

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 2003.08.21	(73) Titular(es): THE UNIVERSITY OF BRITISH COLUMBIA UNIVERSITY-INDUSTRY LIAISON OFFICE, NO. 103-6190 AGRONOMY ROAD VANCOUVER, BRITISH COLUMBIA V6T 1Z3 CA
(30) Prioridade(s): 2002.08.21 US 405193 P 2002.09.03 US 408152 P 2002.12.02 US 319748 P 2003.05.20 US 472387 P	(72) Inventor(es): BURKHARD JANSEN CA MARTIN E. GLEAVE CA
(43) Data de publicação do pedido: 2005.05.18	(74) Mandatário: MARIA SILVINA VIEIRA PEREIRA FERREIRA RUA CASTILHO, N.º 50, 5º - ANDAR 1269-163 LISBOA PT
(45) Data e BPI da concessão: 2010.08.18 222/2010	

(54) Epígrafe: **TRATAMENTO DO MELANOMA POR REDUÇÃO DOS NÍVEIS DE CLUSTERINA**

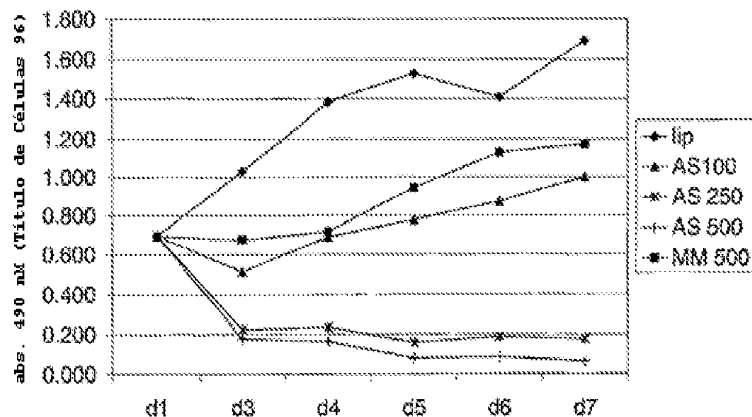
(57) Resumo:

O TRATAMENTO DO MELANOMA É CONSEGUIDO ATRAVÉS DA REDUÇÃO NA QUANTIDADE EFECTIVA DE CLUSTERINA NAS CÉLULAS DO MELANOMA. ASSIM, DE ACORDO COM UM ASPECTO DA INVENÇÃO, É PROPORCIONADO UM MÉTODO PARA O TRATAMENTO DO MELANOMA NUM INDIVÍDUO MAMÍFERO, PREFERENCIALMENTE UM SER HUMANO, COMPREENDENDO O PASSO DA ADMINISTRAÇÃO A UM INDIVÍDUO DE UM AGENTE TERAPÊUTICO EFICAZ PARA REDUZIR A QUANTIDADE EFICAZ DE CLUSTERINA NAS CÉLULAS DO MELANOMA. O AGENTE TERAPÊUTICO PODE SER, POR EXEMPLO, UM COMPOSTO ANTISENÇO ODN OU ARN INIBIDOR PEQUENO (ARNSI), DIRECCIONADO PARA A CLUSTERINA. A PRESENTE INVENÇÃO TAMBÉM PROPORCIONA UM MÉTODO PARA REGULAR A EXPRESSÃO DO BCL-XL NUM INDIVÍDUO OU NUMA LINHA CELULAR COMPREENDENDO A ADMINISTRAÇÃO A UM INDIVÍDUO OU LINHA CELULAR DE UM AGENTE EFICAZ PARA MODULAR A QUANTIDADE DE EXPRESSÃO DA CLUSTERINA. EM PARTICULAR, NAS CÉLULAS QUE EXPRESSAM A CLUSTERINA, A EXPRESSÃO DO BCL-XL É REGULADA NEGATIVAMENTE QUANDO A QUANTIDADE EFICAZ DE CLUSTERINA É REDUZIDA. TAL INIBIÇÃO É SIGNIFICATIVA PORQUE O BCL-XL É CONHECIDO POR ACTUAR COMO UM INIBIDOR DA APOPTOSE.

RESUMO

"TRATAMENTO DO MELANOMA POR REDUÇÃO DOS NÍVEIS DE CLUSTERINA"

Clusterina 607B AS sem Cisplatina



O tratamento do melanoma é conseguido através da redução na quantidade efectiva de clusterina nas células do melanoma. Assim, de acordo com um aspecto da invenção, é proporcionado um método para o tratamento do melanoma num indivíduo mamífero, preferencialmente um ser humano, compreendendo o passo da administração a um indivíduo de um agente terapêutico eficaz para reduzir a quantidade eficaz de clusterina nas células do melanoma. O agente terapêutico pode ser, por exemplo, um composto antisense ODN ou ARN inibidor pequeno (ARNSi), direccionado para a clusterina. A presente invenção também proporciona um método para regular a expressão do bcl-xL num indivíduo ou numa linha celular compreendendo a administração a um indivíduo ou linha celular de um agente eficaz para modular a quantidade de expressão da clusterina. Em particular, nas células que expressam a clusterina, a expressão do bcl-xL é regulada negativamente quando a quantidade eficaz de clusterina é reduzida. Tal inibição é significativa porque o bcl-xL é conhecido por actuar como um inibidor da apoptose.

DESCRIÇÃO

"TRATAMENTO DO MELANOMA POR REDUÇÃO DOS NÍVEIS DE CLUSTERINA"

O presente pedido de patente reivindica o benefício e a prioridade sobre os pedidos de patentes provisórios US N°s 60/405,193 depositado a 21 de Agosto, 2002, 60/408,152 depositado a 3 de Setembro, 2002, 60/319,748 depositado a 2 de Dezembro, 2002 e 60/472,387 depositado a 20 de Maio, 2003.

Fundamentos da Invenção

O presente pedido de patente diz respeito aos tratamentos para o melanoma por inibição da clusterina, também conhecida por mensagem 2 da próstata reprimida por testosterona (TRPM-2), por exemplo, através da administração de oligonucleótidos antisense específicos para a clusterina.

A clusterina ou TRPM-2 é uma proteína ubíqua, com um intervalo diverso de actividades propostas. Nas células epiteliais da próstata, a expressão da clusterina aumenta imediatamente após a castração, alcançando níveis máximos em células da próstata de rato, 3 a 4 dias após a castração, coincidentes com o auge da morte celular massiva. Estes resultados levaram alguns investigadores à conclusão de que a clusterina é um marcador para a morte celular e um promotor da apoptose. Por outro lado, a observação de que as células de Sertoli e algumas células epiteliais expressam níveis elevados de clusterina sem níveis elevados de morte celular, levanta questões relativamente ao facto de esta conclusão ser correcta. Sensibar et al., Câncer Research 55:2431-2437 (1995)

descreveu experiências *in vitro* realizadas para elucidar mais claramente sobre o papel da clusterina na morte celular prostática. Eles utilizaram as células LNCaP transfectadas com um gene que codifica para a clusterina e observaram se a expressão desta proteína alterava ou não os efeitos do factor de necrose do tumor α (TNF α), aos quais as células LNCaP são muito sensíveis, com a morte celular a ocorrer normalmente dentro de aproximadamente 12 horas. O tratamento das células LNCaP transfectadas com TNF α demonstrou resultar num aumento transiente dos níveis de clusterina durante um período de algumas horas, mas estes níveis já se tinham dissipado quando foi observada a fragmentação do ADN que precede a morte celular. Utilizando uma molécula antisenso correspondendo às bases 1-21 da sequência da clusterina, não outros oligonucleótidos antisenso da clusterina, resulta numa redução substancial na expressão da clusterina e num aumento da morte celular por apoptose nas células LNCaP expostas ao TNF α . Isto levou Sensibar *et al.*, à hipótese de que a sobre-expressão da clusterina poderia proteger as células do efeito citotóxico do TNF e que a depleção da clusterina é responsável pelo desencadeamento da morte celular, embora o mecanismo de acção permaneça por clarificar.

A publicação do documento PCT W000/049937 descreve o uso da terapia antisenso, a qual reduz a expressão da clusterina para proporcionar os benefícios terapêuticos no tratamento do cancro da próstata, cancro das células renais e alguns cancros da mama. Adicionalmente, o uso combinado da clusterina antisenso com a quimioterapia citotóxica (*p.ex.*, taxanos) sinergisticamente potencia a quimiosensibilidade no cancro da próstata refractário hormonal. A sensibilidade à radiação é também potenciada quando as células que expressam a clusterina são tratadas com oligodesoxinucleótidos de clusterina antisenso (ODN).

Sumário da Invenção

O presente pedido de patente diz respeito ao tratamento do melanoma através da redução na quantidade eficaz de clusterina. Assim, de acordo com um aspecto da invenção, é proporcionado um método para o tratamento do melanoma num mamífero, preferencialmente um ser humano, compreendendo o passo de administração ao indivíduo de um agente terapêutico eficaz para reduzir a quantidade eficaz de clusterina nas células do melanoma. O agente terapêutico pode ser, por exemplo, um composto ODN antisenso ou um ARN inibidor pequeno (ARNsi) direccionado para a clusterina.

A presente invenção também proporciona uns métodos para regular a expressão do bcl-xL num indivíduo ou linha celular compreendendo a administração ao indivíduo ou linha celular de um agente eficaz para modular a quantidade de clusterina expressa. Em particular, nas células que expressam a clusterina, a expressão do bcl-xL é regulada negativamente quando a quantidade eficaz de clusterina é reduzida. Tal inibição é significativa pois o bel-xL é conhecido é conhecido por actuar como um inibidor da apoptose. Ver, por exemplo, a Patente US N° 6,172,216.

Breve Descrição das Figuras

A fig. 1 apresenta os resultados quando as células do melanoma 607B foram tratadas quer com o oligonucleótido antisenso às concentrações de 100, 250 ou 500 nM ou com um controlo do desemparelhamento codificado numa concentração de 100 nM em dois dias consecutivos.

A fig. 2 proporciona representações gráficas da expressão da clusterina em células 518A2 após o tratamento com cisplatina e quer com um oligonucleótido antisenso ou com um controlo do desemparelhamento codificado.

A fig. 3 apresenta a sobrevivência celular das células do melanoma Mel Juso transfectadas de um modo estável quer com um vector de controlo vazio (Neo) ou com um vector director da sobre-expressão da clusterina, cultivadas em meio contendo cisplatina 10 μ M.

Descrição da Invenção

Tal como usado na descrição e reivindicações deste pedido de patente, o termo "clusterina" refere-se à glicoproteína originalmente derivada dos testes com ratos e a proteínas homólogas derivadas de outras espécies de mamíferos, incluindo humanos, quer denominados como clusterina quer com um nome alternativo. As sequências de numerosas espécies de clusterina são conhecidas. Por exemplo, a sequência da clusterina humana é descrita por Wong et al., Eur. J. Biochem. 221 (3), 917-925 (1994) e no número de acesso da sequência NCBI NM_001831 e é estabelecido na Listagem de sequências como a Seq. ID. N° 1. Nesta sequência, a sequência de codificação engloba as bases 48 a 1397.

A presente invenção proporciona uma composição terapêutica e os métodos para usar uma tal composição para o tratamento do melanoma, particularmente em seres humanos. As composições terapêuticas e os métodos da invenção conseguem uma redução na quantidade eficaz de clusterina presente no indivíduo a ser tratado. Tal como usado neste pedido de patente, a "quantidade eficaz de clusterina" é a quantidade de clusterina presente numa forma que seja funcional para proporcionar protecção anti-apoptose. A quantidade eficaz de clusterina pode ser reduzida por decréscimo da taxa de expressão da clusterina, aumentando a taxa de degradação da clusterina ou por modificação da clusterina (por exemplo, por ligação com um anticorpo) de modo a ser considerada inactiva.

Terapêutica com ODN Antisense

Numa forma de realização da invenção, a redução na quantidade eficaz da clusterina pode ser conseguida por administração de ODNs antisense, particularmente ODNs antisense que são complementares a uma região do ARNm da clusterina que englobem quer o local de iniciação da tradução, quer o local de terminação. As sequências dos exemplos, que podem ser empregues como moléculas antisense no método da invenção são divulgadas na publicação da Patente PCT US-2002-0128220-A1 e a Patente US N° 6,383,808. As sequências antisense específicas são estabelecidas no presente pedido de patente como Seq. ID N°s: 2 a 12.

Os ODNs empregues podem ser modificados para aumentar a estabilidade do ODN *in vivo*. Por exemplo, os ODNs podem ser empregues como derivados do fosforotioato (substituição de átomos de oxigénio fosforilo não formadores de pontes com um átomo de enxofre) que aumentaram a resistência à digestão pela nuclease. A modificação do MOE (2'-O-(2-metoxietil) (esqueleto ISIS) também é eficaz. A construção de tal ODN modificado é descrita em detalhe no Pedido de Patente US 10/080,794. Um composição particularmente preferida é um oligonucleótido 21 mer (cagcagcagagtcttcatcat; SEQ ID NO: 4) direccionado para o codão de iniciação da tradução e 6 codões seguintes da sequência da clusterina humana (acesso Genbank n°: NM_001831) com uma modificação 2'-MOE. Este oligonucleótido tem nele inserido um esqueleto de fosforotioato. As porções de açúcar dos nucleótidos 1-4 e 18-21 (as "asas") comportam modificações em 2'-O-metoxietilo e os restantes nucleótidos (nucleótidos 5-17; a "fenda desoxi") são 2'-desoxinucleótidos. As citosinas nas asas (i.e., os nucleótidos 1, 4 e 19) são 5-metilcitosinas.

A administração dos ODNs antisense pode ser efectuada usando os vários mecanismos conhecidos na técnica, incluindo a administração isolada e a administração em veículos lipídicos farmacologicamente aceitáveis. Por exemplo, os veículos lipídicos para a distribuição antisense são divulgados nas Patentes U.S. Nº 5,855,911 e 5,417,978. Em geral, o antisense é administrado por via intravenosa, intraperitoneal, subcutânea ou oral, ou por injeção directa no local do tumor.

A quantidade de ODN antisense administrado é uma quantidade eficaz para inibir a expressão da clusterina nas células do melanoma. Deve ser tido em consideração que esta quantidade vai variar com ambas a eficácia do ODN antisense empregue e com a natureza de qualquer veículo usado. A determinação de quantidades apropriadas para qualquer dada composição está compreendida nas competências da técnica, através de séries de testes padrão designados para avaliar os níveis terapêuticos apropriados.

Terapêutica ARNi

A redução na quantidade eficaz de clusterina pode também ser conseguida usando a terapia ARNi. A interferência do ARN ou "ARNi" é um termo inicialmente usado por Fire e colaboradores para descrever a observação de que o ARN de dupla cadeia (ARNds) pode bloquear a expressão dos genes quando é introduzido em minhocas (Fire et al. (1998) Nature 391, 806-811). O ARNds dirige o silenciamento específico para os genes e pós-transcrição, em muitos organismos, incluindo vertebrados e tem proporcionado uma nova ferramenta para estudar a função genética. O ARNi envolve a degradação do ARNm mas muitos dos mecanismos bioquímicos subjacentes a esta interferência são desconhecidos. O uso do ARNi foi adicionalmente descrito em Carthew et al.

(2001) *Current Opinions in Cell Biology* 13, 244-248 e Elbashir et al. (2001) *Nature* 411, 494-498.

Na presente invenção, as moléculas de ARN isoladas medeiam o ARNi. Isto é, as moléculas de ARN isoladas da presente invenção medeiam a degradação ou bloqueiam a expressão do ARNm que é o produto da transcrição do gene, o qual também é referido como sendo um gene alvo. Por conveniência, um tal ARNm também pode ser referido aqui como um ARNm a ser degradado. Os termos ARN, molécula(s) de ARN, segmento(s) de ARN e fragmento(s) de ARN podem ser usados inter permutavelmente para referir o ARN que medeia a interferência do ARN. Estes termos incluem o ARN de cadeia dupla, o ARN de cadeia simples, o ARN isolado (ARN parcialmente purificado, ARN essencialmente puro, ARN sintético, ARN produzido por recombinação), assim como o ARN alterado que difere do ARN que ocorre naturalmente por adição, deleção, substituição e/ou alteração de um ou mais nucleótidos. Tais alterações podem incluir a adição de material não nucleotídico, tal como a(s) extremidade(s) do ARN ou internamente (num ou mais nucleótidos do ARN). Os nucleótidos nas moléculas de ARN da presente invenção também podem compreender nucleótidos não padrão, incluindo nucleótidos que não ocorrem naturalmente ou desoxiribonucleótidos. Colectivamente, todas as moléculas de ARNi assim alteradas são referidas como sendo análogos ou análogos de ARN que ocorrem naturalmente. O ARN da presente invenção apenas precisa de ser suficientemente semelhante ao ARN natural que tenha a capacidade de mediar o ARNi. Tal como aqui usado, a frase "medeia o ARNi" refere-se e indica a capacidade de distinguir qual o ARNm a ser afectado pela maquinaria ou processo do ARNi. O ARN que medeia o ARNi interage com a maquinaria do ARNi de tal modo que direcciona a maquinaria para degradar determinados ARNm ou, por outro lado, para reduzir a expressão da proteína

alvo. Numa forma de realização, a presente invenção refere-se a moléculas de ARN que dirigem a clivagem de ARNm específicos para os quais a sua sequência corresponde. Não é necessário que exista uma correspondência perfeita das sequências, mas a correspondência deve ser suficiente para permitir ao ARN dirigir a inibição do ARNi por clivagem ou bloqueio da expressão do ARNm alvo.

Tal como é notado acima, as moléculas de ARN da presente invenção compreendem em geral uma porção de ARN e alguma porção adicional, por exemplo, uma porção de desoxiribonucleótido. O número total de nucleótidos na molécula de ARN é adequadamente menor que 49 de modo a serem mediadores eficazes do ARNi. Nas moléculas de ARN preferidas, o número de nucleótidos é 16 a 29, mais preferencialmente 18 a 23 e mais preferencialmente, 21-23. As sequências adequadas são estabelecidas no presente pedido de patente como as Seq. ID N^os. 20 a 43.

As moléculas de ARNsi da invenção são usadas na terapia para tratar pacientes, incluindo pacientes humanos, que têm cânceros ou outras doenças de um tipo em que seja obtido um benefício terapêutico pela inibição da expressão da proteína alvo. As moléculas de ARNsi da invenção são administradas aos pacientes por uma ou mais injeções diárias (intravenosa, subcutânea ou intratecal) ou por administração intravenosa ou intratecal contínua para um ou mais ciclos de tratamento para alcançar as concentrações de plasma e tecido adequadas à regulação do ARNm e proteínas alvo.

Agentes terapêuticos adicionais

O método para tratar o melanoma de acordo com a invenção pode incluir adicionalmente a administração de agentes quimioterapêuticos ou outros agentes úteis na terapia do

melanoma e/ou ODNs antisenso adicionais direccionados para alvos diferentes, em combinação com o agente terapêutico eficaz para reduzir a quantidade de clusterina activa. Por exemplo, o ODN da clusterina antisenso aumenta a sensibilidade para os agentes quimioterapêuticos convencionais, tais como os taxanos (paclitaxel ou docetaxel), mitoxantrona e gencitabina. Outros agentes que são prováveis demonstrar actividade sinérgica incluem outros agentes citotóxicos (p.ex., ciclofosfamida, decarbazina, inibidores da topoisomerase), inibidores da angiogénese, agentes de diferenciação e inibidores da transdução de sinal. De um modo semelhante, as combinações da clusterina antisenso com outras espécies antisenso, tais como ODN Bcl-2, Bcl-xL e c-myc antisenso para proporcionar uma maior eficácia.

Método de regulação da expressão do Bcl-xL

Enquanto que foi proposta uma função semelhante a um chaperone para a proteína clusterina, o mecanismo molecular específico responsável pelo papel da clusterina na apoptose permanece elusiva. Na linha celular do melanoma humano que expressa a clusterina a níveis muito baixos, a sobre-expressão da clusterina por transfecção estável não leva apenas a um aumento marcado na resistência a um tratamento citotóxico (Figura 3), mas leva também a uma sobre-regulação do bcl-xL, membro da família bcl-2, anti-apoptótico, tal como demonstrado por *western blotting*. Inversamente, o tratamento das células do melanoma que expressam a clusterina levaram a uma sub-regulação marcada do bcl-xL, proporcionando assim um mecanismo possível para a potência anti-apoptótica da clusterina. Nem a sobre-expressão da clusterina por transfecção nem o tratamento antisenso da clusterina alterou a expressão de outros membros da família Bcl-2 testados em células de melanoma

humanas. Assim, a clusterina regula o membro da família bcl-2 anti-apoptótico, bcl-xL. Tal inibição é significativa pois o bcl-xL é conhecido por actuar como um inibidor da apoptose (ver Patente US N° 6,182,216).

A invenção será, de seguida, adicionalmente descrita fazendo referência aos exemplos seguintes, não limitantes.

Exemplo 1

A expressão da clusterina em dois lotes diferentes de melanócitos humanos normais (NHEM 6083 e 2489) e quatro linhas celulares de melanoma humano (518A2, SKMEL-28, Mel-Juso e 607B). As células foram cultivadas em placas de 6 cm e colhidas quando estavam com 80-90% de confluência. Foram aplicados 30 g de proteína por faixa num gel SDS-page a 10% e aplicada uma sonda com um anticorpo policlonal de cabra anti-clusterina. Foram utilizados o marcador vermelho de Panceau e um anticorpo direccionado contra a β -actina, como um controlo de carregamento. Em cada caso, o inibidor antisense da clusterina usado foi baseado na química antisense avançada 2'MOE tal como descrito no Pedido de Patente US 10/080,794 e tem a sequência da Seq. ID. N° 4.

A fig. 1 apresenta os resultados quando células de melanoma 607B foram tratadas quer com o oligonucleótido antisense a concentrações de 100, 250 ou 500 nM ou com um controlo codificado a uma concentração de 100 nM em dois dias consecutivos. A lipofectina® (lip) sem oligonucleótidos foi usada como um controlo. Os números de células em 96 microplacas de poços foram medidos fotometricamente, utilizando MTS (Título de células 96®, Pierce). Tal como demonstrado, as contagens celulares na presença de poços tratados com antisense a 250 e 500 nM são significativamente reduzidas.

A fig. 2 proporciona representações gráficas da expressão da clusterina em células 518A2 após tratamento com cisplatina e quer com um oligonucleótido antisenso ou um controlo codificado. A Lip é um controlo de lipofectina sem oligonucleótidos. A detecção foi realizada usando um anticorpo direccionado contra a clusterina.

Os resultados demonstraram que em células do melanoma humanas, a clusterina é expressa a níveis significativamente mais elevados do que em melanócitos humanos em todas, menos uma, as linhas celulares testadas. O inibidor antisenso (modificação MOE da Seq. ID. N° 4) levou a uma sub-regulação da clusterina dependente da dose, tal como demonstrado por RT-PCR ao nível do ARNm e por western-blot ao nível da proteína, quando comparado com o controlo do desemparelhamento codificado. Esta sub-regulação levou a um aumento da morte celular por apoptose, através do tratamento com antisenso, por si só. Numa linha de células do melanoma (607B), por si só, foi suficiente para levar à morte celular total (Fig. 1). Noutra linha de células do melanoma, as células sobreviventes demonstraram ter uma sensibilidade aumentada a um tratamento consecutivo com o fármaco citotóxico cisplatina, quando comparadas com células tratadas com um oligonucleótido de desemparelhamento controlado (Figura 2).

Exemplo 2

As células do melanoma Mel Juso transfectaram de um modo estável quer com um vector de controlo vazio (Neo) ou com um vector direccionado para a sobre-expressão da clusterina foram cultivadas em meio contendo cisplatina 10 μ M. A sobrevivência celular foi medida usando os kits de titulação de células 96 da Promega. Os resultados estão resumidos na Figura 3. Tal como demonstrado, a sobre-expressão da clusterina aumentou dramaticamente a

sobrevivência celular, ou referido de um modo diferente, reduziu a eficácia do agente quimioterapêutico.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> UNIVERSIDADE DE BRITISH COLUMBIA

GLEAVE, Martin

JANSEN, Burkhard

<120> TRATAMENTO DO MELANOMA POR REDUÇÃO DOS NÍVEIS DE
CLUSTERINA

<130> 49101-4

<140> AINDA NÃO REGISTADO

<141> 2003-08-21

<150> US 60/405,193

<151> 2002-08-21

<150> US 60/319,748

<151> 2002-12-02

<150> US 60/408,152

<151> 2002-09-03

<150> US 60/473,387

<151> 2003-05-20

<160> 43

<170> PatentIn versão 3.2

<210> 1

<211> 1676

<212> X

<213> Homo sapiens

<400> 1

gaattccgcc	gctgaccgag	gcgtgcaaag	actccagaat	tggaggcatg	atgaagactc	60
tgctgctgtt	tgtggggctg	ctgctgacct	gggagagtgg	gcaggtcctg	ggggaccaga	120
cggctctcaga	caatgagctc	caggaaatgt	ccaatcaggg	aagtaagtac	gtcaataagg	180
aaattcaaaa	tgctgtcaac	ggggtgaaac	agataaagac	tctcatagaa	aaaacaaacg	240
aagagcgcaa	gacactgctc	agcaacctag	agaagccaa	gaagaagaaa	gaggatgccc	300
taaatagagac	cagggaatca	gagacaaagc	tgaaggagct	cccaggagtg	tgcaatgaga	360
ccatgatggc	cctctgggaa	gagtgtaaag	cctgcctgaa	acagacctgc	atgaagttct	420
acgcacgcgt	ctgcagaagt	ggctcaggcc	tggttggccg	ccagcttgag	gagttcctga	480
accagagctc	gcccttctac	ttctggatga	atggtgaccg	catcgactcc	ctgctggaga	540
acgaccggca	gcagacgcac	atgctggatg	tcatgcagga	ccacttcagc	cgcgcgtcca	600
gcatcataga	cgactcttcc	caggacaggt	tcttcacctg	ggagccccag	gataacctacc	660
actacctgcc	cttcagcctg	ccccaccgga	ggcctcactt	cttctttccc	aagtccccca	720
tcttccgcag	cttgatgccc	ttctctccgt	acgagccccct	gaacttccac	gccatgttcc	780
agcccttctc	tgagatgata	cacgaggttc	agcaggccat	ggacatccac	ttccacagcc	840
cggccttcca	gcacccgcca	acagaattca	tacgagaagg	cgacgatgac	cggactgtgt	900
gccgggagat	ccgccacaac	tccacgggct	gcctgcggat	gaaggaccag	tgtgacaagt	960
gccgggagat	cttgtctgtg	gactgttcca	ccaacaaccc	ctcccaggct	aagctgcggc	1020
gggagctcga	cgaatccctc	caggtcgctg	agaggttgac	caggaaatac	aacgagctgc	1080
taaagtccta	ccagtggaaag	atgctcaaca	cctcctcctt	gctggagcag	ctgaacgagc	1140
agtttaactg	ggtgtcccgg	ctggcaaacc	tcacgcaagg	cgaagaccag	tactatctgc	1200
gggtcaccac	ggtggcttcc	cacacttctg	actcggacgt	tccttccggg	gtcactgagg	1260
tggtcgtgaa	gctctttgac	tctgatccca	tcactgtgac	ggtccctgta	gaagtctcca	1320
ggaagaaccc	taaatttatg	gagaccgtgg	cggagaaagc	gctgcaggaa	taccgcaaaa	1380
agcaccggga	ggagtggagt	gtggatgttg	cttttgcacc	ttacgggggc	atcttgagtc	1440
cagctcccc	caagatgagc	tgcagcccc	cagagagagc	tctgcacgtc	accaagtaac	1500
caggccccag	cctccaggcc	cccaactccg	cccagcctct	ccccgctctg	gatcctgcac	1560
tctaacactc	gactctgctg	ctcatgggaa	gaacagaatt	gctcctgcat	gcaactaatt	1620
caataaaaact	gtcttgtag	ctgaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaag	gaattc	1676

<210> 2

<211> 21

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 2

gcacagcagg agaattcttca t 21

<210> 3

<211> 21

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 3

tggagtcttt gcacgcctcg g 21

<210> 4

<211> 21

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 4

cagcagcaga gtcttcatca t 21

<210> 5

<211> 21

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 5

attgtctgag accgtctggt c 21

<210> 6

<211> 21

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 6

ccttcagctt tgtctctgat t 21

<210> 7

<211> 21

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 7

agcagggagt cgatgcggtc a 21

<210> 8

<211> 21

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 8

atcaagctgc ggacgatgcg g 21

<210> 9

<211> 21

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 9

gcaggcagcc cgtggagttg t 21

<210> 10

<211> 21

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 10

ttcagctgct ccagcaagga g 21

<210> 11

<211> 21

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 11

aatttaggg tcttcctgga g 21

<210> 12

<211> 21

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 12

gctgggcgga gttgggggcc t 21

<210> 13

<211> 17

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 13

ggtgtagacg ccgcacg 17

<210> 14

<211> 16

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 14

gcagcgcagc ccctgg 16

<210> 15

<211> 22

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 15'

gcagcagccg cagcccggct cc 22

<210> 16

<211> 18

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 16

agccgcagcc cggctcct 18

<210> 17

<211> 20

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 17

cagcagccgc agcccggctc 20

<210> 18

<211> 20

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 18

gcagcagccg cagcccggct 20

<210> 19

<211> 20

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 19

agcagccgca gcccggctcc 20

<210> 20

<211> 21

<212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> ARNi para clusterina humana

<400> 20

ccagagcucg cccuucuact t 21

<210> 21

<211> 21
<212> ADN
<213> artificial
<220>
<223> ARNi para clusterina humana

<400> 21
guagaagggc gagcucuggt t 21

<210> 22
<211> 21
<212> ADN
<213> artificial
<220>
<223> ARNi para clusterina humana

<400> 22
gaugcucaac accuccucct t 21

<210> 23
<211> 21
<212> ADN
<213> artificial
<220>
<223> ARNi para clusterina humana

<400> 23
ggaggaggug uugagcauct t 21

<210> 24
<211> 19
<212> ADN
<213> artificial
<220>
<223> ARNi para clusterina humana

<400> 24

uaauucaaca aaacugutt 19

<210> 25

<211> 21

<212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> ARNi para clusterina humana

<400> 25

gacaguuuua uugaauuagt t 21

<210> 26

<211> 19

<212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> ARNi para clusterina humana

<400> 26

uaauucaaca aaacugutt 19

<210> 27

<211> 19

<212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> ARNi para clusterina humana

<400> 27

acaguuuugu ugaauuatt 19

<210> 28

<211> 21
<212> ADN
<213> artificial
<220>
<223> ARNi para clusterina humana

<400> 28
augaugaaga cucugcugct t 21

<210> 29
<211> 21
<212> ADN
<213> artificial
<220>
<223> ARNi para clusterina humana

<400> 29
gcagcagagu cuucaucut t 21

<210> 30
<211> 22
<212> ADN
<213> artificial
<220>
<223> ARNi para clusterina humana

<400> 30
ugaaugaagg gacuaaccug tt 22

<210> 31
<211> 22
<212> ADN
<213> artificial
<220>
<223> ARNi para clusterina humana

<400> 31

cagguuaguc ccuucuuca tt 22

<210> 32

<211> 22

<212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> ARNi para clusterina humana

<400> 32

cagaaauaga caaagugggg tt 22

<210> 33

<211> 22

<212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> ARNi para clusterina humana

<400> 33

ccccacuuug ucuauuucug tt 22

<210> 34

<211> 22

<212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> ARNi para clusterina humana

<400> 34

acagagacua agggaccaga tt 22

<210> 35

<211> 22
<212> ADN
<213> artificial
<220>
<223> ARNi para clusterina humana

<400> 35
acagagacua agggaccaga tt 22

<210> 36
<211> 21
<212> ADN
<213> artificial
<220>
<223> ARNi para clusterina humana

<400> 36
ccagagcucg cccuucuact t 21

<210> 37
<211> 21
<212> ADN
<213> artificial
<220>
<223> ARNi para clusterina humana

<400> 37
guagaagggc gagcucuggt t 21

<210> 38
<211> 21
<212> ADN
<213> artificial
<220>
<223> ARNi para clusterina humana

<400> 38

gucccgcauc guccgcagct t 21

<210> 39

<211> 21

<212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> ARNi para clusterina humana

<400> 39

gcugcggacg augcgggact t 21

<210> 40

<211> 21

<212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> ARNi para clusterina humana

<400> 40

cuaauucaau aaaacuguct t 21

<210> 41

<211> 21

<212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> ARNi para clusterina humana

<400> 41

gacaguuua uugaauuagt t 21

<210> 42

<211> 19

<212> ARN
<213> artificial
<220>
<223> ARNi para clusterina humana

<400> 42
augaugaaga cucugcugc 19

<210> 43
<211> 19
<212> ARN
<213> artificial
<220>
<223> ARNi para clusterina humana

<400> 43
gcagcagagu cuucaucau 19

Lisboa, 10 de Novembro de 2010.

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de uma composição compreendendo um agente terapêutico na forma de um oligodesoxinucleótido antisense ou um oligonucleótido ARNsi direcionado para o gene de clusterina ou um anticorpo direcionado para a clusterina e eficaz para reduzir a quantidade eficaz de clusterina em células do melanoma para a formulação de uma composição farmacêutica para o tratamento do melanoma.
2. Uso de acordo com a reivindicação 1, em que o agente terapêutico é um oligodesoxinucleótido antisense.
3. Uso de acordo com a reivindicação 2, em que o oligodesoxinucleótido antisense abrange quer o local de iniciação da tradução, quer o local de terminação.
4. Uso de acordo com as reivindicações 2 ou 3, em que o oligodesoxinucleótido antisense é modificado para aumentar a estabilidade *in vivo* relativamente a um oligodesoxinucleótido não modificado com a mesma sequência.
5. Uso de acordo com a reivindicação 4, em que a modificação é uma modificação (2'-O-(2-metoxietil)).
6. Uso de acordo com as reivindicações 2-5, em que o oligodesoxinucleótido antisense consiste essencialmente num oligodesoxinucleótido seleccionado do grupo que consiste nas Seq. ID N°s. 2 a 12.
7. Uso de acordo com a reivindicação 6, em que o oligodesoxinucleótido antisense consiste na Seq. ID N° 4.
8. Uso de acordo com a reivindicação 7, em que o oligodesoxinucleótido tem incorporado um esqueleto

fosforotioato, as porções açúcar dos nucleótidos 1-4 e 18-21, as "asas", comportam modificações 2'-O-metoxietil e os restantes nucleótidos são 2'-desoxinucleótidos.

9. Uso de acordo com a reivindicação 1, em que o agente terapêutico é uma molécula de ARN eficaz para reduzir a quantidade eficaz de clusterina nas células do melanoma por um mecanismo de ARNi.

10. Uso de acordo com a reivindicação 9, em que a molécula de ARN compreende um oligonucleótido seleccionado do grupo que consiste nas Seq. ID N°s 20 a 43 ou numa molécula de ARN de cadeia dupla compreendendo um oligonucleótido seleccionado do grupo que consiste nas Seq. ID N°s. 20 a 43 como cadeia simples.

11. Uso de acordo com a reivindicação 9, em que a molécula de ARN consiste num oligonucleótido seleccionado do grupo que consiste nas Seq. ID N°s 20 a 43 ou numa molécula de ARN de cadeia dupla contendo um oligonucleótido que consiste num oligonucleótido seleccionado do grupo que consiste nas Seq. ID 20 a 43 como cadeia simples.

Lisboa, 10 de Novembro de 2010.

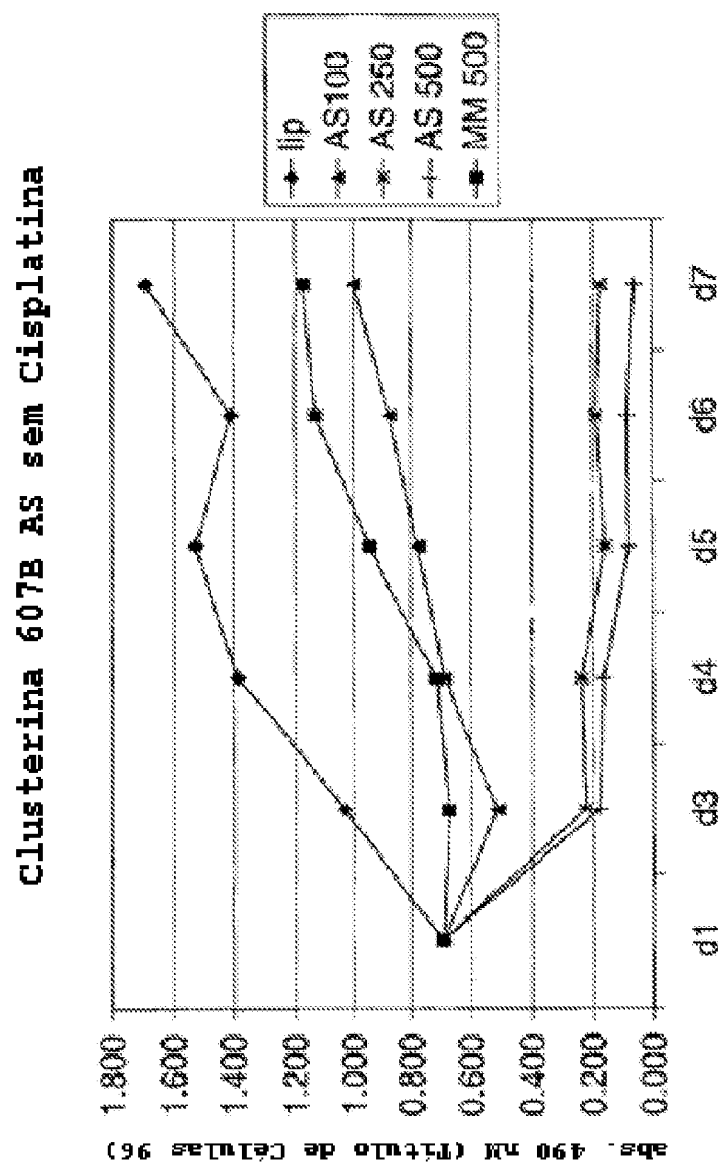


Figura 1

Curva da Relação de Dose 519 A2 24 horas após adição da Cisplatina

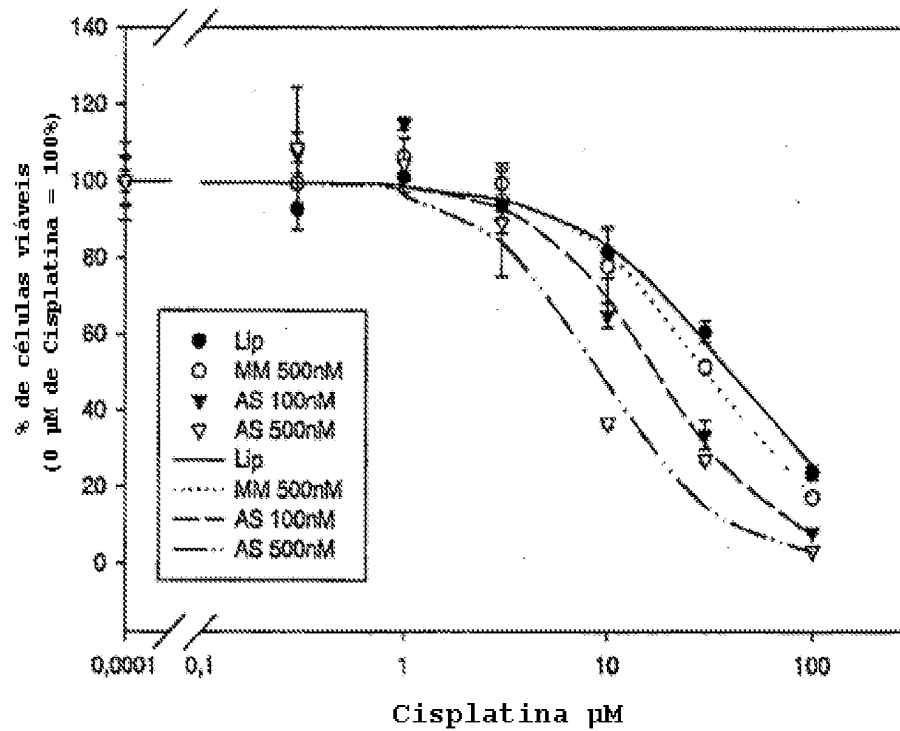


Figura 2

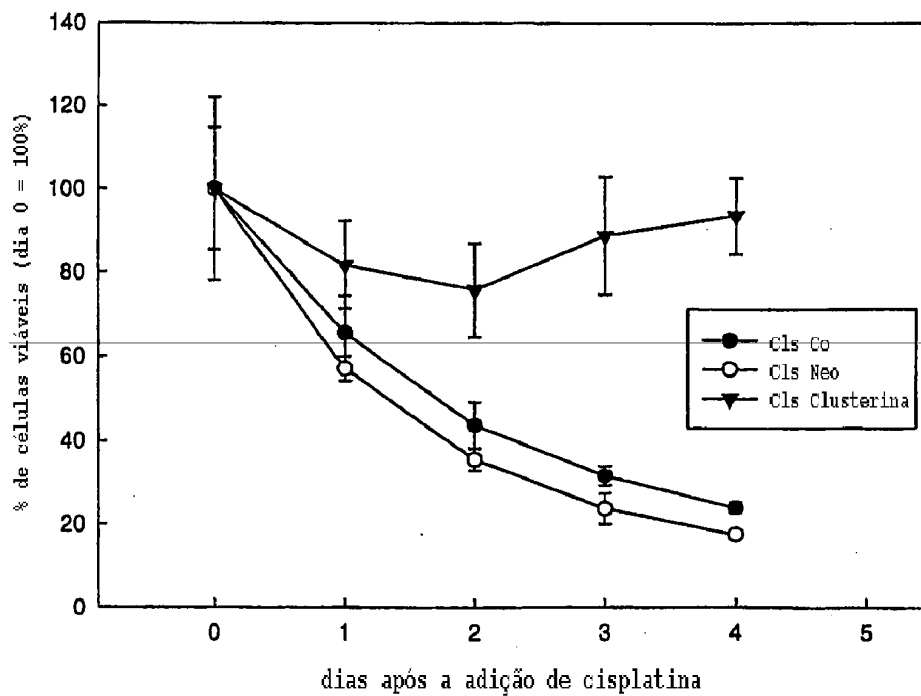


Figura 3