento duplo sintético de cerca de 19 a 21 nucleotídeos alvejados ao RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido ou ao RNA quimérico mitocondrial de sentido pode ser usado para degradar estes transcritos e induzir a morte de célula tumoral. Aqueles familiares na técnica entenderão que a seqüência do siRNA tem que ser complementar à qualquer região dos RNAs quiméricos mitocondriais de anti-sentido ou aos RNAs quiméricos mitocondriais de sentido (SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5 e SEQ ID NO 6).

Em uma outra forma de realização da invenção, as ribozimas podem ser usadas para interferir com o RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido ou com o RNA quimérico mitocondrial de sentido para induzir a morte de célula tumoral. A seqüência da ribozima tem que ser designada de acordo com a seqüência do RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido (SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6) ou do RNA quimérico

mitocondrial de sentido (SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3) para clivar as regiões específicas do transcrito que são mais eficientes para provocar a morte de célula tumoral. As ribozimas são moléculas de RNA enzimáticas capazes de catalisar a clivagem específica do RNA (Rossi, Curr. Biology 4: 469 a 471, 1994). O mecanismo de ação da ribozima envolve a hibridização específica de seqüência da molécula de ribozima ao RNA alvo complementar, seguido por uma clivagem endonucleolítica. A composição das moléculas de ribozima deve incluir uma ou mais seqüências complementares ao mRNA de gene alvo e deve incluir a seqüência catalítica bem conhecida responsável pela clivagem do mRNA e descrita na Pat. U.S. 5.093.246, que é aqui incorporada por referência em sua totalidade. Como tal, dentro do escopo da invenção as moléculas de ribozima de cabeça de martelo são engendradas de modo que específica e eficazmente catalisam a clivagem endonucleolítica dos RNAs quiméricos mitocondriais de anti-sentido ou dos RNAs quiméricos mitocondriais de sentido. A construção e a produção de ribozimas de cabeça de martelo são bem conhecidas na técnica e foram descritas (Haseloff *et al.*, Gene, 82: 43 a 52, 1989). As ribozimas da presente invenção também incluem as RNA endorribonucleases (Zaug *et al.*, Science, 224: 574 a 578, 1984).

20 A terapia de gene refere-se ao tratamento ou prevenção do câncer realizado pela administração de um ácido nucléico a um paciente que tem câncer ou em que a prevenção ou inibição do câncer é desejável. Nesta forma de realização da presente invenção, o ácido nucléico terapêutico produzido intracelularmente é um RNA complementar alvejado ao RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido ou ao RNA quimérico mitocondrial de sentido que medeia o efeito terapêutico interferindo-se ou inibindo-se a função destes transcritos mitocondriais, induzindo a morte de célula tumoral. Portanto, um método preferido é utilizar uma construção de DNA recombinante em que a transcrição do RNA de anti-sentido é colocada sob o

controle de promotores fortes de RNA polimerase II ou III. A expressão da seqüência que codifica o RNA complementar pode ser por qualquer promotor conhecido na técnica para agir em células mamíferas, preferivelmente humanas. Tais promotores incluem mas não são limitados a região promotora inicial de SV40 (Benoist e Chambon, Nature 290: 304 a 310, 1981), o promotor de timidina cinase de herpes (Wagner *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78: 1441 a 1445, 1981), as seqüências reguladoras do gene metalotioneína (Brinster *et al.*, Nature 296: 39 a 42, 1982), o promotor do vírus sarcoma de Rous (Yamamoto *et al.*, Cell 22: 787 a 797, 1980), etc. A construção de DNA recombinante para produzir o RNA complementar pode ser um vetor viral que inclui, mas não é limitado ao vetor de adenovírus, vetor de vírus associado a adeno, vetor do vírus simples do herpes, vetor do vírus de vacina e vetores de retrovírus. O vetor é introduzido nas células tumorosas alvo, em uma composição farmacêutica, usando métodos familiares àqueles habilitados na técnica.

As composições farmacêuticas da invenção compreendendo uma quantidade eficaz de um ácido nucléico complementar (oligonucleotídeos complementares, siRNA, ribozimas ou vetores virais) em um carregador farmacêuticamente aceitável, que pode ser administrado a um paciente que tem câncer para interferir com a função do RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido ou RNA quimérico mitocondrial de sentido e induzir a apoptose das células tumorosas. Os ácidos nucléicos complementares podem ser formulados em uma composição farmacêutica, que pode incluir carregadores, diluentes, tampões, conservantes, agentes ativos de superfície, polietilenimida (PEI), lipossomas ou outra formulação lipídica conhecida na técnica. A composição farmacêutica pode ser administrada por aplicação tópica, administração oral, parenteral ou retal. A administração parenteral inclui injeção intravenosa, subcutânea, intraperitoneal ou intramuscular ou administração pulmonar por inalação ou

insuflação.

As composições da presente invenção podem ser utilizadas para terapêutica, diagnósticos, profilaxia e como reagentes e kits de pesquisa.

As composições e os métodos fornecidos aqui são considerados particularmente úteis para o tratamento do câncer. O termo

5 câncer como fornecido aqui, inclui as células afligidas por qualquer uma das condições anômalas identificadas seguintes. Estas incluem leucemia mielóide aguda ou crônica, leucemia linfoblástica aguda ou crônica, mieloma múltiplo, doença de Hodgkin, linfoma que não de Hodgkin ou linfoma maligno;

10 carcinoma estomacal, carcinoma esofágico ou adenocarcinoma, adenocarcinoma dutal pancreático, insulinoma, glucagonoma, gastrinoma, adenocarcinoma de intestino pequeno, carcinomas colorretais; carcinoma hepatocelular, adenoma hepatocelular; carcinóides, adenocarcinoma do trato genitourinário tal como renal, tumor de Wilm, carcinoma de bexiga e uretra e

15 adenocarcinoma prostático, câncer de testículo como seminoma, teratoma, teratocarcinoma, carcinoma de célula intersticial; carcinoma endometrial do útero, carcinoma cervical, carcinoma ovariano, carcinoma de vulva e vagina, tumores de célula de Sertoli-L-eydig, melanoma e carcinoma das trompas de falópio; carcinomas pulmonares, alveolares e bronquiolares; tumores

20 cerebrais; melanoma maligno de pele, carcinoma de célula basal, carcinoma de célula escamosa e sarcoma de Karposi. Também fibrossarcoma, angiossarcoma e rabdomiossarcoma do coração e outras malignidades que são familiares àqueles habilitados na técnica. Assim, o termo “célula cancerosa” como fornecido aqui, inclui uma célula afligida por qualquer uma das

25 condições identificadas acima.

Os exemplos seguintes servem para descrever a maneira de usar a invenção descrita acima assim como para demonstrar a melhor maneira para realizar vários aspectos da invenção. É entendido que de nenhum modo estes exemplos pretenderam limitar o escopo desta invenção, mas certamente

eles são apresentados para propósitos ilustrativos.

EXEMPLO 1

Isolamento e seqüência do RNA quimérico humano mitocondrial de sentido.

5 (Fig. 1A, SEQ ID NO 1)

Os experimentos iniciais indicaram que o RNA quimérico mitocondrial de sentido humano putativo conteve uma estrutura secundária mais complexa e estável que o RNA quimérico de camundongo (Villegas *et al.*, DNA & Cell Biol. 19: 579 a 588, 2000; Villegas *et al.*, Nucleic Acids Res. 10 30: 1895 a 1901, 2002). Portanto e com base na estrutura secundária do RNA quimérico mitocondrial de camundongo, uma estrutura secundária do RNA quimérico mitocondrial humano de sentido teórica foi deduzida (Fig. 1A). O transcrito humano teórico conteve a seqüência completa do RNA mitocondrial 16S de sentido unido pela extremidade 5' a um fragmento do 15 RNA mitocondrial 16S de anti-sentido formando uma alça de comprimento desconhecido (Fig. 1A). O segmento do RNA mitocondrial 16S de anti-sentido foi completamente complementar ao RNA mitocondrial 16S de sentido e portanto correspondeu a uma repetição invertida unida à extremidade 5' do transcrito 16S de sentido. Com base nesta estrutura, os 20 iniciadores foram designados para amplificar este transcrito putativo pela RT-PCR. Um iniciador reverso estava na posição 11 a 31 da extremidade 5' do RNA mitocondrial 16S de sentido humano ou no começo da alça teórica (iniciador 1, Fig. 1A) (SEQ ID NO 139). A seqüência do iniciador dianteiro usado foi aquela das posições 213 a 234 do RNA mitocondrial 16S de sentido e corresponde ao iniciador 3 na Fig. 1A. A amplificação do RNA de vários 25 tecidos e células humanos incluindo HeLa, HL-60, Du145, MCF/7 e linfócitos humanos estimulados com PHA (ver Exemplo 7) por RT-PCR usando os iniciadores 1 e 3 (Fig. 1A), produziu um único amplicon de cerca de 210 pb (Figura 2). A RT-PCR foi realizada como descrito antes (Villegas

et al., DNA & Cell Biol. 19: 579 a 588, 2000; Villegas *et al.*, Nucleic Acids Res. 30: 1895 a 1901, 2002). Os amplicons de cada tecido ou células humanos foram clonados e ambos os filamentos foram seqüenciados. Em todos os casos, uma seqüência idêntica de 216 pb foi obtida, contendo uma repetição invertida de 184 nucleotídeos unidos aos primeiros 31 nucleotídeos da extremidade 5' do RNA mitocondrial 16S de sentido. Depois, nós determinamos se a repetição invertida foi mais longa do que 184 nucleotídeos e se estendeu mais para a extremidade 5' do RNA mitocondrial 16S de anti-sentido (Fig. 1A). O cDNA de HeLa ou outras células descritas antes foi amplificado entre o iniciador reverso 1 posicionado na alça como descrito antes e os iniciadores 4 a 7 caminharam para a extremidade 5' da repetição invertida mais longa putativa (Fig. 1A). Pelo uso deste método, os fragmentos de amplificação de aproximadamente 500, 700 e 800 pb foram obtidos quando o iniciador 1 foi usado em combinação com os iniciadores 4, 5 e 6, respectivamente. Por outro lado, quando o cDNA foi amplificado entre o iniciador 1 e o iniciador 7 no produto de amplificação foi obtido, sugerindo que a extremidade 5' da repetição invertida foi entre os iniciadores 7 e 8 (ver abaixo). A seqüência completa do amplicon de 800 pb revela uma repetição invertida de 769 nucleotídeos unidos aos primeiros 31 nucleotídeos do RNA mitocondrial 16S de sentido (SEQ ID NO 1) (Fig. 1A). A seqüência na extremidade 3' da repetição invertida unida ao RNA mitocondrial 16S de sentido foi idêntica àquela encontrada na mesma região do amplicon de 216 pb. Isto é importante porque indica que em ambos os casos nós amplificamos o mesmo RNA. Além disso, a seqüência mostrou que os 50 nucleotídeos da extremidade 3' do RNA mitocondrial 16S de anti-sentido foram perdidos na repetição invertida do RNA quimérico mitocondrial de sentido. De modo geral, estes resultados sugerem que a estrutura de filamento duplo formada entre a repetição invertida e o RNA mitocondrial 16S de sentido começa na posição 51 do último e forma uma alça putativa de 50 nucleotídeos.

Para confirmar o tamanho da alça, o cDNA humano foi amplificado por PCR entre o iniciador dianteiro 2 posicionado na extremidade 3' da repetição invertida e o iniciador 3, que também é reverso na posição 213 a 234 do RNA mitocondrial 16S de sentido (Fig. 1A). Um amplicon de aproximadamente 240 pb foi obtido e a seqüência mostrou que os primeiros 234 nucleotídeos do RNA mitocondrial 16S de sentido foram unidos aos últimos 25 nucleotídeos da extremidade 3' da repetição invertida. A seqüência dos 25 nucleotídeos da repetição invertida foi completamente complementar ao RNA mitocondrial 16S de sentido das posições 51 a 75 (Fig. 1A).

Se a seqüência do amplicon obtido com os iniciadores 1 e 6 e a seqüência do amplicon obtido com os iniciadores 2 e 3 são construídas como contíguos, a estrutura emergente do RNA quimérico mitocondrial humano de sentido confirmou uma alça de 50 nucleotídeos e uma estrutura de filamento duplo de pelo menos 769 pb (Fig. 1A) (ver também SEQ ID NO 1).

Visto que o RNA de filamento duplo não é digerido pela RNase A, o ramo do RNA quimérico mitocondrial humano de sentido deve ser resistente a esta enzima. Por outro lado, a alça ou a região 3' do RNA mitocondrial 16S de sentido filamento que se estendeu além da estrutura de filamento duplo devem ser digeridas pela enzima. O RNA de HeLa ou outras células foi digerido com a RNase A (50 ug por ml), seguido pela extração de fenol e o material resistente a nuclease foi recuperado pela precipitação do etanol. O cDNA do RNA digerido depois foi amplificado por PCR usando os iniciadores mostrados na Fig. 1A. O amplicon de cerca de 800 pb obtido com os iniciadores 1 e 6 não foi amplificado depois da digestão com RNase A indicando que a alça foi digerida pela enzima. O mesmo foi verdade com o amplicon de 360 pb obtido com os iniciadores 10 e 11 como indicado na Fig. 1A. De modo geral, estes resultados indicaram que a alça assim como a região 3' do RNA quimérico mitocondrial de sentido que se estende além do ramo, foram digeridas pela enzima. Por outro lado, a amplificação do amplicon de

750 pb, correspondendo à estrutura de filamento duplo do RNA quimérico mitocondrial de sentido e obtida com os iniciadores 8 e 6, não foi afetada pela digestão com RNase A. A seqüência do fragmento de filamento duplo resistente à digestão com ribonuclease foi idêntica com a seqüência esperada do ramo. Os mesmos resultados foram obtidos depois da digestão do RNA total das células HL-60 ou outras células humanas.

Para determinar a extremidade 5' da repetição invertida do RNA quimérico mitocondrial de sentido, o ramo do transcrito obtido depois da digestão com RNase A foi usado para a análise de RACE de 5'. A determinação da extremidade 5' da repetição invertida foi realizada de acordo com as instruções do fabricante (Invitrogen). Os resultados indicaram que a repetição invertida se estende para os 46 nucleotídeos adicionais da extremidade 5' do amplicon obtido depois da amplificação do RNA quimérico mitocondrial de sentido com os iniciadores 1 e 6. Em resumo, a repetição invertida dos 815 nucleotídeos é unida à extremidade 5' dos primeiros 865 nucleotídeos do RNA mitocondrial 16S. A seqüência deste transcrito mostrou 99,8 % de identidade com o gene mitocondrial 16S humano (filamento H e L) (SEQ ID NO 1). As extremidades 5' de ambas extremidades do ramo de filamento duplo foram confirmadas por RACE de 5'.

Os resultados acima indicaram que o RNA quimérico mitocondrial de sentido conteve um ramo ou estrutura de filamento duplo de 815 pares de base e uma alça de 50 nucleotídeos. Entretanto, estes resultados não provam que a repetição invertida é unida ao RNA mitocondrial 16S de sentido completo. O uso de métodos convencionais tais como a síntese do cDNA completo da extremidade 3' é desnecessário, visto que a estrutura de filamento duplo do transcrito representa um problema insuperável para as transcriptases reversas, incluindo Tth (Myers e Gelfand, *Biochemistry* 30: 7661 a 7666, 1991). Se a repetição invertida de 815 nucleotídeos for unida

aos 1559 nucleotídeos do RNA mitocondrial 16S uma pessoa esperaria um transcrito de 2,3 Kb. A análise de Northern blot do RNA total das células HeLa, HL-60 e MCF/7 foi realizada com uma sonda rotulada com ^{32}P e alvejada à estrutura de filamento duplo do RNA quimérico mitocondrial de sentido. Os resultados revelaram uma faixa de cerca de 2,4 Kb, além de uma
5 faixa de 1,6 Kb, correspondendo ao RNA quimérico mitocondrial de sentido e ao RNA mitocondrial 16S de sentido, respectivamente. Se o RNA foi digerido com a RNase A antes do Northern blot, uma única faixa de hibridização de aproximadamente 0,8 Kb foi obtida, que corresponde ao tamanho do ramo do
10 RNA quimérico mitocondrial de sentido. De modo geral, estes resultados demonstraram fortemente que o RNA quimérico mitocondrial de sentido conteve uma repetição invertida de 815 nucleotídeos unidos à extremidade 5' do RNA mitocondrial 16S de sentido completo e que corresponde a SEQ ID NO 1.

15 É possível detectar especificamente a região de junção entre a repetição invertida e o RNA mitocondrial 16S de sentido, usando uma sonda de oligonucleotídeo. A sonda tem que incluir 7 a 10 nucleotídeos em cada lado do ponto de junção entre a extremidade 3' da repetição invertida e o início do RNA mitocondrial 16S de sentido. Este oligonucleotídeo pode ser
20 usado para a hibridização *in situ* ou a amplificação por RT-PCR ou quaisquer outros métodos familiares àqueles habilitados na técnica para detectar este novo RNA.

O RNA quimérico mitocondrial de sentido está presente em células proliferativas normais (queratinócitos de prepúcio humano, baço, linfócitos estimulados com PHA, embriões de camundongo), em células pré
25 cancerosas (queratinócitos transformados com HPV 16 ou 18, células MT-2 transformadas com HTLV-1) e em células tumorosas. Ele não está presente em células em repouso normais. Um resumo destes resultados está apresentado na Tabela 1 (no Exemplo 4).

EXEMPLO 2.

Os queratinócitos humanos transformados com o papiloma vírus sintetizam um novo RNA quimérico mitocondrial de sentido (Fig. 1B, SEQ ID NO 2).

5 Os queratinócitos de prepúcio humano (HFK) foram transformados por incubação com um lisato de células previamente infectadas com o papiloma vírus humano 16 (HPV 16). As células foram cultivadas com 3 partes de K-SFM, uma parte de meio DMEM (Invitrogen), 5 ng/ml de EGF, 50 ug/ml de extrato pituitário e 10 % de soro de bezerro fetal. As condições
10 de cultivo foram de 37°C e 5 % de CO₂. Depois de 24 horas de infecção, os HFK transformados foram transferidos a um novo frasco e cultivados sob as mesmas condições. Depois deste tempo as células (HFK698) foram transferidas sucessivamente aos novos frascos de cultura a cada 3 dias usando uma razão de divisão de 1:3 a 1:4. Depois da 19^a passagem as células
15 (HFK698 transformadas com HPV 16) foram colhidas como descrito (Hausen, Biochim. Biophys. Acta, 1288: F55 a F78, 1996), coletadas por centrifugação a 300x g durante 10 min e lavadas duas vezes com tampão de fosfato em solução salina (PBS). O RNA total foi extraído das células lavadas com Trizol (Invitrogene). Cerca de 200 nanogramas de RNA foram usados
20 para sintetizar o cDNA com hexâmeros aleatórios como descrito no Exemplo 1. O cDNA foi amplificado por PCR usando o iniciador reverso 1 e o iniciador avançado 3 como descrito na Fig. 1A. Este protocolo de amplificação produziu o amplicon esperado de 210 pb onde os primeiros 31 nucleotídeos do RNA mitocondrial 16S de sentido são unidos à repetição
25 invertida de 184 nucleotídeos como descrito antes no Exemplo 1. A análise de eletroforese dos produtos de amplificação revelou a presença do amplicon de 210 pares de bases correspondendo ao RNA quimérico mitocondrial de sentido, mais um outro fragmento de amplificação de cerca de 150 pares de bases como mostrado na Fig. 2. A seqüência completa deste fragmento novo

(SEQ ID NO 2) mostrou que os 31 nucleotídeos iniciais da extremidade 5' do RNA mitocondrial 16S de sentido são unidos a uma repetição invertida de 121 nucleotídeos, que é mais curta nos 63 nucleotídeos se comparada com a repetição invertida do RNA quimérico mitocondrial de sentido da SEQ ID NO 1. Esta repetição invertida mais curta gera uma alça mais longa de 96 nucleotídeos (Fig. 1B) na estrutura do RNA quimérico mitocondrial. O restante da sequência é idêntico à SEQ ID NO 1). Este novo RNA quimérico mitocondrial de sentido não está presente nas células SiHa (Fig. 4A), que são células tumorigênicas transformadas com HPV 16, não em células humanas proliferativas normais como linfócitos humanos estimulados com PHA (ver o Exemplo). Resultados similares foram obtidos com HFK transformado com HPV 18 ou células 18Nco. As células transformadas ou imortalizadas (mas não tumorigênicas) com HPV 16 ou HPV 18 são consideradas como células pré malignas e portanto o novo RNA quimérico mitocondrial de sentido é um marcador potencial novo para as células pré malignas.

Visto que a sequência da extremidade 3' da repetição invertida da SEQ ID NO 2 unida ao RNA mitocondrial 16S é diferente para a mesma região da SEQ ID NO 1, uma sonda de oligonucleotídeo pode ser usada para a detecção específica deste transcrito. A sonda deve incluir 7 a 10 nucleotídeos em cada lado do ponto de junção entre a extremidade 3' da repetição invertida e o início do RNA mitocondrial 16S de sentido, tal como o oligonucleotídeo da SEQ ID NO 7. Este oligonucleotídeo pode ser usado para a hibridização *in situ* ou amplificação por RT-PCR ou quaisquer outros métodos familiares àqueles habilitados na técnica para detectar este marcador novo e específico das células pré cancerosas.

EXEMPLO 3:

Células transformadas com HTLV-1 induzem a expressão de um terceiro novo RNA quimérico mitocondrial de sentido (Fig. 1C, SEQ ID NO 3).

As células MT-2 humanas transformadas com HTLV-1 foram

cultivadas como descrito (Kobayashi *et al.*, EMBO J., 3: 1339 a 1343, 1984). As células foram colhidas, centrifugadas a 300 x g durante 10 min e lavadas duas vezes com PBS. A pelota de célula final foi extraída com Trizol como descrito no Exemplo 1. O cDNA foi sintetizado com hexâmeros aleatórios usando o RNA como padrão e o cDNA foi amplificado por PCR usando o iniciador reverso 1 e o iniciador avançado 3 como descrito na Fig. 1A. Como descrito antes, este protocolo de amplificação produz um amplicon de 210 pares de base que contém os primeiros 31 nucleotídeos do RNA mitocondrial 16S de sentido unido a uma repetição invertida de 184 nucleotídeos que corresponde ao RNA quimérico mitocondrial de sentido como descrito no Exemplo 1. A análise de eletroforese dos produtos de amplificação revelou, além da presença do amplicon já debatido de 210 pares de base, uma faixa de cerca de 150 pares de base (ver Fig. 2). A seqüência do amplicon de 150 pares de base é idêntica à seqüência do amplicon descrita no Exemplo 2, correspondendo a um segundo RNA quimérico mitocondrial de sentido expressado nas células transformadas com HPV 16 ou HPV 18 (SEQ ID NO 2). Além disso, um novo produto de amplificação foi descoberto de cerca de 100 pb (Fig. 2). A seqüência deste terceiro amplicon revelou uma repetição invertida de 61 nucleotídeos unidos à extremidade 5' do RNA mitocondrial 16S de sentido e que gera uma alça de 167 nucleotídeos (Fig. 1C; SEQ ID NO 3). Este novo amplicon não estava presente nas células normais, nas células tumorosas e nas células transformadas com HPV 16 ou 18. Portanto, este novo RNA quimérico mitocondrial de sentido é um marcador potencial de células transformadas com o retrovírus oncogênico HTLV-1.

Visto que a seqüência da extremidade 3' da repetição invertida da SEQ ID NO 3 unida ao RNA mitocondrial 16S é diferente para a mesma região da SEQ ID NO 1 e SEQ ID NO 2, uma sonda de oligonucleotídeo pode ser usada para a detecção específica deste transcrito. A sonda deve se estender entre 7 a 10 nucleotídeos em cada lado do ponto de junção entre a

extremidade 3' da repetição invertida e o início do RNA mitocondrial 16S de sentido, tal como o oligonucleotídeo da SEQ ID NO 8. Este oligonucleotídeo pode ser usado para a hibridização *in situ* ou amplificação por RT-PCR ou quaisquer outros métodos familiares àqueles habilitados na técnica para
5 detectar este marcador específico de células transformadas com um vírus oncogênico retroviral.

EXEMPLO 4.

Estrutura do RNA quimérico mitocondrial humano de anti-sentido.

Nossos experimentos iniciais indicaram que uma segunda família
10 de RNAs quiméricos correspondendo ao RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido estava presente em alguns dos estudos de células. Para estabelecer a estrutura do RNA quimérico mitocondrial humano de anti-sentido, a estratégia usada para o RNA quimérico mitocondrial de sentido foi utilizada (Fig. 1). O RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido teórico conteve um fragmento do
15 RNA mitocondrial 16S de sentido como a repetição invertida unida à extremidade 5' do RNA mitocondrial 16S de anti-sentido. O último RNA é transcrito do filamento L do DNA mitocondrial e corresponde ao gene mitocondrial 16S (Fig. 3). Para amplificar este RNA, um iniciador reverso foi hibridizado junto à extremidade 5' do RNA mitocondrial 16S de anti-sentido e
20 os iniciadores dianteiros foram hibridizados em posições diferente do fragmento putativo da repetição invertida (Fig. 3). O RNA total dos linfócitos humanos estimulados com PHA durante 48 horas foi usado como padrão. O cDNA foi sintetizado com hexâmeros aleatórios como descrito no Exemplo 1. A amplificação do cDNA por PCR foi realizada com o iniciador reverso
25 posicionado próximo ao início da extremidade 5' do RNA mitocondrial 16S de anti-sentido (iniciador 1, Fig. 3) e iniciadores dianteiros diferentes posicionados na repetição invertida (Fig. 3). Apenas três amplicons principais foram obtidos que diferiram no tamanho da repetição invertida e no tamanho da alça. Estes amplicons foram purificados e sequenciados. Um deste RNA quimérico

mitocondrial de anti-sentido contém uma repetição invertida de 365 nucleotídeos e uma alça de 17 nucleotídeos (SEQ ID NO 4). Um outro RNA contém uma alça de 96 nucleotídeos e uma repetição invertida de 189 nucleotídeos (SEQ ID NO 5). Até agora, uma outra espécie do RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido contém uma repetição invertida de 296 nucleotídeos e uma alça de 451 nucleotídeos (SEQ ID NO 6). As seqüências de todos os três RNAs quiméricos mitocondriais de anti-sentido foram 99,8 por cento homólogas com a seqüência do gene do DNA mitocondrial (filamentos H e L).

Os resultados, que serão apresentados nos exemplos seguintes indicam que existe uma diferença maior entre as células pré tumorosas e tumorosas e as células proliferativas normais com respeito à expressão do RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido. Todas as células proliferativas sobrepõem o RNA quimérico mitocondrial de sentido. Entretanto, enquanto as células proliferativas normais também expressam os RNAs quiméricos mitocondriais de anti-sentido, estes transcritos são infrarregulados nas células tumorosas. As células não proliferativas ou em repouso não expressam cada um dos RNAs quiméricos mitocondriais. Portanto, a expressão diferencial deste RNA representa um marcador novo e potente da carcinogênese, que pode ser detectado pela hibridização *in situ*, análise de Northern blot, RT-PCR ou TMA ou outras técnicas conhecidas por uma pessoa habilitada no ramo.

Um resumo da expressão diferencial dos RNAs quiméricos mitocondriais de sentido e de anti-sentido é mostrado na Tabela 1.

Tabela 1.

Expressão dos RNAs quiméricos em tipos diferentes de células.

RNAs quiméricos	Em repouso normais	Proliferativas normais	Transformadas com HPV	Transformadas com HTLV-1	Cancerosas
SEQ ID NO 1	--	+++++	+++++	+++++	+++++
SEQ ID NO 2	--	--	++++	++++	--
SEQ ID NO 3	--	--	--	++++	--
SEQ ID NO 4	--	+++++	+/-	+/-	+/-
SEQ ID NO 5	--	+++++	+/-	+/-	+/-
SEQ ID NO 6	--	+++++	+/-	+/-	+/-

+ e -: nível relativo de expressão pela hibridização *in situ*

EXEMPLO 5.

Linhagens de células tumorosas sobreexpressam o RNA quimérico mitocondrial de sentido (SEQ ID NO 1) e infrarregulam a expressão do RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido (SEQ ID NOS 4, 5 e 6).

5 A hibridização *in situ* foi usada para determinar a expressão do RNA quimérico mitocondrial de sentido em linhagens de célula tumoral em cultura. Para a hibridização *in situ*, as células tumorosas aderentes foram cultivadas em lâminas de câmara de 8 reservatórios (Lab-Tek®, NUNC) durante 24 a 48 horas a 37°C, usando o meio apropriados e as condições
10 recomendadas por American Tissue Culture Collection ou ATCC. Para as células não aderentes (por exemplo, HL-60, Jurkat e Ramos), elas foram cultivadas em frasco pequeno durante 48 horas a 37°C. As células foram recuperadas por centrifugação a 300 x g durante 10 min, recolocadas em suspensão em volume pequeno de PBS e alíquotas de 10 a 20 ul foram
15 aplicadas nas lâminas de vidro previamente revestidas com polilisina ou uma proteína adesiva purificada de mexilhões (Burzio *et al*, Curr. Opin. Biotechnol., 8: 309 a 312, 1997). As células foram secas na temperatura ambiente durante 30 min.

20 As células foram lavadas três vezes com PBS e fixadas com 4 % de para-formaldeído durante 10 min na temperatura ambiente. As lâminas depois foram lavadas três vezes com PBS durante 5 min e incubadas com HCl 0,2 N durante 10 min na temperatura ambiente. As células foram lavadas novamente três vezes, primeiro com PBS e depois com 2 X de SSC durante 10 min (2 X de SSC:0,3 M de NaCl, 30 mM de citrato de sódio, pH 7,0)
25 (Sambrook *et al.*, 1989) na temperatura ambiente. A pré hibridização foi realizada durante 30 min a 37°C em uma solução contendo 4 X de SSC, 10 % de sulfato de dextrano, 150 µg/ml de tRNA de levedura e DNA de esperma de arenque, 50 % de formamida e 1 X de solução de Denhardt (0,2 mg/ml de Ficoll tipo 400, 0,2 mg/ml de polivinilpirrolidona, 0,2 mg/ml de BSA). A

hibridização foi realizada durante 15 horas a 37°C na mesma mistura de pré hibridização contendo 3,5 pmoles de sondas alvejadas aos RNAs quiméricos mitocondriais de sentido e anti-sentido. As sondas contiveram de 20 ou mais desoxinucleotídeos alvejados às regiões diferentes da seqüência do RNA quimérico mitocondrial de sentido ou anti-sentido (ver SEQ ID NO 99 a 197 e SEQ ID NO 9 a 98, respectivamente). As sondas foram previamente rotuladas na extremidade 3' com digoxigenina-11-dUTP (Roche) e transferase terminal (Promega) como descrito antes (Villegas *et al.*, DNA & Cell Biol., 19: 579 a 588, 2000). Para eliminar o excesso da sonda, as lâminas foram lavadas primeiro com 2 X de SSC durante 10 min e com 1 X de SSC durante 10 min na temperatura ambiente. Depois as amostras foram lavadas com 0,2 X de SSC durante 30 min a 45°C e finalmente, com 0,2 X de SSC durante 10 min na temperatura ambiente.

Depois da hibridização, as células foram incubadas durante 30 min em tampão de bloqueio (1 % de BSA, 0,3 % de Triton X-100 em PBS) e depois incubadas durante 2 horas na temperatura ambiente com anticorpo monoclonal anti-digoxigenina conjugado à fosfatase alcalina (Roche), previamente diluído 1:500 no tampão de bloqueio. Finalmente, as lâminas foram lavadas duas vezes com PBS e a reação de corante foi realizada com uma mistura do substrato BCIP/NBT (DAKO) como descrito antes (Villegas *et al.*, DNA & Cell Biol., 19: 579 a 588, 2000). O mesmo procedimento foi utilizado para FISH, usando anticorpos anti-digoxigenina conjugados com fluoresceína ou rodamina.

Como mostrado nas Figs. 4A e 4B, a hibridização *in situ* com uma sonda rotulada com digoxigenina correspondendo a SEQ ID NO 63 revela que as células humanas tumorosas sobreexpressam o RNA quimérico mitocondrial de sentido. A hibridização *in situ* com a sonda de sentido rotulada com digoxigenina e correspondendo a SEQ ID NO 64 foi negativa (Figs. 4A e B) indicando a infrarregulação da expressão do RNA quimérico

mitocondrial de anti-sentido. Os mesmos resultados foram obtidos com as sondas de oligonucleotídeo alvejadas a outras regiões do RNA quimérico mitocondrial de sentido ou anti-sentido.

EXEMPLO 6

- 5 **Células tumorosas em biópsias humanas sobexpressam o RNA quimérico mitocondrial de sentido (SEQ ID NO 1) e infrarregulam o RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido (SEQ ID NOS 4, 5 e 6).**

10 Biópsias humanas foram obtidas de patologistas ou de arranjos teciduais de DAKO. A maioria das amostras analisadas foram embutidas em parafina e fixadas com formalina. Outras amostras de tecido foram fixadas com fixador de Boiun e uma outra amostra foram seções de tecido congeladas a fresco. As seções de tecido de cerca de 4 a 8 µm foram fixadas em lâminas previamente revestidas com polilisina ou a proteína polifenólica adesiva purificada de mexilhão *Aulacomya ater* (Burzio *et al.*, Curr. Opin. 15 Biotechnol., 8: 309 a 312, 1997). As seções de tecido embutidas em parafina foram incubadas durante 1 hora a 60°C e a parafina foi removida por três lavagens com xilol durante 15 min cada vez. As seções foram secas ao ar e lavadas quatro vezes com PBS. Depois as seções foram incubadas com HCl 20 0,2 N durante 10 min na temperatura ambiente e depois completamente lavadas com PBS. Posteriormente, as amostras foram submetidas à hibridização *in situ* com as sondas de anti-sentido rotuladas com digoxigenina de acordo com o protocolo descrito no Exemplo 4. Uma seção paralela foi hibridizada com uma sonda de sentido correspondendo à mesma região do RNA quimérico mitocondrial de sentido.

25 Como mostrado na Fig. 5A, as células presentes nos tumores de carcinoma de mama, colo uterino, de bexiga e pulmonar revelaram um manchamento forte com as sondas de anti-sentido alvejadas ao RNA quimérico mitocondrial de sentido, indicando a presença forte do transcrito. Por outro lado a hibridização *in situ* com a sonda alvejada ao RNA quimérico

mitocondrial de anti-sentido foi negativa, indicando a infrarregulação deste transcrito (Fig. 5A). Outros tumores também sobreexpressam o RNA quimérico mitocondrial de sentido e infrarregulam a expressão do RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido (Fig. 5B).

5 **EXEMPLO 7**

Células proliferativas normais sobreexpressam os RNAs quiméricos mitocondriais de sentido e anti-sentido.

10 Usando o mesmo protocolo para a hibridização *in situ* descrito nos Exemplos 5 e 6, a expressão do quimérico mitocondrial de sentido foi determinada nas células proliferativas. Como mostrado na Fig. 6, as células HFK, espermatogônia, células do baço e células proliferativas de embrião de camundongo, apresentaram sinal forte de hibridização indicando a sobreexpressão do RNA quimérico mitocondrial de sentido. Ao contrário, as
15 células não proliferativas tais como as células do cérebro, músculo e fígado não apresentam nenhum sinal indicando que o RNA quimérico mitocondrial de sentido não é expressado ou é infrarregulado nestas células.

Entretanto, o resultado surpreendente foi que quando a hibridização *in situ* foi realizada com as sondas alvejadas ao RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido, um sinal forte também foi
20 observado (Fig. 6). Vários controles ensaiados em paralelo indicaram que o sinal de hibridização com estas sondas não foi devido a um artefato. O sinal de hibridização desapareceu se a hibridização *in situ* foi realizada com a sonda rotulada junto com um excesso (50 a 100 vezes) da mesma sonda mas não rotulada com digoxigenina. Se antes da hibridização as
25 amostras foram incubadas com ribonuclease A durante a noite, o sinal de hibridização desapareceu. Também, nenhum sinal de hibridização foi observado se a hibridização foi realizada com uma sonda rotulada alvejada ao RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido com 4 desemparelhamentos.

EXEMPLO 8**Linfócitos humanos normais estimulados com fitoemaglutinina (PHA) sobrexpressam os RNAs quiméricos mitocondriais de sentido e anti-sentido.**

5 Cinco ml de sangue de doadores saudáveis foram coletados com EDTA. O sangue foi diluído com um volume de 0,9 % de NaCl e a mistura foi aplicada em 5 ml de Histopaque-1077 (Sigma) em um tubo de centrífuga. Os tubos foram centrifugados a 800 x g durante 20 min na temperatura ambiente. As células brancas na interfase foram coletados,
10 diluídos com 2 volumes de 0,9 % de NaCl e centrifugados a 250 x g durante 10 min na temperatura ambiente. As células coletadas foram colocadas em suspensão e lavadas duas vezes com meio RPMI 1640 suplementado com 200 mM de glutamina, 10 mM de aminoácidos não essenciais, penicilina, estreptomicina isenta de soro de bezerro fetal. O sedimento final foi
15 recolocado em suspensão no mesmo meio com 10 % de soro de bezerro fetal e o número de linfócitos humanos por ml foi determinado por contagem sob o microscópio em uma câmara de Neubauer.

 Os linfócitos humanos foram cultivados em placas microtituladoras de 96 reservatórios com o meio RPMI 1640 suplementado
20 como descrito mais 10 % de soro de bezerro fetal a 37°C e com 5 % de CO₂. Cerca de 30.000 linfócitos por reservatório foram cultivados com ou sem 10 ug por ml do mitógeno PHA, que induz a proliferação celular (Yu *et al.*, J. Biol. Chem., 266: 7588 a 7595, 1991). Depois de 48 a 72 horas de tratamento com PHA, as células são ativamente embutidas na síntese de DNA como
25 demonstrado pela incorporação de H3-timidina ou BrdU (Yu *et al.*, J. Biol. Chem., 266: 7588 a 7595, 1991). Também, 48 horas depois da estimulação com PHA, os linfócitos sobrexpressaram outros marcadores de proliferação celular tais como o antígeno nuclear de célula proliferativa ou PCNA e Ki-67 (Bantis *et al.*, Cytopathology, 15: 25 a 31, 2004) (Fig. 7). Os linfócitos em

repouso ou de controle não expressaram estes antígenos (Fig. 7).

Para determinar se os linfócitos estimulados expressaram os RNAs quiméricos mitocondriais de sentido, as células foram submetidas à hibridização *in situ* com sondas de oligonucleotídeo rotuladas com digoxigenina e alvejadas ao RNA quimérico mitocondrial de sentido. O protocolo de hibridização *in situ* utilizado foi descrito no Exemplo 5. Um sinal de hibridização forte foi obtido indicando a sobreexpressão deste transcrito (Fig. 7). O sinal de hibridização foi similar em intensidade àquele observado nas células tumorosas ou outras células proliferativas normais (comparar a Fig. 7 com as Figs. 4 A e B, Figs. 5A e B). Nenhum sinal de hibridização foi observado nos linfócitos de controle incubados sem PHA (Fig. 7).

Quando a hibridização *in situ* foi realizada com as sondas de oligonucleotídeo de sentido rotuladas com digoxigenina e alvejadas ao RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido, um sinal de hibridização igualmente forte foi obtido (Fig. 7). Vários controles foram realizados para descartar a possibilidade de que o sinal de hibridização foi devido aos artefatos. O sinal de hibridização desaparece se a hibridização *in situ* é realizada com a sonda de sentido rotulada junto com o excesso (50 a 100 vezes) da mesma sonda de sentido mas não rotulada com digoxigenina. Se antes da hibridização as amostras são incubadas com ribonuclease A durante a noite, o sinal de hibridização desaparece. Também, nenhum sinal de hibridização é observado se a hibridização é realizada com as sondas de sentido com 4 desemparelhamentos. Ao contrário, a hibridização *in situ* do linfócito não estimulado não apresentou nenhum sinal de hibridização (Fig. 7). Em conclusão, os linfócitos humanos normais estimulados para proliferar sobreexpressam tanto, o RNA quimérico mitocondrial de sentido quanto o RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido. Estes transcritos não são expressados nas células em repouso.

EXEMPLO 9.**O RNA quimérico mitocondrial de sentido exibi localizações diferentes nas células normais e tumorosas.**

As hibridizações *in situ* relatadas nos Exemplos 5 e 6, indicaram que em várias linhagens de célula tumoral assim como em células tumorosas de biópsias humanas, o RNA quimérico mitocondrial de sentido é localizado preferencialmente no citoplasma. Entretanto, em algumas biópsias de tumor uma localização clara dos transcritos no núcleo também foi encontrada (FIGs. 4 A, B).

10 Uma descoberta surpreendente foi a localização do RNA quimérico mitocondrial de sentido no núcleo. A hibridização *in situ* realizada como relatado no Exemplo 5, revelou o sinal de hibridização positivo no núcleo das células HeLa e SiHa (FIG. 8). O sinal de hibridização foi mais forte no núcleo de HFK transformada com HPV 16 (FIG. 8). A localização nucleolar também foi encontrada nas células tumorosas de tumores de mama e rabdomiossarcoma (FIG. 8).

Os estudos de co-localização indicaram que o RNA quimérico mitocondrial de sentido localizado no citoplasma está fora das mitocôndrias e associado aos últimos endossomas/lisossomas. Se os estudos de co-localização são realizados com marcadores de mitocôndrias tais como Mitotrack (Molecular Probes) ou anticorpos anti-citocromo c (Promega) ou anti-Endonuclease G (Chemicon), a hibridização *in situ* apresentou uma co-localização desfavorável. Entretanto, uma co-localização perfeita foi encontrada entre o sinal de hibridização com a imunocitoquímica dos últimos marcadores de endossomas/lisossomas tais como Lysotrack (Molecular Probes) ou anticorpos anti-Lamp-2 (BD Pharmigen) ou anti-catepsina D (Zymed).

As células HeLa foram submetidas à hibridização *in situ* com sondas de oligonucleotídeo rotuladas com digoxigenina como descrito no

Exemplo 5. Depois da pós hibridização e dos procedimentos de lavagem, as células foram incubadas com um anticorpo anti-digoxigenina rotulado com rodamina (Roche) e um anticorpo anti-Lamp-2 rotulado com fluoresceína (BD Pharmingen). Depois da incubação na temperatura ambiente durante 3 horas no escuro, as lâminas foram lavadas, montadas e analisadas com um microscópio confocal Zeiss. Uma co-localização clara do sinal de hibridização com a localização de Lamp-2 foi obtida. Os resultados de co-localização similares do sinal de hibridização foram obtidos quando Lysotrack ou anticorpos anti-catepsina D foram usados como marcadores da fração lisossômica. Tanto quanto nós conhecemos, este é o primeiro relato que mostra que um RNA (especialmente um transcrito mitocondrial) é associado aos lisossomos da célula. A determinação da localização do RNA quimérico mitocondrial de sentido nas células tumorosas pode ter um valor de prognóstico importante para os pacientes com câncer. No geral, nas células proliferativas normais, os RNAs quiméricos mitocondriais de sentido e anti-sentido estão localizados principalmente no núcleo.

EXEMPLO 10.

Tratamento de células tumorosas *in vitro* com oligonucleotídeos de anti-sentido alvejados ao RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido induz a morte celular.

As células HL-60 foram cultivadas sob as condições ótimas recomendadas por ATCC. Cerca de 30.000 células foram cultivadas em placas microtituladoras de 96 reservatórios. Os oligonucleotídeos (2 uM) alvejados ao RNA quimérico mitocondrial de sentido ou anti-sentido foram adicionados. Para realçar a permeabilidade das células, os oligonucleotídeos foram adicionados na mistura com lipofectamina ou oligofectamina (Invitrogen) ou com polietilenimida (PEI) (Exgen TM500, Fermentas). A PEI foi preferida porque é praticamente não tóxica às células. As células foram incubadas com os oligonucleotídeos durante 6 horas e a porcentagem de

sobrevivência celular foi determinada pela permeabilidade ao azul de tripano. Depois de 6 horas de incubação com os oligonucleotídeos uma porcentagem importante das células morreram. Entretanto, os oligonucleotídeos alvejados ao RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido foram mais eficazes em induzir a morte celular (cerca de 90 % *versus* 15 % de morte celular). Por outro lado, nenhuma apoptose foi induzida quando as células foram tratadas com oligonucleotídeos alvejados ao RNA mitocondrial 12S de sentido ou anti-sentido ou o mRNA da subunidade ND1 ou com oligonucleotídeos misturados ou oligonucleotídeos com quatro desemparelhamentos, todos dos quais foram usados como controles. Os oligonucleotídeos usados nestes estudos contêm ligação de fosforotioato nos primeiros 5 nucleotídeos na extremidade 5' e os últimos cinco nucleotídeos na extremidade 3'. Na média, os 10 nucleotídeos centrais contêm ligações de fosfodiéster.

Para estabelecer se o tratamento das células com estes oligonucleotídeos induz a fragmentação do DNA, as células HL-60 foram incubadas sob as mesmas condições descritas antes com os oligonucleotídeos durante 6 horas. Cerca de 30.000 células HL-60 foram cultivadas em 200 μ l de IDMEM mais 10 % de soro de bezerro fetal na placa microtituladora de 96 reservatórios junto com 1 μ M de oligonucleotídeos alvejados ao RNA quimérico mitocondrial de sentido ou alvejados ao RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido. A química dos oligonucleotídeos adicionados na mistura com PEI foi a mesma descrita na seção prévia. Depois de um incubação de 6 horas com os oligonucleotídeos as células foram ensaiadas quanto a fragmentação do DNA usando o ensaio de TUNEL (DeadEnd Colorimetric TUNEL System, Promega). Como mostrado na Tabela 2, cerca de 96 % das células apresentaram fragmentação do DNA depois do tratamento com o oligonucleotídeo alvejado ao RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido. A taxa similar de fragmentação do DNA foi obtida com o medicamento estaurosporina. Os oligonucleotídeos misturados ou os

oligonucleotídeos com desemparelhamentos não apresentaram nenhum efeito. Ao contrário, apenas cerca de 20 % das células morreram quando tratadas com o oligonucleotídeo alvejado ao RNA quimérico mitocondrial de sentido (Tabela 2). Como mostrado previamente, as células tumorosas infrarregulam a expressão do RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido e conseqüentemente estas células carregam um número baixo de cópias deste transcrito. Portanto, a morte celular é mais eficazmente induzida com os oligonucleotídeos alvejados ao RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido. Estes resultados fortemente sugerem que o número baixo de cópias do RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido nas células tumorosas constitui um alvo para a terapia.

Tabela 2.

Oligonucleotídeos complementares ao RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido induzem apoptose nas células HL-60.

Tratamento	Porcentagem de células apoptóticas Ensaio por TUNEL
Controle	3,0 %
Oligonucleotídeos complementares ao RNA quimérico de anti-sentido	96,7 %
Oligonucleotídeos desemparelhamentos	4,0 %
Oligonucleotídeos misturados	3,5 %
Oligonucleotídeos complementares ao RNA quimérico de sentido	26,7 %
Estaurosporina	98,4 %
Oligonucleotídeos complementares ao RNA mitocondrial 12 S de sentido	3,7 %
Oligonucleotídeos complementares ao RNA mitocondrial 12 S de anti-sentido	4,1 %

Em um outro estudo, nós determinamos se o tratamento das células com oligonucleotídeos alvejados ao RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido induziu a ativação das caspases. As caspases são enzimas proteolíticas, ativamente envolvidas na morte celular programada ou apoptose. As HL-60 foram incubadas com os oligonucleotídeos alvejados ao RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido ou com estaurosporina durante 6 horas sob as condições de cultivo descritas antes. Depois, VAD-fmk

(Caspase FITC-VAD-FMK, Promega) conjugado com fluoresceína foi adicionado à cultura e incubado durante 30 min a 37°C. O VAD-fmk é o inibidor forte das caspases e se liga às proteases com afinidade muito alta (Gracia-Calvo *et al.*, J. Biol. Chem., 273: 32608 a 32613, 1998). As células foram lavadas por centrifugação, montadas e observadas com um microscópio de fluorescência. Como mostrado na Fig. 9, as células HL-60 tratadas com o oligonucleotídeo alvejado ao RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido induziram a ativação das caspases, em nível similar à ativação obtida com a estaurosporina. Nenhuma ativação das caspases foi obtida com os oligonucleotídeos de anti-sentido alvejados ao RNA mitocondrial 12S usado como controle.

As células tratadas com os oligonucleotídeos alvejados ao RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido também exibem outras mudanças que são congruentes com a apoptose. A análise de microscopia de elétron mostrou a fragmentação nuclear e a condensação de cromatina. A fragmentação nuclear também foi demonstrada pelo manchamento dos núcleos com DAPI. Depois do tratamento com estes oligonucleotídeos alvejados ao RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido, as células sofrem fragmentação nuclear como revelado pelo manchamento com DAPI (Figs. 9E e 9F).

EXEMPLO 11.

Outras células tumorosas também sofrem morte celular quando tratadas com oligonucleotídeos complementares ao RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido.

Outras células tumorosas foram tratadas com os oligonucleotídeos complementares ao RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido de acordo com o protocolo descrito no Exemplo 10. As células foram incubadas em sua condição ótima de acordo com a recomendação de ATCC e 2 uM de oligonucleotídeo foram adicionados no período inicial do

experimento junto com PEI. Seis horas mais tarde uma segunda adição do oligonucleotídeo foi realizada na mesma concentração e o efeito foi determinado 15 horas depois da iniciação do experimento. A morte celular foi determinada pelo manchamento com DAPI e contagem do número de células com os núcleos fragmentados. Como mostrado na Tabela 3, mais de 70 % das células tratadas com oligonucleotídeos sofrem apoptose. É importante mencionar, que as células de melanoma, células de linfoma e as células de carcinoma de mama MCF/7, conhecidas serem completamente resistentes ao tratamento com medicamento, sofrem apoptose em uma taxa muito alta (Tabela 3)

Tabela 3.

Indução de apoptose em linhagens de célula tumoral pelo tratamento com oligonucleotídeos complementares ao RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido.

Células	Porcentagem de células apoptóticas* (manchamento com DAPI)
MCF/7	89 % ± 9
Melanoma 4295	86 % ± 7
Hep G2	93 % ± 3
Hela	91 % ± 5
DU 154	89 % ± 6
Células de linfoma Devernelle	87 % ± 5
Caco-2	64 % ± 7

* O tratamento foi durante 15 horas e 2 uM de oligonucleotídeos. A apoptose em células tratadas com oligonucleotídeos misturados ou desemparelhados ou sem oligonucleotídeos varia entre 3 a 10 %.

Para determinar se existem regiões no transcrito que são alvos mais eficientes para os oligonucleotídeos em induzir a apoptose os experimentos seguintes foram realizados. A indução da apoptose foi estudada em células Hela, HL-60 e MCF/7 com os oligonucleotídeos de anti-sentido de cerca de 20 nucleotídeos, alvejados a cerca de cada 30 nucleotídeos partindo da extremidade 5' do RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido. No tempo zero 1 uM de oligonucleotídeo foi adicionado junto com PEI e este tratamento foi repetido 6 horas mais tarde. Quinze horas depois do início do tratamento, a

porcentagem da célula que sofre apoptose foi determinada pelo manchar com DAPI e pela contagem das células com núcleos fragmentados. Embora a maioria dos oligonucleotídeos induziu um grau variável de apoptose, a região de filamento único do RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido foi um
5 alvo melhor para induzir a morte celular. Os oligonucleotídeos alvejados à estrutura de alça ou de filamento duplo putativa dos RNAs quiméricos mitocondriais de anti-sentido foram menos eficazes.

A apoptose também pode ser determinada pelo manchar com azul de tripano, manchar com iodeto de propídio, imunológica de anexina. Nestas técnicas, as células podem ser analisadas pela microscopia
10 fluorescente ou pela citometria de fluxo. A fragmentação do DNA pode ser medida por TUNEL ou por eletroforese para revelar a escada do DNA. A análise de Western blot também pode ser usada para determinar o processamento das proteínas tais como caspases, poli(ADP-Rib)sintase, etc.

15 **EXEMPLO 12.**

Tratamento de células proliferativas normais ou em repouso com oligonucleotídeos complementares ao RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido é refratário à apoptose.

Como descrito antes, as células proliferativas normais
20 sobexpressam o RNA quimérico mitocondrial de sentido assim como o RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido. As células em repouso, por outro lado, não expressam nenhum destes transcritos. Portanto, foi importante determinar se oligonucleotídeos complementares ao RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido induzem a morte celular em células normais.

Os linfócitos humanos foram estimulados com 10 ug por ml de
25 PHA durante 48 horas como descrito no Exemplo 8. Em paralelo, os linfócitos de controle também foram incubados durante 48 horas mas sem PHA. Em 48 horas de cultura, 15 uM de oligonucleotídeo misturados com PEI (ver o Exemplo 10) foram adicionados aos linfócitos estimulados e de

controle e ainda incubados durante 15 horas. A concentração do oligonucleotídeo foi 10 vezes mais alta do que a concentração usada nos experimentos prévios (1 a 2 uM). Outras amostras de linfócitos estimulados ou de controle foram tratadas com 0,4 uM de estaurosporina durante o mesmo período de tempo. No final do experimento, a morte celular foi medida pelo manchamento com azul de tripano ou manchamento com DAPI. Como mostrado na Fig. 10, os linfócitos de controle ou linfócitos estimulados com PHA incubados durante 15 horas sem oligonucleotídeo mostraram um nível similar de apoptose espontânea que variou entre 7 a 10 % nos experimentos diferentes. Um resultado similar foi obtido com uma concentração mais baixa (1 a 2 uM) de oligonucleotídeo. Também, os linfócitos de controle e estimulados incubados com 15 uM de oligonucleotídeo de anti-sentido durante 15 horas mostrou nível baixo similar de apoptose (em torno de 10 %) (Fig. 10). Ao contrário, os linfócitos de controle ou os linfócitos estimulados com PHA e incubados com estaurosporina também durante 15 horas mostrou que mais de 80 % das células sofrem apoptose (Fig. 10). Isto é um resultado muito importante porque mostra que as células em repouso normais ou as células proliferativas normais tais como os linfócitos humanos são refratárias à indução de apoptose pelos oligonucleotídeos complementares ao RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido. Em outras palavras, a indução de apoptose nas células tumorosas interferindo-se com o RNA quimérico mitocondrial de anti-sentido é um método terapêutico seletivo para o câncer.

REFERÊNCIAS:

1. Adrain *et al.*, "Regulation of apoptotic protease activating factor-1 oligomerization and apoptosis by the WD-40 repeat region", J Biol Chem. 274: 20855 a 20860, 1999.
2. Bantis *et al.*, "Expression of p129, Ki-67 and PCNA as proliferation markers in imprint smears of prostate carcinoma and their prognostic value", Cytopathology, 15: 25 a 31, 2004.

3. Beaucage, "Oligodeoxyribonucleotides synthesis. Phosphoramidite approach", *Methods Mol. Biol.* 20: 33 a 61, 1993.
4. Benedict *et al.*, "Expression and functional analysis of Apaf-1 isoforms. Extra Wd-40 repeat is required for cytochrome c binding and regulated activation of procaspase-9", *J Biol Chem.* 275: 8461 a 8468, 2000.
5. Benoist e Chambon, "In vivo requirement of the SV40 early promoter region", *Nature* 290: 304 a 310, 1981.
6. Boya *et al.*, "Mitochondrion-targeted apoptosis regulators of viral origin", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 304: 575 a 581, 2003.
10. 7. Brinster *et al.*, "Regulation of metallothionein-thymidine kinase fusion plasmids injected into mouse eggs", *Nature* 296: 39 a 42, 1982.
8. Burzio *et al.*, "Environmental bioadhesion: themes and applications", *Curr. Opin. Biotechnol.*, 8: 309 a 312, 1997.
15. 9. Capaldi *et al.*, "Highly efficient solid phase synthesis of oligonucleotide analogs containing phosphorodithioate linkages", *Nucleic Acids Res.* 28: E40, 2000.
10. Carew e Huang, "Mitochondrial defects in cancer", *Mol. Cancer*, 1: 1 a 12, 2002.
20. 11. Celis, "Cell Biology, A Laboratory Handbook", Julio E. Celis, ed., 1994
12. Chinnery e Turnbull, "Mitochondrial DNA mutations in the pathogenesis of human disease", *Mol. Med. Today*, 6: 425 a 432, 2000.
13. Clayton e Vinograd, "Circular dimer and catenate forms of mitochondrial DNA in human leukemia leucocytes", *Nature*, 216: 652 a 657, 1967.
25. 14. Clayton e Vinograd, "Complex mitochondrial DNA in leukemic and normal human myeloid cells", *Proc.Natl. Acad. Sci. US*, 62: 1077 a 1084, 1969.

15. Clayton, "Transcription and replication of mitochondrial DNA", *Hum Reprod. Suppl* 2: 11 a 17, 2000.
16. Comanor *et al.*, "Successful HCV genotyping of previously failed and low viral load specimens using an HCV RNA qualitative assay based on transcription-mediated amplification in conjunction with the line probe assay.", *J. Clin Virol.*, 28: 14 a 26, 2003.
17. Egholm *et al.*, "PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules", *Nature*, 365: 566 a 568, 1993.
- 10 18. Elbashir *et al.*, "Duplexes of 21-nucleotides RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells", *Nature* 411: 494 a 498, 2001.
19. Falkenberg *et al.*, "Mitochondrial transcription factors B1 and B2 activate transcription of human mtDNA", *Nat Genet.* 31: 289 a 294, 2002.
- 15 20. Ferri e Kroemer, "Organelle-specific initiation of cell death pathways", *Nature Cell Biol.* 3: E255 a E263, 2001.
21. Frederick *et al.*, em "Current Protocols In Molecular Biology", Volume 2, Unit 14, Frederick M. Ausubul *et al.* eds., 1995.
- 20 22. Gracia-Calvo *et al.*, "Inhibition of human caspases by peptide-based and macromolecular inhibitors", *J. Biol. Chem.*, 273: 32608 a 32613, 1998.
23. Guicciardi *et al.*, "Lysosomes in cell death", *Oncogene*, 23: 2881 a 2890, 2004.
24. Haseloff *et al.*, "Sequence required for self-catalysed cleavage of the satellite RNA of tobacco ringspot virus", *Gene*, 82: 43 a 52, 1989.
- 25 25. Hausen, "Papillomavirus infection- a major cause of human cancer," *Biochim. Biophys. Acta*, 1288: F55 a F78, 1996.
26. Hedge *et al.*, "Commitment to apoptosis induced by

tumour necrosis factor alpha is dependent on caspase activity”, *Apoptosis*, 7: 123 a 132, 2002.

27. Hyrup e Nielsen, “Peptide nucleic acids (PNA): synthesis, properties and potential applications”, *Bioorg. Med. Chem.*, 4: 5 a 23, 1996.

5 28. Johnstone *et al.*, “Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy”, *Cell* 108: 153 a 164, 2002.

29. Kobayashi *et al.*, “Genomic structure of HTLV: detection of defective genome and its amplification in MT2 cells”, *EMBO J.*, 3: 1339 a 1343, 1984

10 30. Komarov *et al.*, “A chemical inhibitor of p53 that protect mice from the side effects of cancer therapy”, *Science* 285: 1733 a 1737, 1999.

31. Krammer, “CD95’s deadly mission in immune system”, *Nature* 407: 789 a 795, 2000.

15 32. Li *et al.*, “Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria”, *Nature*, 412: 95 a 99, 2001.

33. Liu *et al.*, “Synthetic peptides and non-peptidic molecules as probes of structure and function of Bcl-2 family proteins and modulators of apoptosis”, *Apoptosis*, 6: 453 a 462, 2001.

20 34. Lu *et al.*, “siRNA-mediateted antitumorogenesis for drug target validation and therapeutics”, *Curr. Opin. Mol. Ther.* 5: 225 a 234, 2003.

35. Mag *et al.*, “Synthesis and selective cleavage of an oligodeoxynucleotide containing a bridged internucleotide 5’-phosphorothioate linkage”,

25 36. Martins *et al.*, “The serine protease Omi/HtrA2 regulates apoptosis by binding XIAP through a reaper-like motif”, *J. Biol. Chem.* 277: 439 a 444, 2002.

37. McCulloch *et al.*, “A human mitochondrial transcription factor is related to RNA adenine methyltransferases and binds S-

adenosylmethionine”, *Mol. Cell Biol.* 22: 1116 a 1125, 2002.

38. McKay *et al.*, “Characterization of a potent and specific class of antisense oligonucleotide inhibitor of human protein kinaseC- α expression”, *J. Biol. Chem.*, 274: 1715 a 1722, 1999.

5 39. McKinnell *et al.*, “The Biological Basis of Cancer, (R:G: McKinnell, R:E: Parchment, A:O : Perantoni, G:B: Pierce, eds.), Ch. 3, Cambridge University Press, UK, 1998

40. McManus *et al.*, “Gene silencing in mammals by small interfering RNAs”, *Nature Rev. Genet.* 3: 737 a 747, 2002.

10 41. Meier *et al.*, “Apoptosis in development”, *Nature* 407: 796 a 801, 2000.

42. Myers *et al.*, “Reverse transcription and DNA amplification by a *Thermus thermophilus* DNA polymerase”, *Biochemistry*, 30: 7661 a 7666, 1991.

15 43. Nielsen *et al.*, “Peptide nucleic acids (PNA): oligonucleotide analogs with a polyamide backbone”, em S. Crooke, B. Lebleu (eds.) *Antisense Research and Applications*, Capítulo 9, CRC Press, Boca Raton, Florida, páginas 363 a 373, 1993.

20 44. Parisi e Clayton, “Similarity of human mitochondrial transcription factor 1 to high mobility group proteins”, *Science.* 252: 965 a 969, 1991.

45. Parrella *et al.*, “Detection of mitochondrial DNA mutations in primary breast cancer and fine-needle aspirates”, *Cancer Res.*, 61: 7623 a 7626, 2001.

25 46. Rampino *et al.*, “Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype”, *Science*, 275: 967 a 969, 1997.

47. Rantanen *et al.*, “Characterization of the mouse genes for mitochondrial transcription factors B1 and B2”, *Mamm Genome.* 14: 1 a 6,

2003.

48. Ravagnan *et al.*, "Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor", *Nat Cell Biol.* 3: 839 a 843, 2001.

49. Reed, "Dysregulation of apoptosis in cancer", *J. Clin. Oncol.*, 17: 2941 a 2953, 1999.

50. Rossi, "Practical ribozymes. Making ribozymes work in cells", *Curr Biol.* 4: 469 a 471, 1994.

51. Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, (Sambrook, J., Fritsch, E. T. e Maniatis, T. Eds.,) 2^a Ed, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY. 1989.

52. Samejima *et al.*, "CAD/DFP40 nuclease is dispensable for high molecular weight DNA cleavage and stage I chromatin condensation in apoptosis", *J Biol Chem.* 276: 45427 a 45432, 2001.

53. Shuey e Attardi, "Characterization of an RNA polymerase activity from HeLa cell mitochondria, which initiates transcription at the heavy strand rRNA promoter and the light strand promoter in human mitochondrial DNA", *J Biol Chem.* 260: 1952 a 1958, 1985.

54. Stephens e Rivers, "Antisense oligonucleotide therapy in cancer", *Curr. Opin. Mol. Therapeut.*, 5: 118 a 122, 2003

55. Summerton, "Morpholino antisense oligomers: a case for an Rnase H independent structural type", *Biochim. Biophys. Acta*, 1489: 141 a 158, 1999.

56. Suzuki *et al.*, "A serine protease, Htra2, is released from the mitochondria and interacts with xiap, inducing cell death", *Mol. Cell*, 8: 613 a 621, 2001.

57. Taanman, "The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication", *Biochim. Biophys. Acta*, 1410 : 103 a 123, 1999.

58. Tan *et al.*, "Comprehensive scanning of somatic

mitochondrial DNA mutations in breast cancer”, *Cancer Res.*, 62: 972 a 1076, 2002.

59. Teitz *et al.*, “Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN”, *Nature Med.* 6: 529 a 535, 2000.

60. Tidd *et al.*, “Oligodeoxynucleotide 5mers containing a 5'-CpG induce apoptosis through a mitochondrial mechanism in T lymphocytic leukemia cells”, *Nucleic Acids Res.*, 28: 2242 a 2250 (2000).

10 61. Tiranti *et al.*, “Identification of the gene encoding the human mitochondrial RNA polymerase (h-mtRPOL) by cyberscreening of the Expressed Sequence Tags database”, *Hum Mol Genet.* 6: 615 a 625, 1997.

62. Verhagen *et al.*, “Cell death regulation by the mammalian IAP antagonist Diablo/Smac”, *Apoptosis*, 7: 163 a 166, 2002.

15 63. Vickers *et al.*, “Efficient reduction of target RNAs by small interfering RNA and Rnase H-dependent antisense agents”, *J. Biol. Chem.*, 278: 7108 a 7118, 2003.

64. Villegas *et al.*, “A novel chimeric mitochondrial RNA localized in the nucleus of mouse sperm”, *DNA & Cell Biol.* 19: 579 a 588, 2000.

20 65. Villegas *et al.*, “A putative RNA editing from U to C in a mouse mitochondrial transcript”, *Nucleic Acids Res.* 30: 1895 a 1901, 2002.

66. Vogelstein *et al.*, “Surfing the p53 network”, *Nature* 408: 307 a 310, 2000.

25 67. Wacheck *et al.*, “Small interfering RNA targeting Bcl-2 sensitizes malignant melanoma,” *Oligonucleotides* 13: 393 a 400, 2003.

68. Wagner *et al.*, “Nucleotide sequence of the thymidine kinase gene of herpes simplex virus type 1”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78: 1441 a 1445, 1981.

69. Wahlestedt *et al.*, “Potent and nontoxic antisense

oligonucleotides containing locked nucleic acids”, Proc. Natl. Acad. Sci. US, 97: 5633 a 5638, 2000.

70. Warburg, “On the origin of cancer cells”, Science, 123: 309 a 314, 1956.

5 71. Wu *et al.*, “Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots,” Nature Biotechnol. 21: 41 a 46, 2003.

72. Yamamoto *et al.*, “Identification of a functional promoter in the long terminal repeat of Rous sarcoma virus”, Cell 22: 787 a 797, 1980

10 73. Yu *et al.*, “Vitamin D receptor expression in human lymphocytes. Signal requirements and characterization by western blots and DNA sequencing”, J. Biol. Chem., 266: 7588 a 7595, 1991.

15 74. Zaug *et al.*, “A labile phosphodiester bond at the ligationjunctionin a circular intervening sequence RNA”, Science, 224: 574 a 578, 1984.

75. Zrnig *et al.*, “Apoptosis regulators and their role in tumorogenesis”, Biochim. Biophys. Acta, 1551: F1 a F37, 2001.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que a composição compreende um ou mais oligonucleotídeos de 10-50 nucleobases de comprimento que são complementares a:

(i) uma molécula de RNA 16S ribossomal mitocondrial anti-sentido ligada covalentemente na sua extremidade 5' à extremidade 3' de um polinucleotídeo com uma sequência de repetição invertida, em que o referido RNA anti-sentido quimérico compreende uma sequência de nucleotídeos selecionada de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 e SEQ ID NO: 6, ou

(ii) uma molécula de RNA 16S ribossomal mitocondrial sentido ligada covalentemente na sua extremidade 5' à extremidade 3' de um polinucleotídeo com uma sequência de repetição invertida, em que o referido RNA quimérico sentido compreende uma sequência de nucleotídeos selecionada de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 e SEQ ID NO: 3,

Tal que os oligonucleotídeos são capazes de hibridizar com o RNA quimérico sentido ou anti-sentido para formar um dúplex estável, em que, adicionalmente, um ou mais dos oligonucleotídeos compreendem uma ou mais ligações internucleosídicas alternativas.

2. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o referido um ou mais oligonucleotídeos são selecionados do grupo que consiste das SEQ ID NOs: 9-196.

3. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a molécula quimérica mitocondrial humana compreende uma sequência nucleotídica selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 4, 5 e 6.

4. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a molécula quimérica mitocondrial humana compreende uma sequência nucleotídica selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 1, 2 e 3.

5. Composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a ligação internucleosídica alternativa é uma ligação internucleosídica de fosforotioato.

6. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 5, caracterizada pelo fato de que o referido um ou mais oligonucleotídeos compreende ainda um ou mais oligonucleotídeos de extremidade 5' modificados com 2-o-(2-metoxi) etila e um ou mais oligonucleotídeos de extremidade 3' modificados com 2-o- (2-metoxi) etila.

7. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o referido um ou mais oligonucleotídeos compreende um ou mais oligonucleotídeos bloqueados.

8. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o referido um ou mais oligonucleotídeos compreende um ou mais ácidos nucleicos peptídicos.

9. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizada pelo fato de que a composição é formulada para administração tópica, oral, parenteral ou retal.

10. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizada pelo fato de ser para uso no tratamento de câncer ou pré-câncer.

11. Uso de um ou mais oligonucleotídeos de 10 a 50 nucleobases de comprimento que são suficientemente complementares a:

(i) uma molécula de RNA 16S ribossomal mitocondrial anti-sentido ligada covalentemente na sua extremidade 5' à extremidade 3' de um polinucleotídeo com uma sequência de repetição invertida, em que o referido RNA anti-sentido quimérico compreende uma sequência de nucleotídeos selecionada de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 e SEQ ID NO: 6, ou

(ii) uma molécula de RNA 16S ribossomal mitocondrial sentido ligada covalentemente na sua extremidade 5' à extremidade 3' de um

polinucleotídeo com uma sequência de repetição invertida, em que o referido RNA quimérico sentido compreende uma sequência de nucleotídeos selecionada de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 e SEQ ID NO: 3,

Tal que os oligonucleotídeos são capazes de hibridizar com o RNA quimérico sentido ou anti-sentido para formar um dúplex estável, caracterizado pelo fato de ser para o preparo de um medicamento para o tratamento de um pré-câncer ou câncer.

12. Uso de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o referido RNA quimérico sentido compreende uma sequência nucleotídicas de SEQ ID NO: 1.

13. Uso de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o referido RNA quimérico sentido compreende uma sequência nucleotídicas de SEQ ID NO: 2.

14. Uso de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o referido RNA quimérico sentido compreende uma sequência nucleotídicas de SEQ ID NO: 3.

15. Uso de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o referido RNA quimérico sentido compreende uma sequência nucleotídicas de SEQ ID NO: 4.

16. Uso de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o referido RNA quimérico sentido compreende uma sequência nucleotídicas de SEQ ID NO: 5.

17. Uso de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o referido RNA quimérico sentido compreende uma sequência nucleotídicas de SEQ ID NO: 6.

18. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 14, caracterizado pelo fato de que os oligonucleotídeos são selecionados das SEQ ID NOs: 98-196.

19. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a

14, caracterizado pelo fato de que os oligonucleotídeos são oligonucleotídeos de 15 a 50 nucleobases de comprimento em que pelo menos 15 nucleobases são complementares a SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 e/ou SEQ ID NO: 3.

20. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 ou 15 a 17, caracterizado pelo fato de que os oligonucleotídeos são oligonucleotídeos selecionados das SEQ ID NOs: 9-97.

21. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 ou 15 a 17, caracterizado pelo fato de que os oligonucleotídeos são oligonucleotídeos de 15 a 50 nucleobases de comprimento em que pelo menos 15 nucleobases são complementares a SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 e/ou SEQ ID NO: 6.

22. Uso de acordo com a reivindicação 19 ou 21, caracterizado pelo fato de que os oligonucleotídeos possuem 18 a 50 nucleobases de comprimento.

23. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 22, caracterizado pelo fato de que o referido medicamento é capaz de induzir pelo menos um de: morte de célula pré-câncer e morte de célula de câncer em células ou tecidos.

24. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 23, caracterizado pelo fato de que o referido medicamento é adaptado para administração em conjunto com um medicamento quimioterapêutico para o tratamento de câncer.

25. Método de detecção para distinguir entre células normais e pré-cancerosas ou cancerosas, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

determinar o nível de pelo menos um dos RNAs quiméricos mitocondriais de anti-sentido humano de SEQ ID NO: 4-6, e

determinar o nível do RNA quimérico mitocondrial de sentido humano de SEQ ID NO: 1.

26. Método de detecção de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que cada referida etapa de determinação compreende identificar e quantificar pelo menos um dos RNAs quiméricos mitocondriais de sentido e de anti-sentido através de pelo menos um dos seguintes procedimentos: hibridização *in situ*, hibridização *in situ* fluorescente, dot blot, Northern blot, amplificação de cDNA por PCR, TMA ou ensaios de proteção de ribonuclease.

27. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 25 e 26, caracterizado pelo fato de que as referidas etapas de determinação são realizadas em amostras humanas.

28. Método de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que as referidas amostras humanas compreendem uma amostra selecionada de: seções de tecido de biópsias humanas fixas ou congeladas, esfregaços citológicos ou suspensões de células em saliva, urina, sangue, medula óssea, colonócitos, lavagem pulmonar, e células metastáticas circulantes do sangue ou linfa.

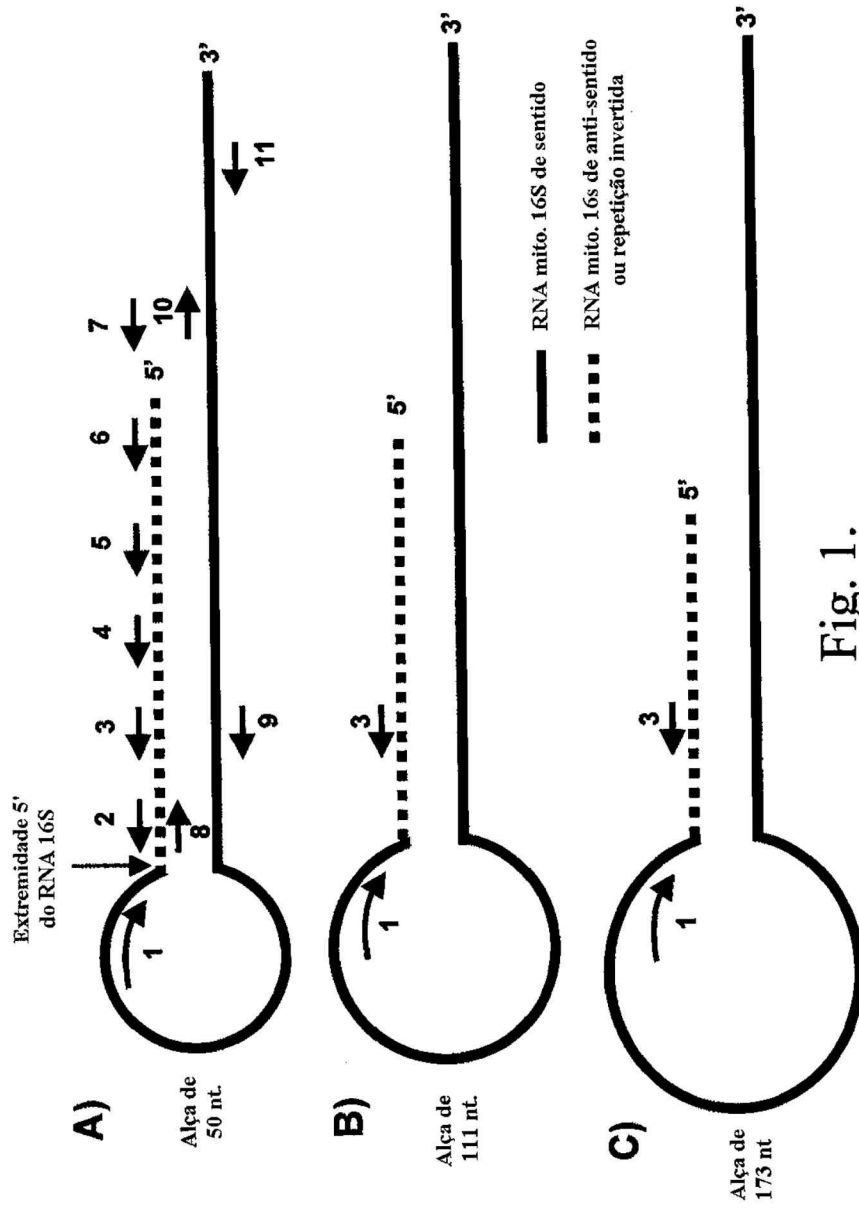


Fig. 1.



Fig. 2

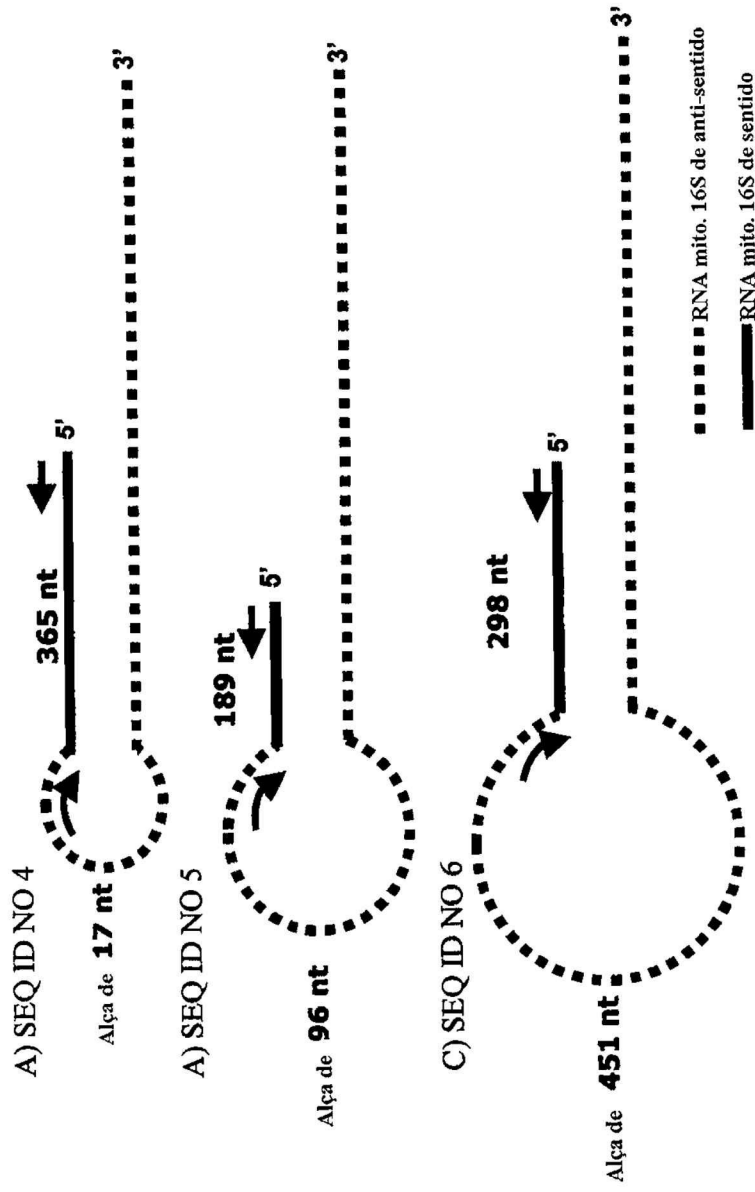


Fig. 3

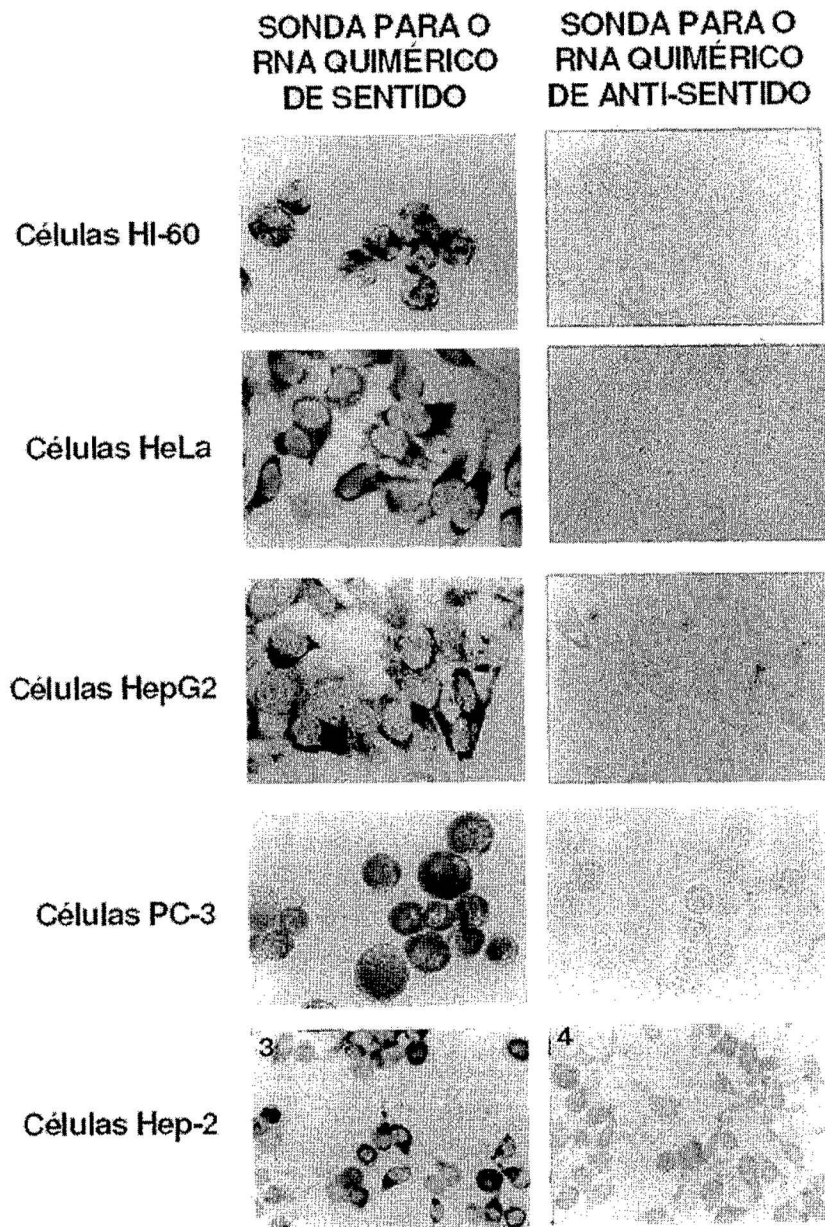


Fig. 4A

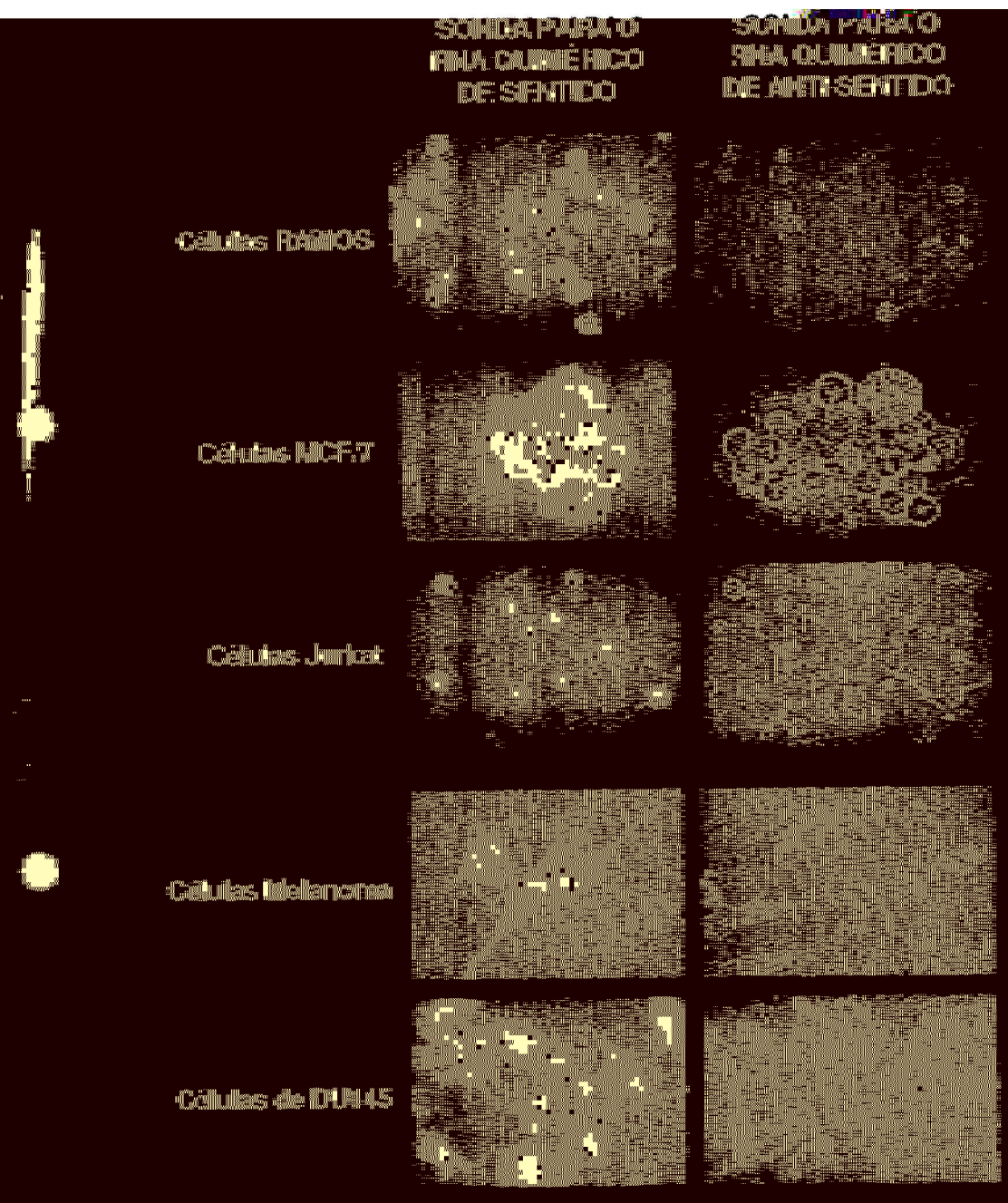


Fig. 18

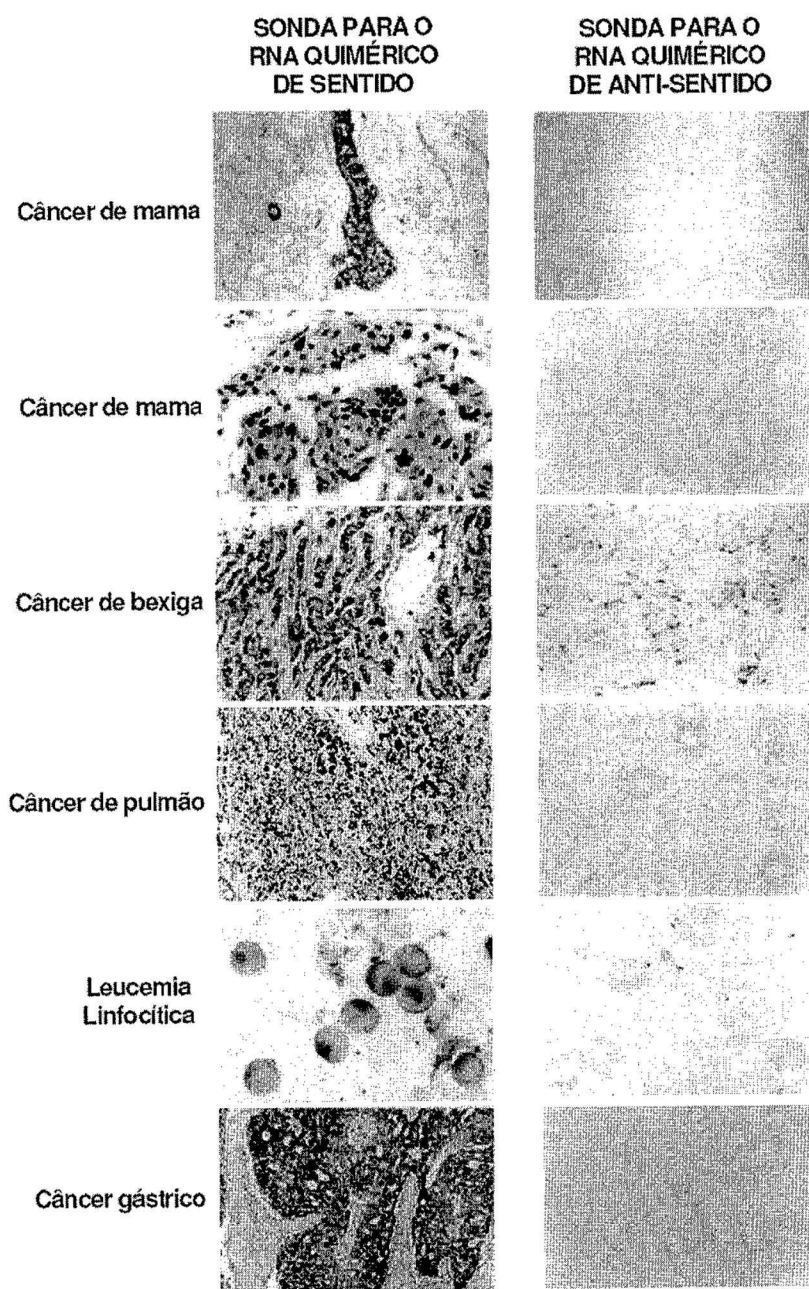


Fig. 5A

SONDA PARA O RNA QUIMÉRICO
MITOCONDRIAL DE SENTIDO

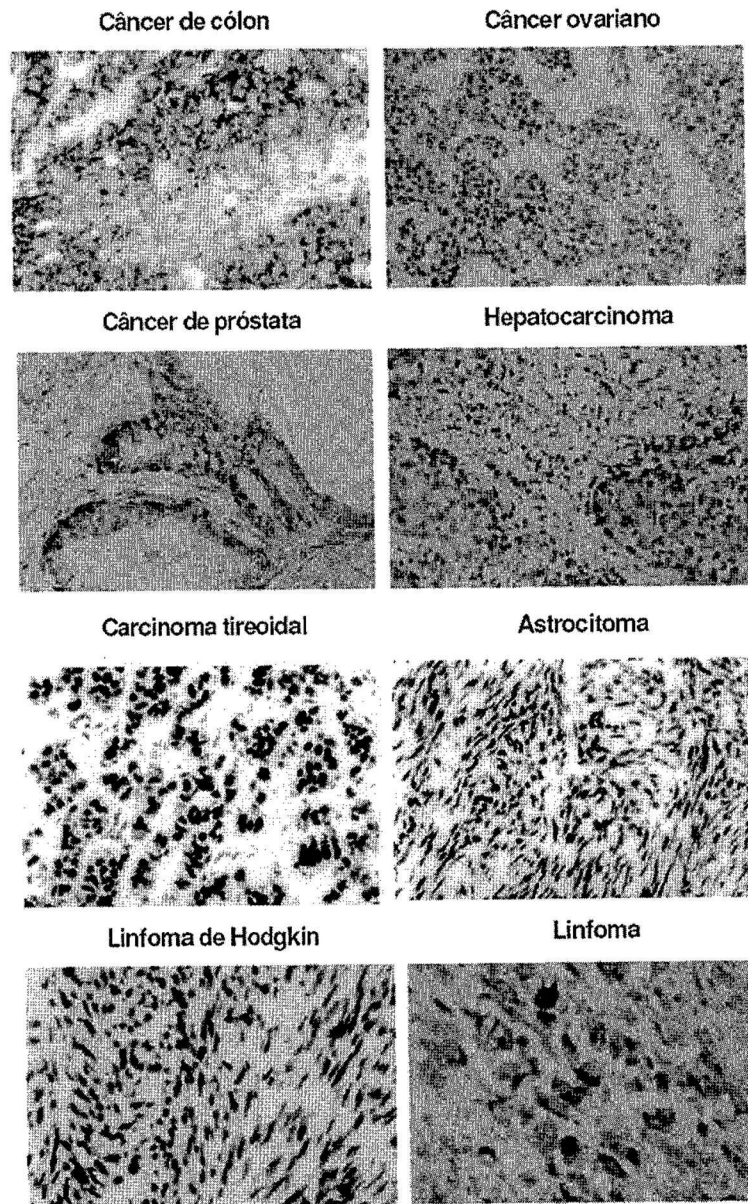


Fig. 5B

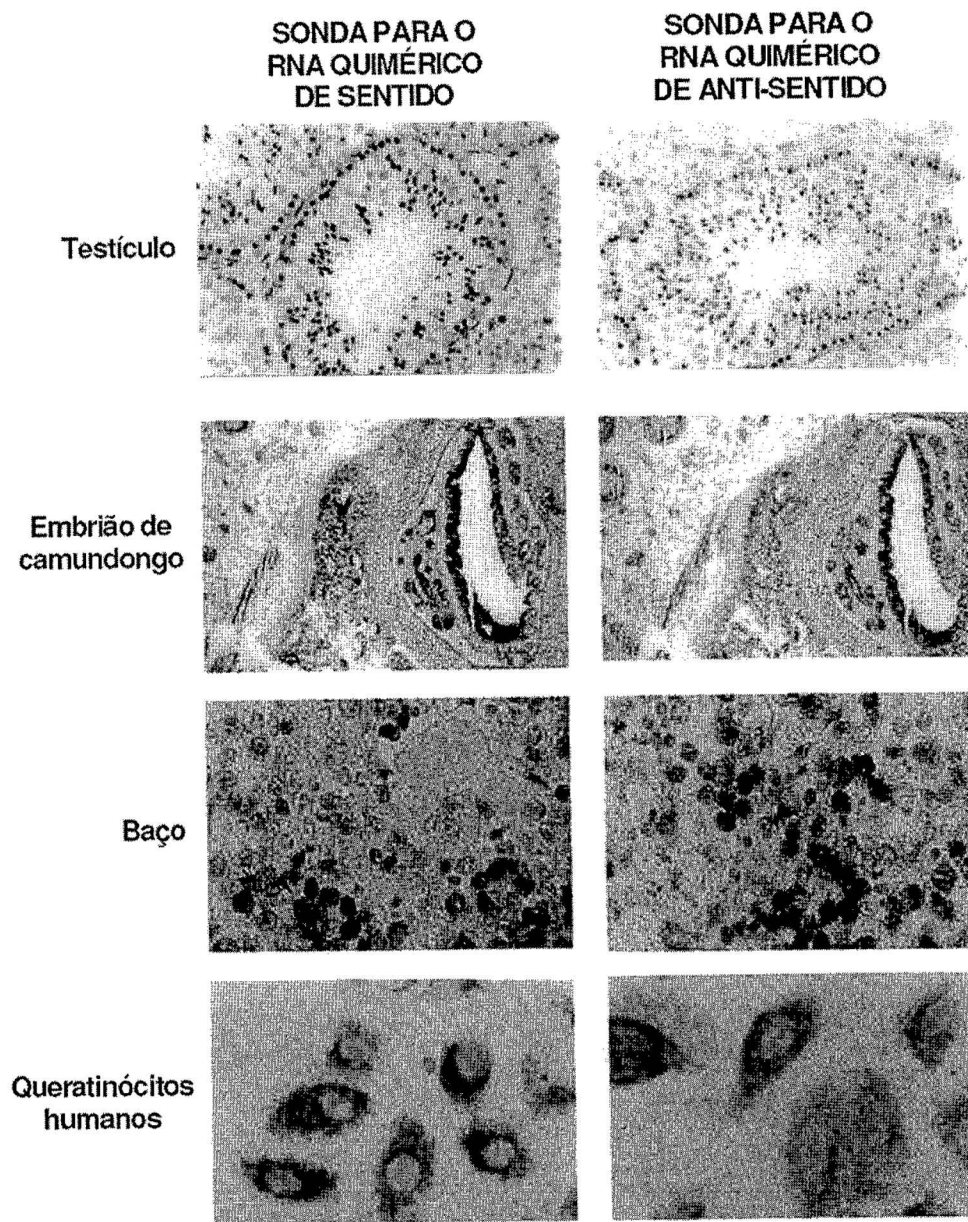


Fig. 6

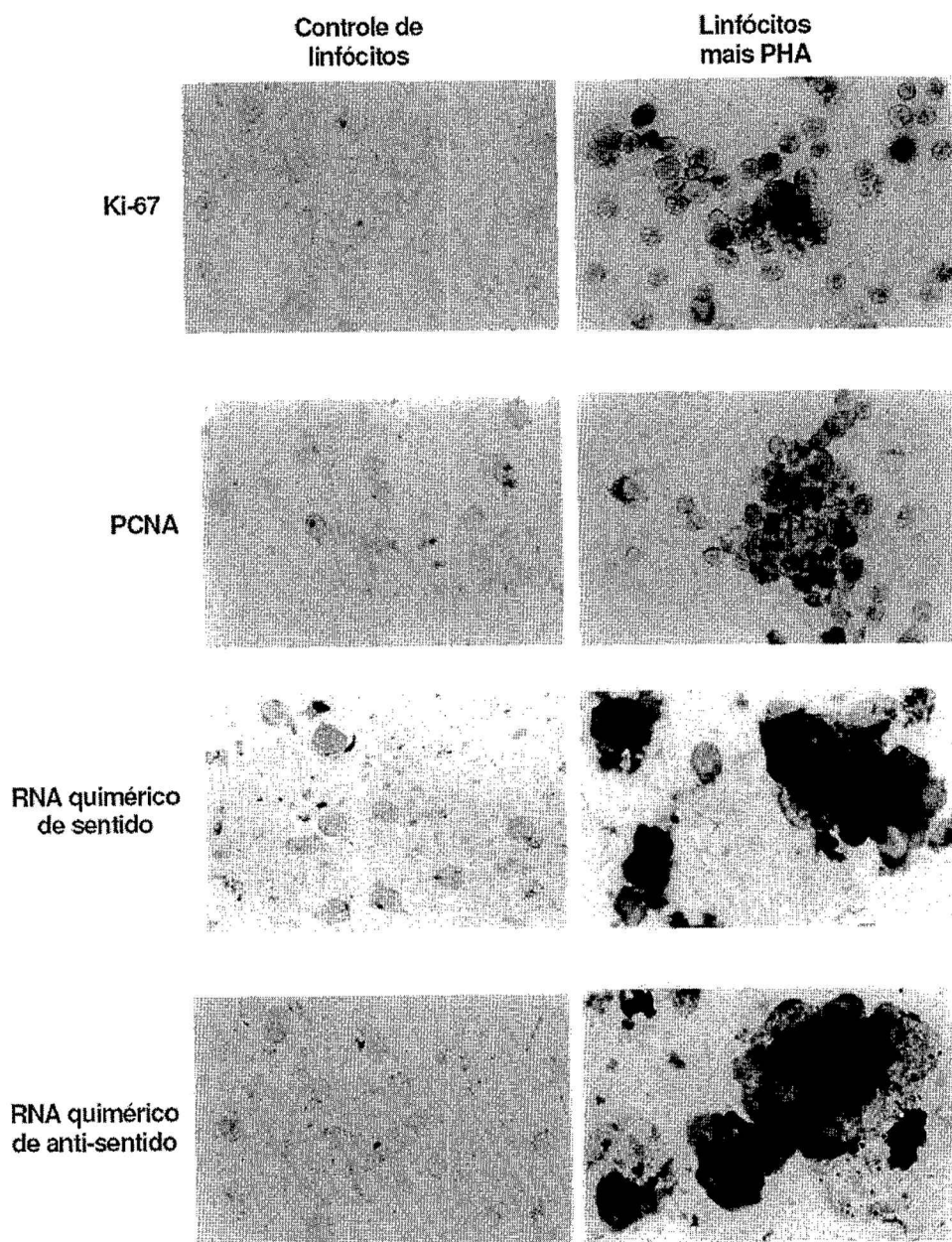


Fig. 7

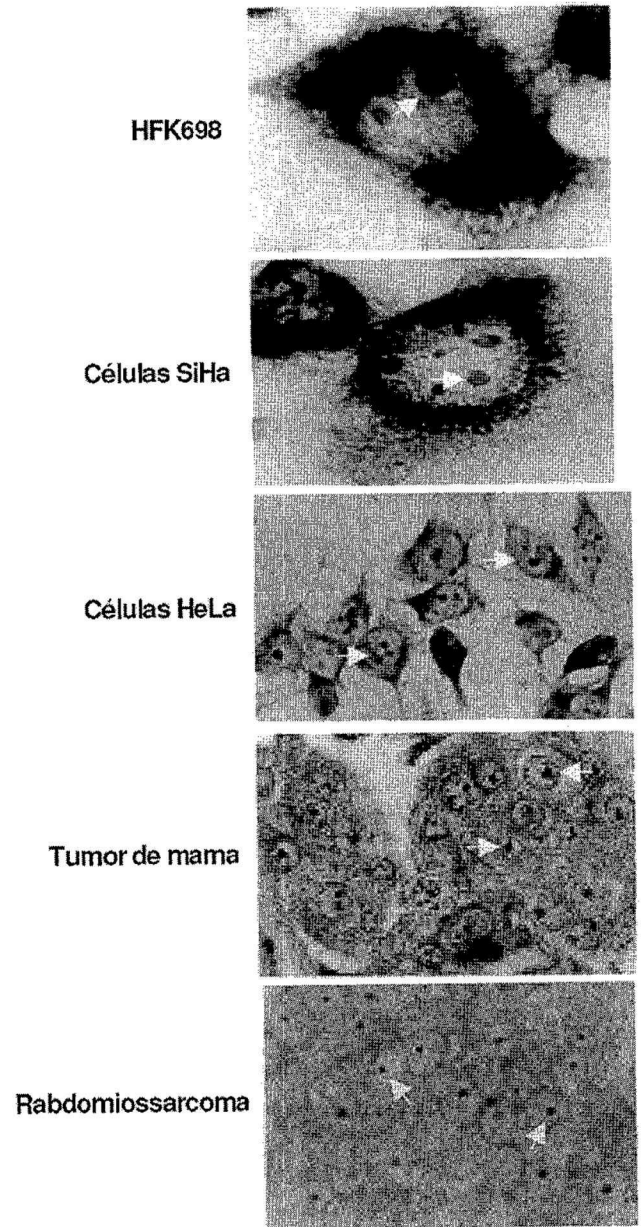


Fig. 8

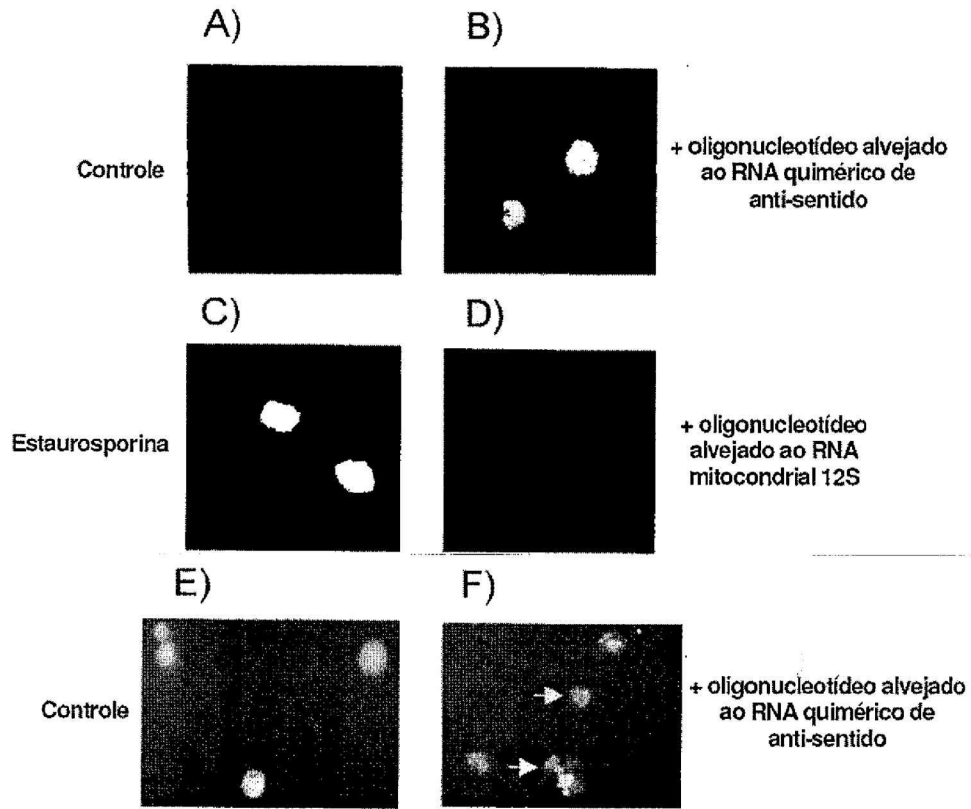


Fig. 9

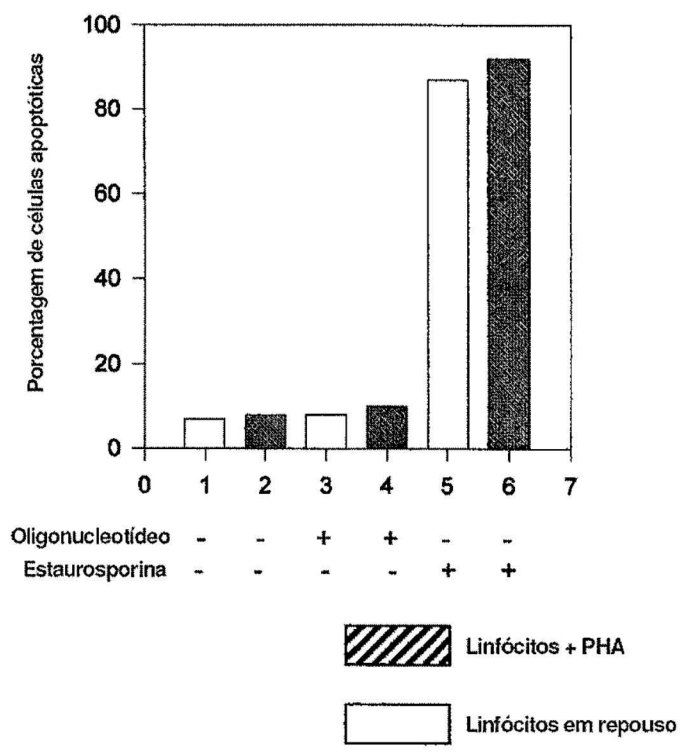


Fig. 10